

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

TESE

Avaliação experimental de *Amblyomma dubitatum*
(Acari: Ixodidae) como vetor biológico de *Rickettsia*
***rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae)**

Renata Kazuko Sakai

2014



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

**AVALIAÇÃO EXPERIMENTAL DE *Amblyomma dubitatum* (ACARI:
IXODIDAE) COMO VETOR BIOLÓGICO DE *Rickettsia rickettsii*
(RICKETTSIALES: RICKETTSIACEAE)**

RENATA KAZUKO SAKAI

Sob a Orientação da Professora
Darci Moraes Barros Battesti

e Co-orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

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 2014

636.089696

S158a

T

Sakai, Renata Kazuko, 1982-
Avaliação experimental de *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) como vetor biológico de *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) / Renata Kazuko Sakai. - 2014.
46 f.: il.

Orientador: Darci Moraes Barros Battesti.

Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, 2014.

Bibliografia: f. 28-33.

1. Parasitologia veterinária - Teses. 2. *Rickettsia* - Teses. 3. *Amblyomma* - Teses. 4. Doenças transmissíveis - Teses. I. Battesti, Darci Moraes Barros, 1959- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. III. Título.

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

RENATA KAZUKO SAKAI

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 25/02/2014



Darci Moraes Barros Battesti D.Sc., Butantan
(Orientadora)



Marcelo Bahia Labruna D.Sc., USP



Nathalie Costa da Cunha D.Sc., UFF



João Luiz Horacio Faccini D.Sc., UFRRJ



Carlos Luiz Massard D.Sc., UFRRJ

Dedico este trabalho.....

Aos meus familiares que sempre estão ao meu lado, a minha orientadora Darci e aos meus amigos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por me dar forças todos os dias e tornar este sonho possível.

Agradeço imensamente minha família e ao meu namorado, pelo amor e dedicação, porque quem esteve ao meu lado por esses anos sabe que não foi fácil, quantas vezes chegava desanimada, mas enfim sempre ao meu lado.

A minha orientadora Darci Moraes Barros Battesti que desde o início acreditou em mim, e foi uma das maiores incentivadoras para que eu concluísse esse doutorado. Darci muito obrigada, pelos ensinamentos, dedicação, paciência, amor, enfim quase uma mãe.

A Lucy Kelly de Paula que me ajudou em todos os momentos, você sabe que se não fosse você me ajudando este sonho não seria possível, te agradeço pelos ensinamentos, amizade e por tornar isto possível.

Ao professor Adivaldo Henrique da Fonseca meu co-orientador, obrigada pelos ensinamentos e pela ajuda durante a realização do curso.

Aos amigos Charles Passos Rangel, Tatianne Leme Oliveira Santos Godói, Elise Miyuki Yamasaki, Maria Clara da Silva Negreiros Botelho, Ana Paula Rosa.

As minhas amigas do grupo de veterinários voluntários que sempre incentivaram e torceram por mim, Dani, Fan, Melina, Tota, Irene, Ednéia, Lu, Liede, Adriane.

Aos amigos do Laboratório do Butantan, Diego Ramirez, Felipe, Ana, Daniela Iano, Eleonor, Cris.

Aos amigos da USP, Francisco Costa, João Fábio Soares, Tatiana Ueno, Andréa, Tiago, Fernanda, Felipe, Washington, Herbert, Amália, Monize, Arlei.

Aos amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ.

Aos meus amigos do trabalho.

Ao professor Marcelo Bahia Labruna por toda a ajuda e por permitir a utilização dos laboratórios na USP.

Aos funcionários da USP sempre solidários.

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado.

RESUMO

SAKAI, Renata Kazuko. **Avaliação experimental de *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) como vetor biológico de *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae).** 2014. 33p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Fêmeas ingurgitadas de *Amblyomma dubitatum*, naturalmente infectadas por *Rickettsia bellii*, foram utilizadas para estabelecer uma colônia de laboratório. Larvas, ninfas e adultos foram expostos a duas cepas de *Rickettsia rickettsii* alimentando-se em cobaias inoculadas e, posteriormente mantidas em cobaias não infectadas. Após a alimentação, larvas e ninfas ingurgitadas mudaram para ninfas e adultos, respectivamente, que mostraram estar infectados (confirmando a perpetuação transtadial), e foram capazes de transmitir ambas as cepas de *R. rickettsii* para animais não infectados, como demonstrado pela clínica, sorologia, e análises moleculares. No entanto, as fases de larvas, ninfas e adultos de *A. dubitatum* demonstraram ser apenas parcialmente susceptível a infecção por *R. rickettsii*, uma vez que em todos os casos, apenas uma parte dos carrapatos se tornaram infectados por este agente, após serem expostos a animais na fase de rickettsisemia. Enquanto a transmissão transovariana de *R. rickettsii* foi ineficiente nas fêmeas ingurgitadas de *A. dubitatum* do presente estudo, 100% dessas fêmeas passaram *R. bellii* transovarianamente. Uma vez que foi relatado que uma infecção primária por uma espécie *Rickettsia* impediria a transmissão transovariana de uma segunda espécie de *Rickettsia*, é provável que a ineficácia do *A. dubitatum* para perpetuar *R. rickettsii* por transmissão transovariana foi relacionada com infecção primária por *R. bellii*; no entanto, também pode estar relacionado a fatores desconhecidos inerentes à *A. dubitatum*. A relevância de *A. dubitatum* como um vetor natural de *R. rickettsii* aos seres humanos ou animais é discutida.

Palavras-chave: *Rickettsia rickettsii*, *Amblyomma dubitatum*, competência vetorial, febre maculosa

ABSTRACT

SAKAI, Renata Kazuko. **Experimental evaluation of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) as a biological vector of *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae).** 2014. 33p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Amblyomma dubitatum engorged females, naturally infected by *Rickettsia bellii*, were used to establish a laboratory colony. Larvae, nymphs, and adults were exposed to two strains of *Rickettsia rickettsii* by feeding on needle-inoculated guinea pigs, and thereafter reared on uninfected guinea pigs. After acquisition feeding, engorged larvae and nymphs molted to nymphs and adults, respectively, which were shown to be infected (confirming transstadial perpetuation), and were able to transmit both strains of *R. rickettsii* to uninfected animals, as demonstrated by clinical, serological, and molecular analyses. However, the larval, nymphal, and adult stages of *A. dubitatum* showed to be only partially susceptible to *R. rickettsii* infection, since in all cases, only part of the ticks became infected by this agent, after being exposed to rickettsemic animals. While transovarial transmission of *R. rickettsii* was inefficient in the *A. dubitatum* engorged females of the present study, 100% of these females passed *R. bellii* transovarially. Because it has been reported that a primary infection by a *Rickettsia* species would preclude transovarial transmission of a second *Rickettsia* species, it is likely that the ineffectiveness of *A. dubitatum* to perpetuate *R. rickettsii* by transovarial transmission was related to its primary infection by *R. bellii*; however, it could also be related to unknown factors inherent to *A. dubitatum*. The relevance of *A. dubitatum* as a natural vector of *R. rickettsii* to humans or animals is discussed.

Key words: *Rickettsia rickettsii*, *Amblyomma dubitatum*, Vector competence, Spotted fever

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Dados das cobaias infectadas experimentalmente com inóculo de *Rickettsia rickettsii* Cepa Itu e Taiacu e das cobaias infestadas com *Amblyomma dubitatum* infectados, via de inoculação, período febril, lesão na área genital, óbito, título sorológico para *R.rickettsii* e *Rickettsia bellii*. 15
- Tabela 2.** Dados das ninfas e adultos em jejum de *Amblyomma dubitatum* dos grupos GL, GN e GC testados por PCR-GFM tanto das Cepas Itu quanto Taiacu. 19
- Tabela 3.** Peso de ingurgitamento, sucesso da oviposição, e infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa (GFM) (determinado por um PCR específico do GFM) em fêmeas ingurgitadas *Amblyomma dubitatum*. Grupos GL, GN, e GA consistiam de fêmeas ingurgitadas que foram inicialmente expostas a *Rickettsia rickettsii* durante o estágio de larvas, ninfas, e adultos, respectivamente. 20

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Diagrama ilustrando os procedimentos experimentais com *Amblyomma dubitatum*. Os carrapatos do grupo de larvas (GL), ninfas (GN) e adultos (GA) foram expostos a *Rickettsia rickettsii* Cepa Itu e Taiapu em animais infectados (cobaias). Os carrapatos do grupo controle (GC) foram alimentados em cobaias livres de infecção. 09
- Figura 2.** Valores da temperatura retal aferida em cobaias infectadas experimentalmente (intraperitonealmente-IP) com *R. rickettsii* Cepa Itu, e das cobaias infestadas com ninfas e adultos de *A. dubitatum* que foram infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas (GL). 16
- Figura 3.** Valores da temperatura retal aferida em cobaias infectadas experimentalmente (intraperitonealmente-IP) com *R. rickettsii* Cepa Taiapu, e das cobaias infestadas com ninfas e adultos de *A. dubitatum* que foram infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas (GL). 17
- Figura 4.** Valores da temperatura retal aferida em cobaias infectadas experimentalmente (intraperitonealmente-IP) com *R. rickettsii* Cepa Itu, e das cobaias infestadas com adultos de *A. dubitatum* que foram infectados com *R. rickettsii* na fase de ninfas (GN). 17
- Figura 5.** Valores da temperatura retal aferida em cobaias infectadas experimentalmente (intraperitonealmente-IP) com *R. rickettsii* Cepa Taiapu, e das cobaias infestadas com adultos de *A. dubitatum* que foram infectados com *R. rickettsii* na fase de ninfas (GN). 18

LISTA DE ABREVIACOES

BHI	Infusão de Cérebro e Corao
BOD	“Biological Oxygen Demand”-Demanda Biológica de Oxignio
DNA	cido Desoxirribonucleico
ESALQ/USP	Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo
Exo I	Exonuclease I
FMB	Febre Maculosa Brasileira
GFM	Grupo da Febre Maculosa
GA	Grupo de Adultos
GC	Grupo Controle
GL	Grupo de Larvas
GN	Grupo de Ninfas
GT	Grupo Tifo
GT	Isotiocianato de Guanidina
HCl	cido Clorídrico
mmol/L	Milimol por Litro
n	número
IP	Intraperitonealmente
PCR	Reao em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial de Hidrognio
P _≤	Probabilidade menor ou igual a
RIFI	Reao de Imunofluorescência Indireta
rpm	Rotaoes por minuto
T	Temperatura
UFRRJ	Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
U	Umidade
V/cm	Volts/centímetro
X	vez
%	Porcentagem
±	Mais ou menos
C	Grau Celsius
µL	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1	Classificação do Gênero <i>Rickettsia</i> e Considerações	3
2.2	Estudos Realizados no Brasil com Rickettsias	4
2.3	A Espécie <i>A. dubitatum</i>	6
3	MATERIAL E MÉTODOS	7
3.1	Procedência dos Carrapatos e Manutenção da Colônia de <i>A. dubitatum</i>	7
3.2	Extração de DNA de Carrapatos	7
3.3	Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)	8
3.4	Produtos Amplificados, Purificação e Sequenciamento de Nucleotídeos	8
3.5	Cepas Itu e Taiapu de <i>R. rickettsii</i>	8
3.6	Alimentação de <i>A. dubitatum</i> em Cobaias Infectadas com <i>R. rickettsii</i>	9
3.7	Alimentação das Larvas de <i>A. dubitatum</i>	10
3.7.1	Alimentação das larvas de <i>A. dubitatum</i> (GL) em cobaias infectadas experimentalmente com <i>R. rickettsii</i>	10
3.7.2	Alimentação das larvas de <i>A. dubitatum</i> em cobaias não infectadas, originando o grupo controle	10
3.8	Alimentação das Ninfas de <i>A. dubitatum</i> (Grupo GL e Grupo GC)	10
3.8.1	Alimentação das ninfas de <i>A. dubitatum</i> que foram infectados com <i>R. rickettsii</i> na fase de larvas (GL) em cobaias não infectadas	10
3.8.2	Alimentação das ninfas de <i>A. dubitatum</i> (GN) em cobaias infectadas experimentalmente com <i>R. rickettsii</i>	11
3.8.3	Alimentação das ninfas de <i>A. dubitatum</i> em cobaias não infectadas, originando o grupo controle	11
3.9	Alimentação dos Carrapatos Adultos de <i>A. dubitatum</i>	11
3.9.1	Alimentação dos carrapatos adultos de <i>A. dubitatum</i> que foram infectados com <i>R. rickettsii</i> na fase de larvas (GL) em cobaias não infectadas	11
3.9.2	Alimentação dos carrapatos adultos de <i>A. dubitatum</i> que foram infectados com <i>R. rickettsii</i> na fase de ninfas (GN) em cobaias não infectadas	12
3.9.3	Alimentação dos carrapatos adultos de <i>A. dubitatum</i> (GA) em cobaias infectadas experimentalmente com <i>R. rickettsii</i>	12
3.9.4	Alimentação dos carrapatos adultos de <i>A. dubitatum</i> em cobaias não infectadas, originando o grupo controle	12
3.10	Verificação da Transmissão Transovariana dos Carrapatos que Foram Alimentados em Cobaias Infectadas com <i>R. rickettsii</i> e dos Carrapatos do Grupo Controle	12
3.11	Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Extração de DNA dos Tecidos das Cobaias	12
3.12	Avaliação Clínica e Destino dos Animais	13
3.13	Análises Estatísticas	13
4	RESULTADOS	14
4.1	Testes Moleculares das Quenóginas de <i>A. dubitatum</i> Oriundas da Capivara	14

4.2	Cobaias Inoculadas Intraperitonealmente (IP) com <i>R. rickettsii</i> do Grupo de Larvas (GL), Grupo de Ninfas (GN) e do Grupo de Carrapatos Adultos (GA) da Cepa Itu e Taiapu de <i>R. rickettsii</i>	14
4.3	Alimentação em Cobaias dos Carrapatos que Foram Infectados com <i>R. rickettsii</i> na Fase de Larvas (GL), Ninfas (GN) e Adultos (GA) da Cepa Itu e Taiapu de <i>R. rickettsii</i>	14
5	DISCUSSÃO	22
5.1	Cobaias Infectadas Experimentalmente com <i>R. rickettsii</i>	22
5.2	Cobaias Infestadas com Carrapatos do Grupo GL	22
5.3	Cobaias Infestadas com Carrapatos do Grupo GN	22
5.4	Aferição da Temperatura Retal das Cobaias Infectadas Experimentalmente com <i>R. rickettsii</i> e das Cobaias Infestadas com Carrapatos	23
5.5	Carrapatos Positivos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)	23
6	CONCLUSÕES	26
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	28

1 INTRODUÇÃO

As doenças que são transmitidas por artrópodes desafiam a medicina veterinária e humana. Os artrópodes e as infecções transmitidas por eles estão expandindo seus limites, devido às mudanças climáticas e maior acessibilidade a certos nichos ambientais (SHAW et al., 2001), assim como no caso das Rickettsioses.

Rickettsia é uma bactéria intracelular obrigatória pertencente à família *Rickettsiaceae* e ordem *Rickettsiales* (RAOULT; ROUX, 1997). Na maioria das vezes, as espécies de rickettsias tem relação com artrópodes hematófagos, como carrapatos, ácaros, piolhos e pulgas. Algumas rickettsias são capazes de infectar vertebrados, incluindo humanos, sendo geralmente hospedeiros acidentais.

No Brasil, a *Rickettsia rickettsii* é o agente etiológico da febre maculosa brasileira (FMB), a doença tem sido relatada afetando humanos em países como Estados Unidos, México, Costa Rica, Panamá, Colômbia e Argentina (PADDOCK et al., 2008), sua distribuição está restrita às Américas. Casos confirmados de infecção por *R. rickettsii* tem sido relatados para os quatros estados da região Sudeste (SEXTON et al., 1993; LEMOS et al., 2001; ROZENTAL et al., 2002; GALVÃO et al., 2003; LABRUNA, 2009; PACHECO et al., 2009), sendo a *R. rickettsii* a mais conhecida e letal no Brasil.

No Brasil, o carrapato *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) foi incriminado como principal vetor *R. rickettsii*, especialmente devido ao seu grau de antropofilia. Atualmente esta espécie está dividida em seis táxons (BEATI et al., 2013) e somente dois deles ocorrem no Brasil, *A. cajennense* e *Amblyomma sculptum* (Berlese, 1888). Estudos moleculares e morfológicos de populações de *A. cajennense* "strictu sensu" é distribuída desde a região amazônica ao Estado de Mato Grosso, enquanto *A. sculptum* ocorre a partir de zonas úmidas do norte da Argentina, em áreas adjacentes da Bolívia e do Paraguai, bem como na região litorânea e centro-oeste do Brasil. Portanto, o principal vetor de *R. rickettsii* no país é de fato *A. sculptum*. Labruna et al. (2004) também detectaram rickettsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM) em *Amblyomma dubitatum* (Neumann, 1899), porém não está comprovado que este carrapato transmita Febre Maculosa Brasileira (FMB).

A *Rickettsia bellii* tem sido relatada infectando inúmeras espécies de carrapatos no Brasil, incluindo *A. dubitatum*, e ocorre com frequências variadas, dependendo da espécie e população de carrapato (PACHECO et al., 2009).

Os estudos realizados recentemente estão dando mais enfoque para o conhecimento da epidemiologia da doença, e em relação ao comportamento do agente na natureza, identificando os possíveis hospedeiros amplificadores, as espécies vetoradas envolvidas na doença, além das cepas de rickettsias envolvidas.

A espécie *A. dubitatum*, antigamente denominada *Amblyomma cooperi*, é encontrada especialmente em capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) na América do Sul (ALMEIDA et al., 2001), porém existem relatos desta espécie parasitando outros animais, inclusive o homem.

Embora se desconheça exatamente qual o papel de *A. dubitatum* na transmissão de *R. rickettsii*, esta espécie está associada às capivaras que são consideradas possíveis amplificadores da doença e que são hospedeiras para *A. sculptum*. Dessa forma, se faz necessário avaliar se *A. dubitatum* é de fato importante na transmissão da doença.

Se a capacidade vetorial de *A. dubitatum* for comprovada, o presente projeto será útil também na proposição de medidas de controle a serem adotadas em áreas onde há

populações de capivaras próximas aos cursos d'água, principalmente em ambiente peridomiciliar.

O presente estudo teve por finalidade avaliar a capacidade de *A. dubitatum* naturalmente infectadas com *R. bellii*, se infectar com *R. rickettsii* quando alimentadas em cobaias infectadas experimentalmente e verificar se ocorre transmissão transtadial e transovariana. Assim como, avaliar se *A. dubitatum* infectados com *R. rickettsii* serão capazes de transmitir a doença para cobaias livres de infecção, considerando que esta espécie é comum nas áreas endêmicas de FMB. Neste estudo foram utilizadas duas cepas diferentes de *R. rickettsii*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Classificação do Gênero *Rickettsia* e Considerações

Os organismos do gênero *Rickettsia* são classificados como bactérias Gram-negativas, intracelulares obrigatórios (LA SCOLA; RAOULT, 1997).

A febre maculosa causada pela bactéria *R. rickettsii*, foi primeiramente descrita nos Estados Unidos, pelo pesquisador Howard Taylor Ricketts, onde a doença recebeu o nome de febre maculosa das montanhas rochosas. No início do século XX, foi realizado o primeiro isolamento de *R. rickettsii* quando também se estabeleceu o papel do carrapato na transmissão da doença (RICKETTS, 1909).

No Brasil, os primeiros relatos foram descritos no estado de São Paulo (PIZA, 1932), relatando a ocorrência de “Tifo exantemático”.

A classificação mais recente propõe uma nova filogenia para o gênero *Rickettsia*, esses autores sugeriram cinco novos grupos: 1) grupo do tifo (GT), compostos pelas espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*; 2) grupo da febre maculosa, representado por mais de vinte espécies; 3) grupo de transição, compostos pelas espécies *Rickettsia akari*, *Rickettsia felis* e *Rickettsia australis*; 4) grupo Canadensis, composto pela espécie *Rickettsia canadensis* e; 5) grupo Bellii, representado pela espécie *R. bellii* e vários outros genótipos encontrados em insetos (WEINERT et al., 2009).

Há 22 espécies de rickettsias que, comprovadamente, causam infecções no homem (*R. rickettsii*, *R. prowazekii*, *R. typhi*, *Rickettsia conorii* subsp *conorii*, *Rickettsia conorii* subsp *israelensis*, *Rickettsia conorii* subsp *caspia*, *Rickettsia conorii* subsp *indica*, *Rickettsia sibirica* subsp *sibirica*, *Rickettsia sibirica* subsp *mongolotimonae*, *Rickettsia heilogjiangensis*, *Rickettsia slovacica*, *Rickettsia marmionii*, *Rickettsia raoutii*, *Rickettsia africae*, *Rickettsia parkeri*, *R. australis*, *Rickettsia honei*, *Rickettsia japonica*, *Rickettsia massiliae*, *Rickettsia aeschlimannii*, *R. akari*, *R. felis*) (MERHEJ; RAOULT, 2011).

Entre 1998 e 2007, segundo Labruna (2009), foram confirmados 255 casos de Febre Maculosa em 54 municípios do Estado de São Paulo. A doença tem sido reportada no Brasil desde 1920.

Os sintomas clássicos da *R. rickettsii* em humanos são febre alta, cefaléia, mialgia, dor abdominal e aparecimento de manchas na pele, com período médio de incubação de sete dias. A letalidade em casos não tratados com antibióticos específicos pode chegar a mais de 80% (GALVÃO, 1996). Os grandes números de casos não tratados se devem principalmente à carência de um diagnóstico cauteloso, já que os sintomas são comuns às diversas outras doenças (RAOULT; ROUX, 1997; WU et al., 2005).

Diferentes espécies de carrapatos estão envolvidos como vetor de *R. rickettsii* para humanos, nas diferentes localidades geográficas: em países como Panamá, Colômbia e Argentina a espécie envolvida é *A. cajennense* (sensu lato) (PATINO-CAMARGO, 1941; RODANICHE, 1953; PADDOCK et al., 2008); nos Estados Unidos as espécies que participam da transmissão são: *Dermacentor andersoni* Stiles, 1908, *Dermacentor variabilis* Say, 1821 e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (DEMMA et al., 2005); no México, *R. sanguineus* e *A. cajennense* (s.l.) (BUSTAMENTE; VARELA, 1947).

No Brasil, a *R. rickettsii* é transmitida ao homem, por pelo menos duas espécies de carrapatos: *A. sculptum* (citada como *A. cajennense*) (DIAS; MARTINS, 1939; GUEDES et al., 2005) e na região metropolitana da cidade de São Paulo, *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) (PINTER; LABRUNA, 2006). O carrapato *R. sanguineus* também é suspeito de participar como vetor (MORAES-FILHO et al., 2009).

A *R. bellii* tem sido relatada infectando inúmeras espécies de carrapatos, porém a patogenicidade desta espécie é desconhecida para seres humanos (LABRUNA et al., 2007b).

O teste considerado como padrão-ouro para o diagnóstico da infecção por rickettsias é a reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Esta técnica é muito sensível e rápida (LA SCOLA; RAOULT, 1997), mas há desvantagens como a presença de reação cruzada que quase sempre existe, entre os antígenos dos patógenos dentro de um mesmo gênero e também entre gêneros diferentes (PAROLA; RAOULT, 2001).

Existem outros meios para o diagnóstico da doença como, imunohistoquímica, isolamento em cultivo de células e Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) (LA SCOLA; RAOULT, 1997). A técnica de PCR e o sequenciamento de nucleotídeos têm sido frequentemente utilizados por serem bastante sensíveis.

As principais técnicas de diagnóstico utilizadas para a identificação de rickettsias em artrópodes são teste de hemolinfa, imunofluorescência direta para triagem, e PCR (LA SCOLA; RAOULT, 1997).

Um carrapato é considerado vetor de uma espécie de patógeno, quando este adquire o microorganismo através do repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, e mantém esse patógeno no organismo, e é capaz de transmiti-lo para outros hospedeiros, através de repastos sanguíneos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

Se os carrapatos ficarem por um longo período sem se alimentar, os seus microrganismos parasitos sofrem adaptações, necessárias para a sobrevivência destes no organismo do vetor. Essas mudanças geralmente são mediadas por substâncias metabólicas formadas por hormônios do próprio hospedeiro invertebrado (GILFORD; PRICE, 1955). Isto ocorre em diferentes agentes patogênicos, entre eles com a bactéria *R. rickettsii* (KATAVOLOS et al., 1998).

Quando os carrapatos se alimentam, ocorre à ingestão de nutrientes, assim como o aumento de sua temperatura corporal devido à ingestão de sangue de hospedeiros. Desta maneira favorecem a multiplicação e desenvolvimento da bactéria, ocorrendo a “Reativação” destas (SPENCER; PARKER, 1923; HAYES; BURGDORFER, 1982).

2.2 Estudos Realizados no Brasil com Rickettsias

Lemos et al. (1996) relataram o isolamento de rickettsias em *A. dubitatum*, coletados de capivaras em uma área endêmica de febre maculosa na cidade Pedreira-SP, neste estudo foi realizado o isolamento em cultura de células Vero e imunofluorescência.

Guedes et al. (2005) avaliaram a infecção por rickettsias em *Amblyomma spp.* coletados em Coronel Pacheco, estado de Minas Gerais, em uma área endêmica de febre maculosa brasileira. Um total de 78 adultos *A. sculptum* (citados como *A. cajennense*) e 78 *A. dubitatum*, de vida livre foram testados por reação em cadeia pela polimerase (PCR), um pool com 3 carrapatos *A. sculptum* foram positivas na PCR, e submetidos ao sequenciamento de nucleotídeos onde observou-se que a sequência era correspondente com *R. rickettsii*. Os *A. dubitatum* que foram testados, nenhum apresentou resultados positivos para o DNA de rickettsias.

Pinter e Labruna (2006) analisaram 669 adultos *A. aureolatum* coletados em cães numa área endêmica de febre maculosa, na cidade de Mogi das Cruzes-SP, neste estudo observaram que 10 carrapatos estavam infectados com *R. bellii* e 6 carrapatos estavam infectados com *R. rickettsii*.

No município de Piracicaba, SP foram realizados estudos sobre os carrapatos e suas relações com os hospedeiros nas áreas verdes do Campus da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”/Universidade de São Paulo (ESALQ/USP), onde ocorreram óbitos por febre maculosa (PEREZ et al., 2008). Os autores vistoriaram 52 mamíferos e 158 aves parasitadas por 12418 carrapatos, dos quais 7343 estavam no estágio adulto em parasitismo nas capivaras, correspondendo a 80,8% de *A. sculptum* (citada como *A. cajennense*) e 19,2% de *A. dubitatum*. Ambas as espécies foram também encontradas em gambás (*Didelphis aurita*), em porcentagens de 72,4% e 27,6%, respectivamente. Dessa forma, os autores concluíram que na ESALQ, devido aos índices de parasitismo e prevalência, bem como, abundância de carrapatos e suscetibilidade de hospedeiros à rickettsiose, capivaras e gambás são potenciais hospedeiros amplificadores do microrganismo, enquanto equídeos, urubus e gatos atuam como secundários. No entanto, a taxa de infecção nos carrapatos não foi avaliada nesse estudo.

Horta et al. (2007) relatam a importância de gatos domésticos e marsupiais como boas sentinelas devido aos hábitos silvestres. Outros estudos realizados no país constataram que tanto gambás quanto capivaras podem atuar como possíveis hospedeiros amplificadores da infecção por *R. rickettsii* em *A. sculptum* (citada como *A. cajennense*) (HORTA et al., 2009; SOUZA et al., 2009). Em relação a *A. aureolatum*, acredita-se que possivelmente uma espécie de roedor da família Echimyidae, denominada *Euryzomatomys spinosus*, hospedeira para este carrapato, seja amplificadora de *R. rickettsii* em áreas endêmicas para a FMB, na região de São Paulo (LABRUNA, 2009).

Piranda et al. (2008) avaliaram a infecção experimental em cães, um grupo de cães foi inoculado com *R. rickettsii* e em outro grupo de cães foram colocados carrapatos adultos de *A. aureolatum* infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas, os autores concluíram que a cepa brasileira de *R. rickettsii* é patogênica para cães.

Labruna et al. (2008) avaliaram que em cobaias infectadas experimentalmente com *R. rickettsii*, nas quais foram colocadas larvas de *A. sculptum* (citada como *A. cajennense*), *A. aureolatum* e *R. sanguineus*, foi observado a susceptibilidade destas larvas em adquirir a infecção após a muda para ninfas. Freitas et al. (2009) também avaliaram as infecções experimentais de *Haemaphysalis leporispalustris* (Packard, 1869) por uma cepa brasileira de *R. rickettsii*, e seu efeito sobre a biologia do carrapato.

Labruna et al. (2004) coletaram 40 adultos de *A. dubitatum* em três áreas do município de Pedreira, estado de São Paulo, numa área endêmica de Febre Maculosa Brasileira, foi realizada PCR destes exemplares e observou-se que 40% estavam infectados com *R. bellii*. Neste trabalho, os autores detectaram uma espécie de rickettsia do grupo da febre maculosa em *A. dubitatum*, filogeneticamente muito próxima a *R. parkeri*, *R. africae*, *R. sibirica*.

No município de Campinas, estado de São Paulo, foi realizada uma coleta de carrapatos numa área endêmica de Febre Maculosa Brasileira, foram coletados 75 *A. dubitatum* provenientes de 8 capivaras com sorologia positiva para Febre Maculosa Brasileira, sendo que 5,3% destes carrapatos estavam infectados com *R. bellii* (ESTRADA et al., 2006).

Pacheco et al. (2009) ao analisar carrapatos adultos provenientes de 16 localidades do estado de São Paulo, pesquisou a presença de rickettsias em 3.545 *A.*

sculptum (citados como *A. cajennense*) e 2.666 *A. dubitatum*. Foi feito o teste de hemolinfa, reação em cadeia pela polimerase e isolamento de rickettsia em cultivo celular. Os espécimes de *A. sculptum* foram negativos, sendo que 634 (23,8%) *A. dubitatum* estavam infectados com *R. bellii*.

Almeida et al. (2011) coletaram 9 *A. dubitatum* de vida livre ao redor da lagoa da Pampulha, na cidade de Belo Horizonte, estado de Minas Gerais, todos apresentaram Reação em cadeia de polimerase positiva para rickettsia, que revelaram um novo agente, designado como *Rickettsia* sp. cepa Pampulha.

Recentemente, foi realizado um estudo experimental com cobaias e coelhos infectados experimentalmente com *R. rickettsii*, nos quais foram colocados *A. sculptum* (citados como *A. cajennense*) que estavam livres de infecção por rickettsias, para observar se estes carrapatos iriam ou não adquirir este patógeno. Em seguida, estes carrapatos foram alimentados em hospedeiros vertebrados livres de infecção por rickettsias para observar a transmissão da doença. Observou-se que a bactéria é transmitida por transmissão transovariana, porém somente em porcentagens muito baixas. Foi também verificado que a transmissão transestadial ocorre em apenas uma parcela de carrapatos expostos a *R. rickettsii* (SOARES et al., 2012).

2.3 A Espécie *A. dubitatum*

A literatura registra o parasitismo de *A. dubitatum* em morcegos, antas e humanos, entre muitos outros mamíferos, e uma ave (GUIMARÃES, 2001; ONOFRIO, 2007; LABRUNA et al., 2007a; NAVA et al., 2010), porém, a capivara é hospedeiro preferencial para todos os estágios biológicos (NAVA et al., 2010).

Faccini et al. (2006) relataram que em laboratório, coelhos foram hospedeiros adequados para a manutenção das fases de larvas e ninfas de *A. dubitatum*, mas em relação à fase adulta a manutenção da colônia se tornou muito dificultada pela falta de hospedeiros alternativos adequados. Na natureza, os pequenos roedores tem importância como hospedeiros para larvas e ninfas de *A. dubitatum* (DEBÁRBORA et al., 2014).

A distribuição geográfica de *A. dubitatum* abrange Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai e Uruguai. No Brasil, *A. dubitatum* está distribuída nas regiões Sul: Paraná (TOLEDO et al., 2011), Santa Catarina (QUADROS et al., 2013) e Rio Grande do Sul (NAVA et al., 2010); Sudeste: São Paulo (SOUZA et al., 2006; PACHECO et al. 2009), Rio de Janeiro (SERRA-FREIRE et al., 2011), Espírito Santo (NAVA et al., 2010) e Minas Gerais (GUEDES; LEITE, 2008; GUEDES et al., 2011) e Centro-Oeste: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás e Distrito Federal (ONOFRIO, 2007; NAVA et al., 2010).

Embora a relação parasito-hospedeiro de *A. dubitatum* tenha sido estudada com base em material depositado nas coleções do Brasil, Argentina, Uruguai e Paraguai (NAVA et al., 2010), é necessário destacar a importância das modificações ambientais causadas pelo homem, na adaptação de diferentes espécies de carrapatos às novas condições.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Este projeto foi aprovado pela Comissão de ética para utilização de animais de experimentação da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (Processo n° 23083.005946/2013-18).

3.1 Procedência dos Carrapatos e Manutenção da Colônia de *A. dubitatum*

Foram coletadas 10 fêmeas ingurgitadas de *A. dubitatum* de uma capivara naturalmente infestada, encontrada no Município de Jambuí, estado de São Paulo. A colônia foi mantida no Laboratório de Doenças Parasitárias, da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo (FMVZ/USP) em condições experimentais.

Cobaias adultas de ambos os sexos foram utilizadas para a manutenção da colônia de carrapatos. As fêmeas ingurgitadas de *A. dubitatum* obtidas da capivara foram mantidas em estufa do tipo B.O.D. (Demanda biológica de oxigênio) com temperatura de $27\pm 1^\circ\text{C}$ e umidade acima de 85%, para realizarem a postura. As fases não parasitárias obtidas destas fêmeas ingurgitadas, como larvas, ninfas e adultos, as quais foram utilizadas neste experimento, também foram mantidas em estufa B.O.D. nas condições citadas anteriormente.

3.2 Extração de DNA de Carrapatos

A extração de DNA dos carrapatos foi realizada de acordo com o protocolo Isotiocianato de Guanidina (GT) previamente modificado (SANGIONI et al., 2005), para verificar a existência de DNA de rickettsias em carrapatos após a PCR.

Após o final da postura, das fêmeas ingurgitadas de *A. dubitatum* oriundas da capivara, todas as quenóginas foram submetidas à extração de DNA.

Cada carrapato foi colocado individualmente em microtubo (de 1500 μL) contendo 150 μL de tampão TE (Tris HCl 10 mmol/L, EDTA 1 mmol/L, pH 7,4) e perfurado com agulha, e após triturado com a ponteira com a ponta queimada. Em seguida, foi homogeneizado no vórtex por 10 segundos e centrifugado por 6 segundos. Foram então adicionados 450 μL de Isotiocianato de Guanidina, incubando-se por 10 minutos a temperatura ambiente e homogeneizando brevemente no vórtex a cada 2 minutos. Foram acrescentados 100 μL de clorofórmio, e homogeneizando brevemente no vórtex. O microtubo foi então centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos para separar a fase aquosa, a qual foi pipetada e transferida para outro microtubo (de 1500 μL). Foram adicionados à fase aquosa 600 μL de isopropanol com posterior incubação à -20°C de 2 a 18 horas. Em seguida, foi centrifugado a 12.000 rpm à 4°C por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado e foram acrescentados 800 μL de etanol a 70%. O microtubo foi novamente centrifugado a 12.000 rpm por 5 minutos à 4°C , o sobrenadante foi desprezado, e o *pellet* foi secado à 56°C (com microtubo aberto) por 15 minutos no termobloco. O *pellet* foi então ressuspenso em TE, com 30 a 60 μL de acordo com a necessidade, sendo incubado novamente, porém com o microtubo fechado, à 56°C por 15 minutos no termobloco. O DNA foi congelado à -20°C até ser utilizado.

3.3 Reação em Cadeia pela Polimerase (PCR)

Para iniciar o experimento e verificar se estas quenóginas colhidas da capivara estavam livres de rickettsias, todas as amostras de DNA foram testadas por dois protocolos de PCR, um específico para rickettsias do GFM (aqui descrito como PCR-GFM), e um específico para *R. bellii* (aqui descrito com PCR- *R. bellii*). O PCR-GFM consiste nos primers Rr190.70p (5'- ATGGCGAATATTTCTCCAAA-3') e Rr190.701R (5'- GTTCCGTTAATGGCAGCATCT-3') almejando um fragmento do gene da proteína da membrana externa da rickettsia (*ompA*), conforme descrito previamente (EREMEEVA et al., 2006). Para o primer da PCR- *R. bellii* (5'- ATCCTGATTTGCTGAATTTTT-3' e 5'- TGCAATACCAGTACTGACG-3') foi desenvolvido, por ser específico para o gene citrato sintase (*gltA*) da *R. bellii*, conforme descrito previamente (SZABÓ et al., 2013).

Na natureza grande parte dos carrapatos *A. dubitatum* são encontrados naturalmente infectados por *R. bellii*. Por este motivo, as quenóginas obtidas foram testadas por PCR com primer específico para *R. bellii* e foi observado que todos os exemplares estavam infectados. No entanto, o trabalho iniciou-se mesmo assim, com estes carrapatos positivos para *R. bellii*. Outras colônias foram obtidas, porém estavam infectadas com *R. bellii*.

3.4 Produtos Amplificados, Purificação e Sequenciamento de Nucleotídeos

Após a reação de PCR, foram obtidos os produtos amplificados e posteriormente, visualizados em aparelho de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. Foi utilizado tampão TBE 0,5X, sendo submetido à voltagem de 1 a 10 V/cm durante 30 minutos. Para a revelação foi utilizado o produto Syber Safe e as bandas foram visualizadas em transiluminador ultravioleta e após, foi feita a foto do gel.

Foram selecionadas 3 amostras de carrapatos adultos do grupo GL (2 da cepa Itu e 1 da Taiapu) para serem purificados, utilizando-se o produto *ExoSAP-IT* (USB Corporation), que consiste em digerir o excesso de primers e degradar o excesso de nucleotídeos provenientes da PCR. Em seguida, as amostras foram colocadas no termociclador. Após a purificação os nucleotídeos foram submetidos à reação de sequenciamento com o kit comercial BigDye TM Terminator (Perkin Elmer). As amostras foram sequenciadas em sequenciador automático (Applied Biosystems/PerkinElmer, Modelo ABI Prism 310 Genetic, CA, US).

3.5 Cepas Itu e Taiapu de *R. rickettsii*

Nos trabalhos realizados com *R. rickettsii*, frequentemente são utilizadas cobaias por serem susceptíveis a infecção (MCDADE; NEWHOUSE, 1986).

Neste experimento foram usadas duas cepas de *R. rickettsii*, e estas cepas vem sendo mantidas por passagens em animais. A cepa Taiapu foi isolada de *A. aureolatum* obtida em Mogi das Cruzes (PINTER; LABRUNA, 2006) e a cepa Itu foi isolada de *A. sculptum* (citada como *A. cajennense*), obtida em Itu, ambas do estado de São Paulo (KRAWCZAK et al., 2014).

Os inóculos foram obtidos de órgãos de cobaias infectadas experimentalmente por *R. rickettsii*, e congelados em freezer a -80 °C. Os órgãos utilizados foram cérebro, pulmão, baço e fígado. Estes foram macerados em meio de cultura BHI (infusão de cérebro-coração) e logo em seguida, inoculados intraperitonealmente (IP) nas cobaias.

3.6 Alimentação de *A. dubitatum* em Cobaias Infectadas com *R. rickettsii*

Os carrapatos foram alimentados em cobaias previamente infectadas com *R. rickettsii* em apenas um estágio do ciclo biológico, ou seja, ou quando larva ou ninfa ou adulto (Figura 1). Nos estágios seguintes, quando fizeram a muda, os carrapatos foram alimentados em cobaias livres de infecção, para avaliar se estas iriam ou não adquirir a infecção.

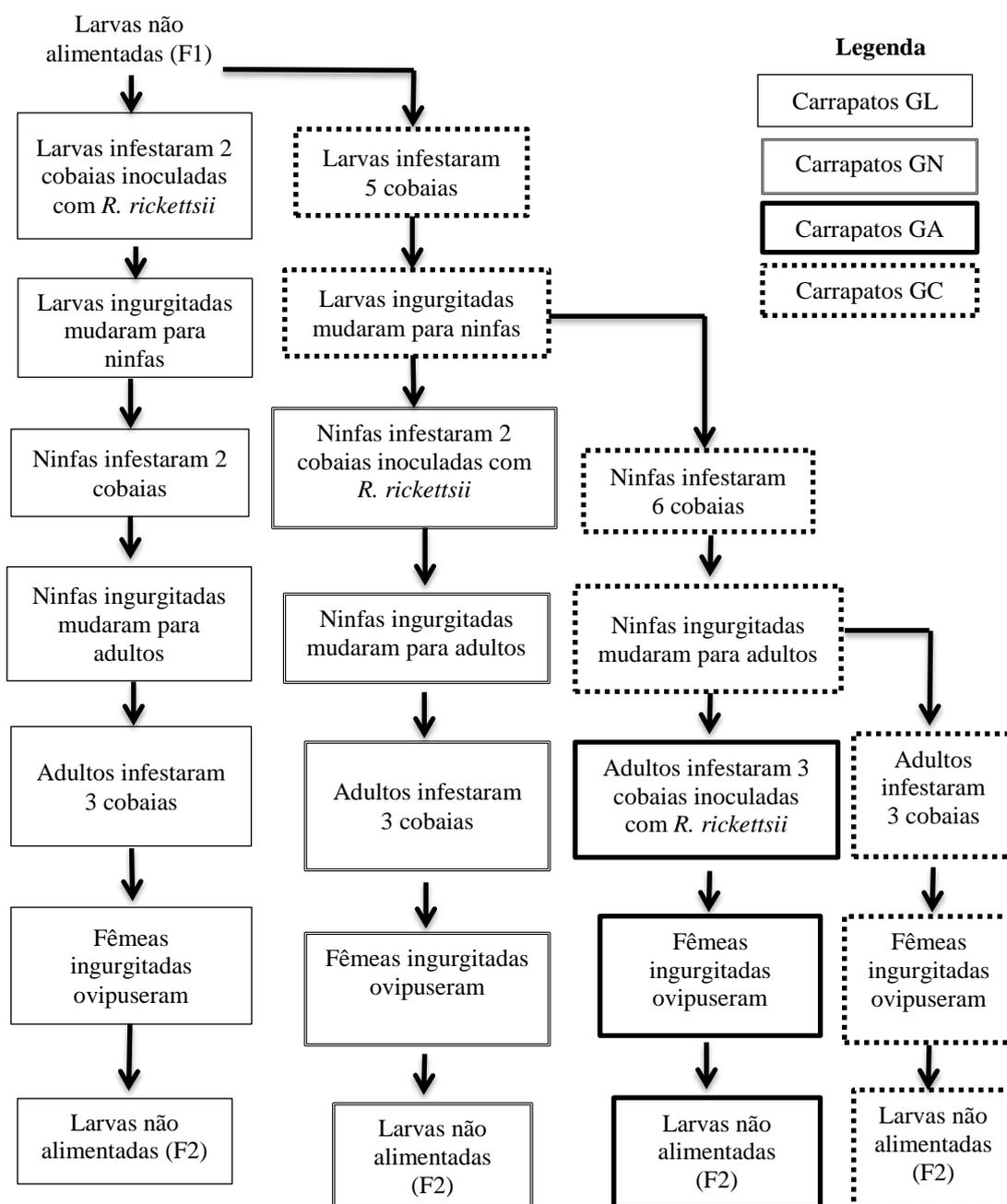


Figura 1. Diagrama ilustrando os procedimentos experimentais com *Amblyomma dubitatum*. Os carrapatos do grupo de larvas (GL), ninfas (GN) e adultos (GA) foram expostos a *Rickettsia rickettsii* Cepa Itu e Taiçu em animais infectados (cobaias). Os carrapatos do grupo controle (GC) foram alimentados em cobaias livres de infecção.

3.7 Alimentação das Larvas de *A. dubitatum*

As fêmeas ingurgitadas obtidas da capivara fizeram postura, e estas deram origem às larvas que foram utilizadas para dar início ao experimento.

Foram colocadas aproximadamente 1000 a 2500 larvas de *A. dubitatum* em cada cobaia, tanto as cobaias infectadas com *R. rickettsii* quanto as cobaias do Grupo Controle. As larvas estavam em jejum, com aproximadamente vinte a trinta dias de idade, e naturalmente infectadas com *R. bellii*.

3.7.1 Alimentação das larvas de *A. dubitatum* (GL) em cobaias infectadas experimentalmente com *R. rickettsii*

Para a etapa de alimentação das larvas de *A. dubitatum*, foram utilizadas duas cobaias infectadas com *R. rickettsii* cepa Itu e duas cobaias infectadas com a cepa Taiaçu. No mesmo dia em que as cobaias foram inoculadas intraperitonealmente com *R. rickettsii*, as larvas foram colocadas no interior de uma câmara de algodão colada ao dorso do animal (câmara de contenção) para evitar possíveis escapes. A técnica utilizada foi baseada em Pinter et al. (2002) com adaptações, originando o grupo de carrapatos infectados na fase de larva (GL).

3.7.2 Alimentação das larvas de *A. dubitatum* em cobaias não infectadas, originando o grupo controle

Foram utilizadas cinco cobaias para formar o Grupo Controle (GC). Estas cobaias não foram infectadas e estavam livres de patógenos. Este número de cobaias foi necessário, para que após a muda das larvas alimentadas, houvesse ninfas e adultos do GC suficientes, para serem utilizados na formação do grupo de carrapatos a serem infectados com *R. rickettsii* na fase de ninfas (GN) e na fase adulta (GA).

As larvas ingurgitadas foram recolhidas diariamente, colocadas em tubos com a extremidade vedada por tecidos para evitar escape e levadas para a estufa do tipo B.O.D.

3.8 Alimentação das Ninfas de *A. dubitatum* (Grupo GL e Grupo GC)

Após a muda das larvas da etapa anterior, foram obtidas as ninfas de *A. dubitatum*, do grupo GL e grupo GC.

Tanto para os carrapatos infectados com *R. rickettsii* quanto os do grupo controle, após a muda das larvas para ninfas, foram escolhidas aleatoriamente algumas ninfas, as quais foram submetidos à PCR e testadas individualmente. Foram testadas por PCR-GFM, quanto para PCR-*R. bellii*, para avaliar a transmissão transtadial.

Foram colocadas aproximadamente 250 ninfas de *A. dubitatum* em cada cobaia, tanto nas cobaias do grupo GL, quanto GN e GC, estas ninfas estavam em jejum, com aproximadamente vinte a trinta dias de idade, e naturalmente infectadas com *R. bellii*.

3.8.1 Alimentação das ninfas de *A. dubitatum* que foram infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas (GL) em cobaias não infectadas

As larvas de *A. dubitatum* (GL) que se alimentaram em cobaias infectadas com *R. rickettsii* tanto da Cepa Itu quanto Taiaçu, após mudarem para ninfas, foram colocadas no interior de uma câmara de algodão colada ao dorso do animal como descrito anteriormente. Estas cobaias utilizadas estavam livres de patógenos, justamente

para verificar se as ninfas infectadas com *R. rickettsii* na fase larvas, transmitiriam ou não a infecção as cobaias. Nesta etapa foram usadas duas cobaias livres de patógenos para alimentação das ninfas (GL) da Cepa Itu e duas cobaias livres de patógenos para alimentação das ninfas (GL) da Cepa Taiacu.

3.8.2 Alimentação das ninfas de *A. dubitatum* (GN) em cobaias infectadas experimentalmente com *R. rickettsii*

Foram utilizadas duas cobaias infectadas com *R. rickettsii* Cepa Itu e duas cobaias infectadas com a Cepa Taiacu. No mesmo dia em que as cobaias foram inoculadas intraperitonealmente com *R. rickettsii*, as ninfas do grupo GC foram colocadas no interior de uma câmara de algodão colada ao dorso do animal, originando o grupo de carrapatos infectados na fase de ninfa (GN).

3.8.3 Alimentação das ninfas de *A. dubitatum* em cobaias não infectadas, originando o grupo controle

Foram utilizadas seis cobaias para formar o Grupo Controle (GC). Estas cobaias não foram infectadas e estavam livres de patógenos. Este número de cobaias foi necessário, para que, após a muda das ninfas alimentadas, houvesse adultos do GC, para formar o grupo de carrapatos a serem infectados com *R. rickettsii* na fase adulta (GA).

As ninfas ingurgitadas foram recolhidas diariamente, e colocadas em tubos com a extremidade vedada por tecidos para evitar escape e levadas para a estufa do tipo B.O.D.

3.9 Alimentação dos Carrapatos Adultos de *A. dubitatum*

Após a muda das ninfas da etapa anterior, foram obtidos adultos de *A. dubitatum*, tanto dos grupos GL, GN e GC.

Tanto para os carrapatos infectados com *R. rickettsii* quanto os do grupo controle, após a muda das ninfas para carrapatos adultos, foram escolhidos aleatoriamente adultos não alimentados, que foram submetidos à PCR e testados individualmente, tanto para PCR-GFM, quanto para PCR-*R. bellii*, para avaliar a transmissão transtadial e selecionadas algumas amostras e submetidas ao sequenciamento de nucleotídeos.

Tanto as cobaias do grupo GL, quanto GN e GC, foram colocados aproximadamente 15 casais por cobaia, com a exceção do grupo GL da Cepa Itu, que foram utilizados 5 casais de *A. dubitatum* em cada cobaia, devido a baixa quantidade recuperada.

Estes carrapatos adultos estavam naturalmente infectados com *R. bellii*, e em jejum, com aproximadamente 20 a 30 dias de idade.

3.9.1 Alimentação dos carrapatos adultos de *A. dubitatum* que foram infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas (GL) em cobaias não infectadas

As larvas de *A. dubitatum* (GL) que se alimentaram em cobaias infectadas com *R. rickettsii* tanto da Cepa Itu quanto Taiacu, depois de mudarem para ninfas, foram alimentadas em cobaias livres de patógenos. Isto foi realizado para verificar se exemplares de *A. dubitatum* infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas, seriam capazes ou não de transmitir a infecção quando na fase adulta. Após a ecdise dessas

ninfas do grupo GL, os adultos de *A. dubitatum* do grupo GL foram alimentados da seguinte forma: três cobaias livres de patógenos para alimentação dos adultos (GL) da Cepa Itu e três cobaias livres de patógenos para alimentação dos adultos (GL) da Cepa Taiacu.

3.9.2 Alimentação dos carrapatos adultos de *A. dubitatum* que foram infectados com *R. rickettsii* na fase de ninfas (GN) em cobaias não infectadas

As ninfas de *A. dubitatum* (GN) que se alimentaram em cobaias infectadas com *R. rickettsii* tanto da Cepa Itu quanto Taiacu, após mudarem para adultos, foram alimentados da seguinte forma: três cobaias livres de patógenos para alimentação dos adultos (GN) da Cepa Itu e três cobaias livres de patógenos para alimentação dos adultos (GN) da Cepa Taiacu. Novamente isto foi necessário para verificar se *A. dubitatum* infectados com *R. rickettsii* na fase de ninfas, seriam capazes ou não de transmitir a infecção quando na fase adulta.

3.9.3 Alimentação dos carrapatos adultos de *A. dubitatum* (GA) em cobaias infectadas experimentalmente com *R. rickettsii*

Os carrapatos foram colocados nas cobaias livres de infecção e após 14 dias, as cobaias foram infectadas experimentalmente com *R. rickettsii*. Foram utilizadas três cobaias infectadas com *R. rickettsii* Cepa Itu e três cobaias infectadas com a Cepa Taiacu. A infecção dos hospedeiros não foi realizada no mesmo dia que os carrapatos foram colocados, porque os adultos levam muito tempo para se alimentar e a cobaia pode ir a óbito antes do término da alimentação. Assim, para obtenção do grupo de carrapatos infectados na fase adulta (GA) esses foram colocados antes da infecção do hospedeiro. Os carrapatos adultos utilizados nesta etapa foram oriundos do GC.

3.9.4 Alimentação dos carrapatos adultos de *A. dubitatum* em cobaias não infectadas, originando o grupo controle

Foram utilizadas três cobaias para formar o Grupo Controle (GC), estas cobaias não foram infectadas e estavam livres de patógenos.

Os carrapatos adultos foram recolhidos diariamente, e colocados em tubos com a extremidade vedada por tecidos para evitar escape e levadas para a estufa do tipo B.O.D., para acompanhamento da oviposição.

3.10 Verificação da Transmissão Transovariana dos Carrapatos que Foram Alimentados em Cobaias Infectadas com *R. rickettsii* e dos Carrapatos do Grupo Controle

Após o fim da postura dos carrapatos dos grupos GL, GN, GA e GC, estas quenóginas foram igualmente submetidas à PCR-GFM, quanto a PCR-*R. bellii* e aquelas que deram resultados positivos na PCR-GFM, tiveram suas posturas testadas com o mesmo primer, para verificar se houve transmissão transovariana.

3.11 Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) e Extração de DNA dos Tecidos das Cobaias

As cobaias que foram inoculadas intraperitonealmente com *R. rickettsii*, e as cobaias que foram infestadas com carrapatos infectados com *R. rickettsii* e do grupo controle, tiveram o soro sanguíneo coletado após o óbito, porém quando não houve óbito, o soro sanguíneo foi coletado depois de 21 dias ou mais. Os soros foram mantidos congelados.

Os soros foram retirados do freezer e colocados em ordem, seguindo a identificação de cada cobaia, e mantidos à temperatura ambiente até descongelar.

Os soros reativos na diluição 1:64 para qualquer espécie de *Rickettsia* foram testados em diluições seriadas (1:64, 1:128, 1:256, 1:512, 1:1024, 1:2048...) para determinação do título final de reatividade.

Os soros foram testados pela técnica de imunofluorescência indireta (RIFI) frente ao antígeno de *R. rickettsii* seguindo os protocolos propostos por HORTA et al. (2004, 2007), e também foram testados para *R. bellii*, visto que os carrapatos estavam naturalmente infectados.

Foram extraídos DNA dos fragmentos dos pulmões das cobaias que morreram da infecção, e que não foi possível coletar o soro sanguíneo, através de kit comercial DNEasy Tissue Kit. O DNA extraído foi testado por PCR convencional, utilizando-se PCR-GFM. Algumas amostras foram selecionadas e testadas por PCR-*R. bellii*.

3.12 Avaliação Clínica e Destino dos Animais

As cobaias utilizadas neste experimento foram criadas em biotérios, sem qualquer contato com carrapatos.

As cobaias foram avaliadas clinicamente todos os dias. A temperatura retal foi aferida por 21 dias ou mais e temperaturas acima de 39,5°C foram consideradas como estados febris. Foi observado se o animal desenvolveu lesões na área genital. Ao fim do experimento, foram eutanasiadas, e em seguida foram autoclavadas.

3.13 Análises Estatísticas

As proporções de carrapatos infectados com *R. rickettsii* entre os estágios de carrapatos ou entre carrapatos expostos a diferentes cepas de *R. rickettsii*, e as proporções de fêmeas ingurgitadas que ovipuseram com sucesso foram comparadas pelo Teste do Qui-quadrado. Os valores médios de peso das fêmeas ingurgitadas foram comparados entre os grupos pelo teste t- Student. As análises foram realizadas utilizando o programa MINITAB. As diferenças significativas foram consideradas para $P \leq 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 Testes Moleculares das Quenóginas de *A. dubitatum* Oriundas da Capivara

Para dar início ao experimento, todas as quenóginas oriundas da capivara foram testadas utilizando-se tanto PCR- *R. bellii*, quanto PCR-GFM. De fato, foi observado que 100% dos carrapatos estavam naturalmente infectados com *R. bellii*. A PCR-GFM demonstrou que todas as amostras estavam negativas.

4.2 Cobaias Inoculadas Intraperitonealmente (IP) com *R. rickettsii* do Grupo de Larvas (GL), Grupo de Ninfas (GN) e do Grupo de Carrapatos Adultos (GA) da Cepa Itu e Taiacu de *R. rickettsii*

Na Tabela 1 encontram-se os dados das cobaias que foram infectadas experimentalmente com *R. rickettsii* utilizando as duas Cepas Itu e Taiacu, a via de inoculação, período febril, lesão na área genital, óbito, título sorológico (RIFI) para *R. rickettsii* e *R. bellii*.

As cobaias que foram inoculadas intraperitonealmente com *R. rickettsii* dos grupos GL, GN e GA de ambas as cepas, todas as cobaias apresentaram febre e a maioria dos animais apresentaram lesão na área genital, assim como titulação positiva para *R. rickettsii* e *R. bellii*. Os animais que apresentaram resultados negativos na titulação sorológica para *R. rickettsii*, foram testados por PCR-GFM e todos apresentaram resultados positivos. Apenas uma cobaia inoculada não foi a óbito.

4.3 Alimentação em Cobaias dos Carrapatos que Foram Infectados com *R. rickettsii* na Fase de Larvas (GL), Ninfas (GN) e Adultos (GA) da Cepa Itu e Taiacu de *R. rickettsii*

Os carrapatos infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas (GL) das duas cepas, após mudarem para ninfas foram colocados em cobaias livres de patógenos, foram utilizadas duas cobaias para cada cepa, todas apresentaram febre, lesão na área genital, título sorológico positivo para ambas rickettsias, uma cobaia de cada cepa não foi a óbito.

As três cobaias que receberam carrapatos adultos infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas (GL) da cepa Itu, apresentaram febre, lesão na área genital, duas apresentaram título sorológico positivo para ambas rickettsias, uma das cobaias não apresentou título sorológico positivo, porém na PCR-GFM foi positiva e todas foram a óbito. Em relação à cepa Taiacu, duas cobaias não apresentaram sintomatologia e nem títulos sorológicos positivos e apenas uma cobaia deste grupo apresentou febre, lesão na área genital, título sorológico positivo para ambas rickettsias, e foi a óbito.

As três cobaias que receberam carrapatos adultos infectados com *R. rickettsii* na fase de ninfas (GN) da cepa Itu, todas apresentaram febre, e apenas uma apresentou lesão na área genital, PCR-GFM positiva e foi a óbito, as outras duas não apresentaram lesão e não foram a óbito, porém apresentaram titulação sorológica positiva para rickettsias. Em relação à cepa Taiacu, todas apresentaram febre, apenas uma cobaia não apresentou lesão na área genital e apenas uma foi a óbito, todas apresentaram titulação sorológica positiva para *R. rickettsii*.

Tabela 1. Dados das cobaias infectadas experimentalmente com inóculo de *Rickettsia rickettsii* Cepa Itu e Taiacu e das cobaias infestadas com *Amblyomma dubitatum* infectados, via de inoculação, período febril, lesão na área genital, óbito, título sorológico para *R.rickettsii* e *Rickettsia bellii*.

	Cepa Itu							Cepa Taiacu						
	N° Cobaia	Via de inoculação	Período febril (dia)	Lesão na área genital (dia)	Óbito (dia)	Título sorológico <i>R.rickettsii</i> *	Título sorológico <i>R.bellii</i> *	N° Cobaia	Via de inoculação	Período febril (dia)	Lesão na área genital (dia)	Óbito (dia)	Título sorológico <i>R.rickettsii</i> *	Título sorológico <i>R.bellii</i> *
GL	1	IP	3-9°	8°	11°	2.048	64	1	IP	3-8°	8°	10°	2.048	<64
	2	IP	3-7	7°	9°	1.024	<64	2	IP	3-11°	11°	não	32.768	256
	3	carrapato (ninf)	8-12°	16°	não	16.384	4.096	3	carrapato (ninf)	6-13°	12°	não	8.192	256
	4	carrapato (ninf)	7-11°	11°	14°	1.024	<64	4	carrapato (ninf)	7-13°	12°	15°	512	<64
	5	carrapato (adulto)	8-13°	13°	19°	8.192	2.048	5	carrapato (adulto)	não	não	não	<64	<64
	6	carrapato (adulto)	9-12°	13°	17°	2.048	<64	6	carrapato (adulto)	10-12°	13°	13°	128	<64
	7	carrapato (adulto)	14-17°	18°	18°	<64	<64	7	carrapato (adulto)	não	não	não	<64	<64
GN	8	IP	4-8°	9°	10°	256	64	8	IP	4-9°	9°	11°	512	64
	9	IP	5-7°	não	8°	<64	<64	9	IP	4-8°	10°	11°	256	128
	10	carrapato (adulto)	10-13°	não	não	16.384	16.384	10	carrapato (adulto)	18-22°	22°	26°	128	<64
	11	carrapato (adulto)	12-14°	15°	17°	<64	<64	11	carrapato (adulto)	8-11°	13°	não	1.024	512
	12	carrapato (adulto)	11°	não	não	512	<64	12	carrapato (adulto)	10-12°	não	não	8.192	8.192
GA	13	IP	3-4°	não	7°	**	**	13	IP	4-8°	não	11°	1.024	128
	14	IP	4-7°	não	9°	**	**	14	IP	4-8°	8°	10°	64	<64
	15	IP	4-6°	não	8°	<64	<64	15	IP	4-8°	não	11°	64	<64

* O sangue das cobaias foi coletado para sorologia no dia da morte, ou 21 dias após a inoculação IP ou infestação com carrapatos infectados com *R. rickettsii*

** Não foi possível coletar o soro sanguíneo. Foi coletado fragmento de pulmão e submetido a PCR-GFM

IP- inoculação intraperitoneal

Três carrapatos adultos positivos na PCR-GFM foram selecionados para o sequenciamento dos nucleotídeos e apresentaram resultados 100% similares para as sequências correspondentes no Gen Bank para *R. rickettsii* (acesso n° CP 003305), estes mesmos carrapatos também foram testados na PCR com primer específico para *R. bellii* apresentaram resultados positivos e foram enviados para o sequenciamento dos nucleotídeos e foram 100% similares para as sequências correspondentes no Gen Bank (acesso n° JQ 906786).

Todas as cobaias do grupo controle (GC) também foram observadas por 21 dias e não apresentaram febre, nem alterações, foi feita a titulação sorológica para *R. rickettsii* e *R. bellii*, porém nenhum dos animais apresentou resultados positivos.

Nas Figuras 2 a 5 encontram-se os valores da temperatura retal aferida por 21 dias ou mais, em cobaias que foram infectadas experimentalmente (intraperitonealmente-IP) com *R. rickettsii* cepa Itu e Taiacu, e das cobaias infestadas com carrapatos de *A. dubitatum* que foram infectados com *R. rickettsii*.

Na Figura 2, as cobaias infectadas experimentalmente (intraperitonealmente-IP) com *R. rickettsii* cepa Itu, apresentaram febre a partir do 3° dia. As cobaias que foram infestadas com ninfas (grupo GL) apresentaram febre a partir, do 7 e 8° dia. As cobaias que foram infestadas com carrapatos adultos (grupo GL) apresentaram febre a partir, do 8 e 9° dia, sendo que uma das cobaias apresentou o início da febre no 14° dia.

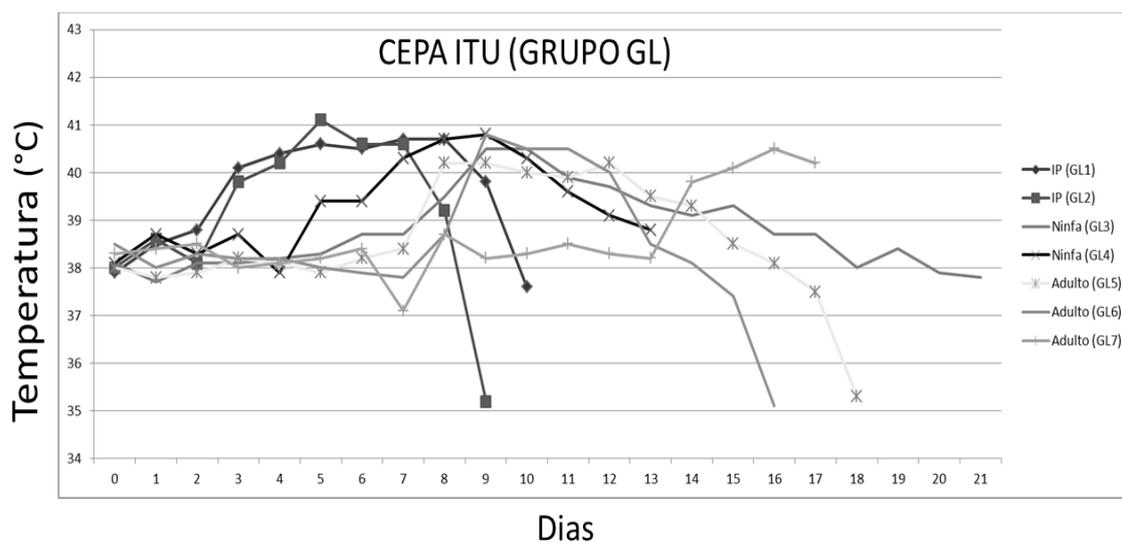


Figura 2. Valores da temperatura retal aferida em cobaias infectadas experimentalmente (intraperitonealmente-IP) com *R. rickettsii* cepa Itu, e das cobaias infestadas com ninfas e adultos de *A. dubitatum* que foram infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas (GL).

Na Figura 3, as cobaias infectadas experimentalmente com *R. rickettsii* cepa Taiacu, apresentaram febre a partir do 3° dia. Após o período febril, houve declínio de temperatura e óbito de apenas uma cobaia. As cobaias que foram infestadas com ninfas (grupo GL) apresentaram febre a partir, do 6 e 7° dia. As cobaias que foram infestadas com carrapatos adultos (grupo GL) apenas uma apresentou febre a partir do 10° dia, as outras duas cobaias não apresentaram febre.

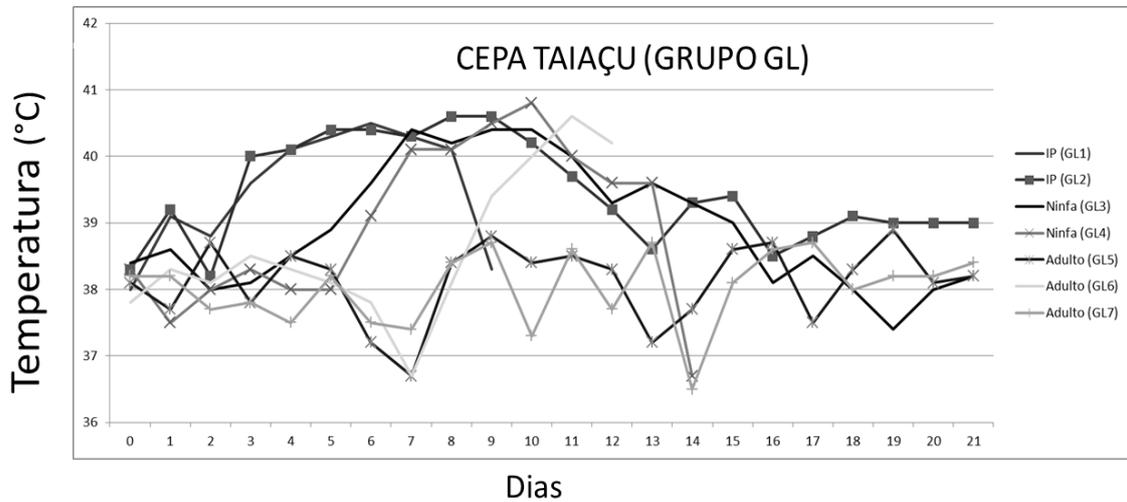


Figura 3. Valores da temperatura retal aferida em cobaias infectadas experimentalmente (intraperitonealmente-IP) com *R. rickettsii* cepa Taiaçú, e das cobaias infestadas com ninfas e adultos de *A. dubitatum* que foram infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas (GL).

Na Figura 4, as cobaias infectadas experimentalmente com *R. rickettsii* cepa Itu, apresentaram febre a partir do 4 e 5º dia. As cobaias que foram infestadas com adultos (grupo GN) apresentaram febre a partir, do 10 ao 12º dia.

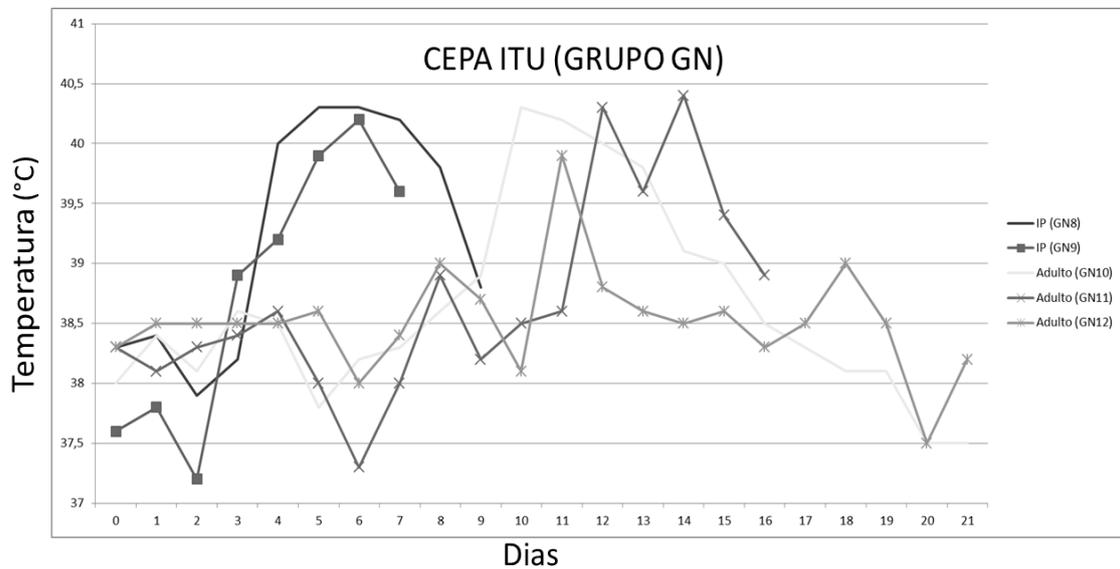


Figura 4. Valores da temperatura retal aferida em cobaias infectadas experimentalmente (intraperitonealmente-IP) com *R. rickettsii* cepa Itu, e das cobaias infestadas com adultos de *A. dubitatum* que foram infectados com *R. rickettsii* na fase de ninfas (GN).

Na Figura 5, as cobaias infectadas experimentalmente com *R. rickettsii* cepa Taiaçú, apresentaram febre a partir do 4º dia. As cobaias que foram infestadas com adultos (grupo

GN) apresentaram febre a partir, do 8 e 10º dia, porém uma das cobaias apresentou febre tardiamente no 18º dia.

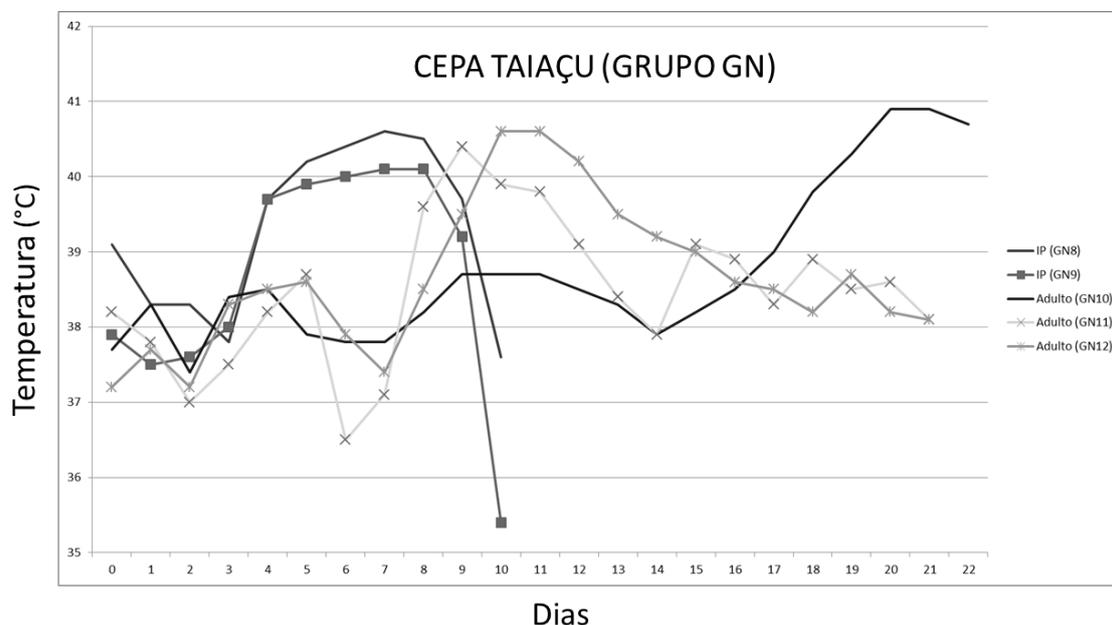


Figura 5. Valores da temperatura retal aferida em cobaias infectadas experimentalmente (intraperitonealmente-IP) com *R. rickettsii* cepa Taiiaçu, e das cobaias infestadas com adultos de *A. dubitatum* que foram infectados com *R. rickettsii* na fase de ninfas (GN).

Na Tabela 2 encontram-se carrapatos positivos em relação à carrapatos testados por PCR-GFM tanto da cepa Itu quanto Taiiaçu, obtidos de ninfas e adultos em jejum de *A. dubitatum* dos grupos GL e GN, assim como o GC.

As larvas que se alimentaram em cobaias infectadas experimentalmente com *R. rickettsii*, após a muda para ninfas foram testadas por PCR-GFM observou-se 23,33% de ninfas positivas da cepa Itu e 8,33% positivas da cepa Taiiaçu, diferindo significativamente (Tabela 2). Em relação aos adultos do grupo GL observou-se 45,45% de adultos positivos da cepa Itu e 5,26% positivos da cepa Taiiaçu, diferindo significativamente.

As ninfas que se alimentaram em cobaias infectadas experimentalmente com *R. rickettsii*, após a muda para adultos foram testadas por PCR-GFM, onde observou-se 50% de adultos positivos da cepa Itu e 24,24% positivos da cepa Taiiaçu, diferindo significativamente entre as cepas.

Estes resultados indicam que apenas uma parte dos carrapatos dos grupos GL e GN foram capazes de manter a infecção por rickettsias, para os estágios subsequentes do carrapato por transmissão transtestadial, após serem expostos a *R. rickettsii*.

Foram selecionadas algumas ninfas e adultos dos grupos GC e testadas por PCR-GFM, porém nenhuma amostra deu resultado positivo, o que já era esperado.

Tabela 2. Dados das ninfas e adultos em jejum de *Amblyomma dubitatum* dos grupos GL,GN e GC testados por PCR-GFM tanto da Cepas Itu quanto Taiapu.

Grupos de carrapatos		<i>R. rickettsii</i> cepa Itu	<i>R. rickettsii</i> cepa Taiapu
		Nº carrapatos positivos/ Nº carrapatos testados	Nº carrapatos positivos/ Nº carrapatos testados
GL	Ninfas	14/60 (23,33%) ^a	5/60 (8,33%) ^b
	Adultos	20/44 (45,45%) ^a	2/38 (5,26%) ^b
GN	Adultos	17/34 (50%) ^a	8/33 (24,24%) ^b
GC	Ninfas	0/44 (0)	
	Adultos	0/22 (0)	

Letras minúsculas iguais na mesma linha não diferem entre si com $P \leq 0,05$.

GL – grupos de larvas; GN – grupos de ninfas; GC – grupos controle.

Na Tabela 3 encontram-se o peso de ingurgitamento, sucesso da oviposição, e infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa (GFM) (determinado por um PCR específico do GFM) em fêmeas ingurgitadas de *A. dubitatum*. Grupos GL, GN, e GA consistiam de fêmeas ingurgitadas que foram inicialmente expostas a *R. rickettsii* durante o estágio de larvas, ninfas, e adultos, respectivamente.

As fêmeas ingurgitadas que foram expostas a cepa Itu tenderam a ganhar mais peso do que as fêmeas expostas a cepa Taiapu, apesar de que suas diferenças não foram estatisticamente significativas. Por outro lado, as fêmeas ingurgitadas do grupo GC, nunca expostas a *R. rickettsii*, apresentaram os maiores ganhos de peso, que foram significativamente maior do que os pesos das fêmeas ingurgitadas expostas a cepa Itu ou Taiapu.

As quenóginas do grupo GL que foram testadas por PCR-GFM, observou-se que 60% das quenóginas positivas para a cepa Itu e 37,04% positivas para a cepa Taiapu, não diferindo significativamente.

As quenóginas do grupo GN foram testadas por PCR-GFM e observou-se 57,14% das quenóginas positivas para a cepa Itu e 64,28% positivas para a cepa Taiapu, não diferindo significativamente.

Os adultos que se alimentaram em cobaias infectadas experimentalmente com *R. rickettsii* (grupo GA), após a postura foram testadas com por PCR-GFM, onde observou-se 42,1% de quenóginas positivas da cepa Itu e 83,33% positivas da cepa Taiapu, não diferindo significativamente.

Todas as fêmeas ingurgitadas foram testadas pela PCR-GFM no final da oviposição, a fim de verificar se eles foram infectados pela rickettsias do GFM. No geral, 37,04-83,33% das fêmeas ingurgitadas dos carrapatos dos grupos GL, GN, e GA foram infectadas pelas rickettsias do GFM no final de oviposição, ou em 30 dias após o desprendimento do hospedeiro (para as fêmeas que não realizaram postura). Os ovos provenientes das fêmeas ingurgitadas foram testados por PCR para verificar a infecção por rickettsias. Das 19 fêmeas infectadas com a cepa Itu, e 38 infectadas com a cepa Taiapu, todos os ovos foram negativos pela PCR- GFM, com exceção de uma única fêmea ingurgitada GN previamente expostas a

Tabela 3. Peso de ingurgitamento, sucesso da oviposição, e infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa (GFM) (determinado por um PCR específico do GFM) em fêmeas ingurgitadas *Amblyomma dubitatum*. Grupos GL, GN, e GA consistiam de fêmeas ingurgitadas que foram inicialmente expostas a *Rickettsia rickettsii* durante o estágio de larvas, ninfas, e adultos, respectivamente.

Grupo de carrapatos	Peso das fêmeas ingurgitadas (mg)*		N° fêmeas positivas na PCR ⁺ /N° fêmeas ingurgitadas recuperadas (%)		N° fêmeas que oviporam/N° fêmeas positivas na PCR (%) ⁺		N° fêmeas que oviporam /N° fêmeas negativas na PCR (%) ⁺	
	Cepa Itu	Cepa Taiacu	Cepa Itu	Cepa Taiacu	Cepa Itu	Cepa Taiacu	Cepa Itu	Cepa Taiacu
GL	223,8 ± 119,7 (74-372)	213,2 ± 122,1 (28-423)	3/5 (60%)	10/27 (37,04%)	1/3	4/10	2/2	7/17
GN	229,0 ± 103,9 (68-396)	231,4 ± 133,0 (29-505)	8/14 (57,14%)	18/28 (64,28%)	3/8	3/18	4/6	5/10
GA	214,2 ± 107,9 (111-462)	153,2 ± 133,3 (20-464)	8/19 (42,1%)	10/12 (83,33%)	5/8	2/10	9/11	0/2
Total	221,0 ± 105,2 (68-462) ^a	209,8 ± 129,8 (20-505) ^a	19/38 (50,0%)	38/67 (56,7%)	9/19 (47,4%)	9/38 (23,7%)	15/19 (78,9%)	12/29 (41,4%)
GC	292,7 ± 129,4 (77-552) ^b		0/22 (0)				17/22 (77,3%)	

*Os valores estão apresentados como média ± erro padrão (intervalo); valores médios seguidos por letras diferentes são significativamente diferentes ($P \leq 0,05$).

+ Fêmeas ingurgitadas foram testadas por PCR-GFM no final da oviposição ou 30 dias depois do desprendimento do hospedeiro

cepa Taiacu. Este resultado indica que a transmissão transovariana de *R. rickettsii* praticamente não ocorre, exceto numa única fêmea.

Todos os carrapatos que foram testados por PCR-GFM, tanto ninfas, adultos e quenóginas dos grupos GL, GN, GA e amostras do GC foram testadas por PCR com primer específico para *R. bellii*, onde observou-se que 100% dos carrapatos apresentaram resultados positivos.

Estes resultados indicam que 100% dos *A. dubitatum*, independentemente de terem adquirido a infecção por *R. rickettsii*, permaneceram infectados com *R. bellii*. Todas as cobaias infectadas com carrapatos do GC (infectados apenas com *R. bellii*) foram soronegativas para *R. bellii*, aos 21 dias após a infestação com carrapatos, enquanto que cobaias expostas a carrapatos infectados com *R. rickettsii* dos grupos (GL, GN, GA) apresentaram títulos finais para *R. bellii* geralmente muito menores do que os títulos finais para *R. rickettsii*. Todas as amostras testadas, de DNA de pulmão de cobaias, foram negativas pela PCR- *R. bellii*.

5 DISCUSSÃO

5.1 Cobaias Infectadas Experimentalmente com *R. rickettsii*

Na Tabela 1, ao compararmos as cobaias dos grupos GL, GN e GA que foram inoculadas intraperitonealmente (IP) de ambas as cepas, todas desenvolveram a infecção por *R. rickettsii*, apenas um animal não foi a óbito.

Ao observarmos, a titulação sorológica das cobaias infectadas experimentalmente com *R. rickettsii* verificamos que a maioria delas apresentaram resultados positivos na titulação maiores para *R. rickettsii* do que para *R. bellii*. Ao compararmos com o grupo controle, este grupo não apresentou titulação positiva para nenhuma das rickettsias.

Foram selecionadas duas cobaias que apresentaram resultados positivos na titulação para ambas rickettsias, e foi feita a extração de DNA dos tecidos como pulmão, baço e fígado e foi feita PCR-GFM e primer específico para *R. bellii*, apresentaram resultados positivos na PCR-GFM, o que já era esperado pois foram infectadas experimentalmente com *R. rickettsii*, porém resultados negativos ao utilizar o primer para *R. bellii*. Ao analisarmos os dados da PCR, concluímos que provavelmente ocorra a reação cruzada entre *R. rickettsii* e *R. bellii*, pois são frequentemente observadas tornando difícil a identificação sorológica das espécies de rickettsias envolvidas numa infecção.

5.2 Cobaias Infestadas com Carrapatos do Grupo GL

As ninfas que foram infectadas com *R. rickettsii* na fase de larvas (grupo GL), ao se alimentarem em cobaias livres de infecção foram capazes de transmitir a infecção, tanto as ninfas da cepa Itu quanto Taiapu. Uma cobaia de cada cepa não foi a óbito, porém desenvolveu sintomatologia clínica, e apresentaram os títulos sorológicos mais altos do que os animais, que foram a óbito o que já era esperado, porque houve uma produção maior de anticorpos. Soares et al. (2012) também demonstraram que ninfas de *A. sculptum* (citadas como *A. cajennense*) infectadas com *R. rickettsii* na fase de larvas, foram capazes de transmitir a bactéria para as cobaias infestadas. Resultados semelhantes foram obtidos por Horta et al. (2009) ao infectar larvas desta espécie que se alimentaram em gambás infectados com *R. rickettsii*, e posteriormente as ninfas foram alimentadas em coelhos transmitindo a infecção.

Os adultos infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas (grupo GL) da cepa Itu, ao se alimentarem em cobaias livres de infecção foram capazes de transmitir a infecção e todos foram a óbito e desenvolveram sintomatologia clínica. Resultados similares foram relatados por Soares et al. (2012) ao trabalharem com adultos de *A. sculptum* (citados como *A. cajennense*) infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas, observaram que carrapatos adultos foram capazes de transmitir a bactéria para os coelhos infestados. Piranda et al. (2008) trabalharam com adultos de *A. aureolatum* infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas, observaram que carrapatos adultos foram capazes de transmitir a bactéria para os cães infestados. Ao observarmos as cobaias nas quais foram colocados carrapatos adultos da cepa Taiapu, verificamos que apenas uma cobaia apresentou a doença, os outros dois animais não apresentaram febre, sintomas clínicos e nem titulação para rickettsias, provavelmente devido ao baixo número de carrapatos infectados.

5.3 Cobaias Infestadas com Carrapatos do Grupo GN

Os adultos infectados com *R. rickettsii* na fase de ninfas (grupo GN) tanto da cepa Itu quanto Taiacu, ao se alimentarem em cobaias livres de infecção foram capazes de transmitir a infecção, porém apenas uma cobaia de cada cepa foi a óbito. A cobaia que foi a óbito da cepa Taiacu, apresentou febre e foi a óbito tardiamente, provavelmente pelo fato dos carrapatos terem demorado a se fixar, visto que o estágio adulto do carrapato tem predileção por outros hospedeiros. Soares et al. (2012) obtiveram resultados semelhantes ao trabalharem com carrapatos infectados na fase de ninfas (GN), foram capazes quando adultos de transmitir a *R. rickettsii* para coelhos, assim como Horta et al. (2009) demonstraram que ninfas alimentadas em gambás infectados com *R. rickettsii*, após mudarem para adultos foram capazes de transmitir a infecção para coelhos.

5.4 Aferição da Temperatura Retal das Cobaias Infectadas Experimentalmente com *R. rickettsii* e das Cobaias Infestadas com Carrapatos

Ao analisarmos as aferições da temperatura retal das cobaias, nas Figuras 2, 3, 4 e 5, observamos que as cobaias que foram inoculadas intraperitonealmente com *R. rickettsii* cepa Itu e Taiacu, apresentaram febre, mais cedo do que as que adquiriram a infecção através do carrapato e que manifestaram febre. O que já era esperado, pois o inóculo desencadeia a infecção por *R. rickettsii* mais rapidamente, do que através de carrapatos infectados. As cobaias que receberam carrapatos adultos infectados apresentaram febre mais tardiamente em relação as que receberam as ninfas, provavelmente pelo fato, dos carrapatos adultos demorarem mais tempo para se fixarem nas cobaias. Soares et al. (2012) também observaram que cobaias inoculadas com *R. rickettsii* desencadearam a febre mais cedo, do que as que adquiriram a infecção através do carrapato *A. sculptum* (citado como *A. cajennense*).

5.5 Carrapatos Positivos na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

O presente estudo mostra que larvas, ninfas e adultos de *A. dubitatum* foram menos suscetíveis à infecção por *R. rickettsii* já que em todos os casos, apenas uma parte dos carrapatos mantiveram a infecção pela perpetuação transestadial, após serem expostos a animais na fase de rickettsemia.

A quantidade de ninfas positivas na PCR- GFM do grupo GL (Tabela 2) foram próximas as obtidas por Labruna et al. (2008) ao trabalharem com ninfas de *A. sculptum* (citadas como *A. cajennense*) (oriundos da Colônia de Pedreira) que foram infectadas com *R. rickettsii* na fase de larvas em cobaias, encontraram o percentual de carrapatos infectados em torno 5 a 25%. Porém neste mesmo trabalho, ao compararmos com *A. sculptum* (oriundos da Colônia de Pirassununga) observamos percentuais variando de 0 a 60%. Aqueles autores também trabalharam com *R. sanguineus* (oriundos da Colônia Cabreúva) obtendo percentuais de infecção variando de 90 a 100% e para *A. aureolatum* (oriundos da Colônia Atibaia) foram observados percentuais de infecção de 100% diferindo dos resultados obtidos. Freitas et al. (2009) ao trabalharem com ninfas *H. leporispalustris* que também foram infectadas na fase de larvas, encontraram o percentual de 8% de ninfas positivas, estes resultados foram próximos aos encontrados para a cepa Taiacu.

Ao compararmos, os carrapatos adultos não ingurgitados positivos na PCR- GFM do grupo GL, com outros autores, verificamos resultados intermediários entre a cepa Itu e Taiacu. Soares et al. (2012) ao trabalharem com carrapatos (*A. sculptum* citado como *A. cajennense*) infectados na fase de larvas com *R. rickettsii*, observaram 16% positivos e Freitas et al. (2009) ao observarem adultos de *H. leporispalustris* infectados com *R. rickettsii* na fase de larvas, observaram 22,5% positivos.

A quantidade de carrapatos adultos positivos na PCR- GFM não ingurgitados do grupo GN, foram inferiores aos obtidos por Soares et al. (2012) que observaram 62,2% de adultos de *A. sculptum* (citados como *A. cajennense*) positivos do grupo GN. Porém, Souza et al. (2009) observaram resultados intermediários, 30 a 35% de adultos da mesma espécie infectados do grupo GN ao trabalharem com capivaras infectadas com *R. rickettsii*.

De fato, uma diferença importante entre este estudo e os outros, é que os carrapatos *A. dubitatum* foram originalmente infectadas por *R. bellii*, e mesmo nestas circunstâncias, alguns deles adquiriu e manteve a infecção por *R. rickettsii* através de transmissão transestadial.

A infecção natural por duas ou mais espécies de *Rickettsias* em um único carrapato tem sido relatado na literatura, incluindo *R. bellii* e *R. parkeri* infectando um *Amblyomma ovale* (Koch, 1844) (SZABÓ et al., 2013), e uma tripla infecção por *R. bellii*, *Rickettsia montanensis* e *R. rickettsii* em um *D. variabilis* (CARMICHAEL; FUERST, 2010).

Ao compararmos a porcentagem de ninfas e adultos em jejum infectados com *R. rickettsii* dos grupos GL e GN da cepa Itu e Taiacu, observamos que houve diferença significativa entre as duas cepas. E que a cepa Itu, apresentou resultados superiores de carrapatos infectados, tanto ninfas quanto adultos. Os carrapatos infectados com a cepa Itu, apresentaram resultados superiores de infecção possivelmente pelo fato, de terem sido isolados de *A. sculptum* em uma área que havia capivaras. Provavelmente a cepa Itu deve estar mais adaptada à *A. sculptum* e também a *A. dubitatum*, pois ambas as espécies de carrapatos utilizam o mesmo animal como hospedeiro.

Na Tabela 3, ao compararmos a porcentagem de quenóginas de *A. dubitatum* positivas na PCR- GFM, da cepa Itu e Taiacu dos grupos GL, GN e GA, não apresentaram diferenças significativas entre as cepas. As taxas de infecção das quenóginas de *A. dubitatum* dos grupos GL e GN foram altas ao compararmos as duas cepas, provavelmente pelo fato do carrapato adulto ter ficado fixado por muito tempo. As taxas de infecção das quenóginas de *A. dubitatum* do grupo GA também foram altas. Soares et al. (2012) obtiveram resultados de quenóginas de *A. sculptum* (citadas como *A. cajennense*) positivas para *R. rickettsii* próximas ao presente estudo.

Fêmeas ingurgitadas de *A. dubitatum*, infectadas pela cepa Itu ou Taiacu de *R. rickettsii*, tiveram ganhos de pesos significativamente inferior as teleóginas livres de *R. rickettsii* (Tabela 3). Resultados semelhantes foram relatados para *A. aureolatum* e *A. sculptum* (citada como *A. cajennense*), uma vez que as teleóginas infectadas por *R. rickettsii* de ambas as espécies, apresentaram ganhos de pesos significativamente inferior, quando comparado com as fêmeas não infectadas (LABRUNA et al., 2011; SOARES et al., 2012). Os baixos ganhos de pesos das fêmeas ingurgitadas infectadas por *R. rickettsii*, também afetaram as proporções de fêmeas que ovipuseram.

No presente estudo, verificamos que entre as fêmeas ingurgitadas de *A. dubitatum* que ovipuseram, todas as massas de ovos foram testadas por PCR- *R. bellii*, ocorrendo 100% infecção para *R. bellii*, indicando a transmissão transovariana eficiente desta rickettsia, assim como foi observado nas fêmeas coletadas da capivara e usadas para iniciar o presente estudo. Por outro lado, não foi observada transmissão transovariana eficiente da *R. rickettsii* em carrapatos *A. dubitatum*, uma vez que nenhuma das fêmeas infectadas com a cepa Itu colocaram ovos infectados, e entre as 38 fêmeas infectadas com a cepa Taiacu, apenas uma apresentou massa de ovos positiva pela PCR-GFM. Tem sido relatado que uma infecção primária por uma espécie de rickettsia impediria a transmissão transovariana de uma segunda espécie de rickettsia (MACALUSO et al., 2002). Então, é provável que a ineficácia de *A. dubitatum* para perpetuar *R. rickettsii* por transmissão transovariana esteja relacionada à sua infecção primária por *R. bellii*; no entanto, também pode estar relacionada a fatores desconhecidos inerentes à *A. dubitatum*.

Ao observarmos o número de quenóginas positivas ao utilizar o PCR- GFM, verificamos que poucas quenóginas fizeram a postura, provavelmente pelo fato da cobaia não ser hospedeiro adequado para a manutenção da fase adulta.

Ao analisarmos o sequenciamento de nucleotídeos de *A. dubitatum* observamos que é possível que um único carrapato esteja infectado com *R. rickettsii* e *R. bellii*.

Todos os carrapatos que foram testados com o PCR- GFM, incluindo também os carrapatos do grupo controle e do grupo infectado com *R. rickettsii* foram igualmente testados com primer específico para *R. bellii*, onde observou-se que ocorre 100% de transmissão transtadial e transovariana de *R. bellii*. Resultados obtidos por Horta et al. (2006) observaram que *R. bellii* se manteve na população de *Ixodes loricatus* (Neumann, 1899) através de transmissão transtadial e transovariana, sugerindo assim um importante mecanismo de manutenção do agente na natureza.

Neste estudo 100% dos *A. dubitatum* estavam infectados com *R. bellii*, porém nenhuma cobaia do grupo GC tornou-se soropositivo para *R. bellii*. Estes resultados sugerem que *R. bellii* não foi transmitida por carrapatos às cobaias do GC.

6 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho tanto para cepa Itu e Taiacu de *R. rickettsii* permitem concluir que:

- 1) *Amblyomma dubitatum* infectados experimentalmente com *R. rickettsii* e naturalmente infectados com *R. bellii* na fase de larvas e ninfas, foram capazes de transmitir a infecção transtadialmente. Assim como, *A. dubitatum* infectados com *R. rickettsii* na fase adulta, foram capazes de adquirir a infecção;
- 2) *A. dubitatum* infectados experimentalmente com *R. rickettsii* e naturalmente infectados com *R. bellii* foram capazes de transmitir *R. rickettsii* às cobaias livres de infecção;
- 3) Ocorre baixa transmissão transovariana de *R. rickettsii*;
- 4) Ao compararmos a porcentagem de ninfas e adultos infectados com *R. rickettsii* dos grupos GL e GN da cepa Itu e Taiacu, notamos que a cepa Itu, apresentou resultados superiores de carrapatos infectados com *R. rickettsii*, tanto ninfas quanto adultos não ingurgitados.

Considerações finais

O presente estudo mostrou que *A. dubitatum* podem adquirir e manter por transmissão transtadial, e transmitir *R. rickettsii* a um hospedeiro suscetível. A relevância do *A. dubitatum* como um vetor de *R. rickettsii* para os seres humanos deve ser mínima, ou mais obscura que *A. sculptum*.

Por outro lado, *A. dubitatum* poderia desempenhar um papel importante como um vetor enzoótico de *R. rickettsii* entre capivaras. No entanto, é possível que só esta espécie de carrapato não seja capaz de sustentar uma infecção por *R. rickettsii* através de gerações consecutivas, devido à ineficácia da transmissão transovariana provocada por uma infecção primária por outra espécie de *Rickettsia*, ou por causa de fatores intrínsecos desconhecidos.

Infelizmente, durante a realização deste trabalho não foi possível obter uma colônia de *A. dubitatum* livre de *R. bellii*, porém estudos futuros são de grande importância, até mesmo para que haja uma comparação com este trabalho.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, A. T. S.; DAEMON, E.; FACCINI, J. L. H. Life cycle of female ticks *Amblyomma cooperi* Nuttal & Warbuton, 1908 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 53, n. 3, p. 316-320, 2001.
- ALMEIDA, A. P.; CUNHA, L. M.; BELLO, A. C. P. P.; CUNHA, A. P.; DOMINGUES, L. N.; LEITE, R. C.; LABRUNA, M. B. A novel *Rickettsia* infecting *Amblyomma dubitatum* ticks in Brazil. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 2, n. 4, p. 209-212, 2011.
- BEATI, L.; NAVA, S.; BURKMAN, E. J.; BATTESTI, D. M. B.; LABRUNA, M. B.; GUGLIELMONE, A. A.; CÁCERES, A. G.; GUZMÁN-CORNEJO, C. M.; LEÓN, R.; DURDEN, L. A.; FACCINI, J. L. H. *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae), the Cayenne tick: phylogeography and evidence for allopatric speciation. **BMC Evolutionary Biology**, v.13, n.267, p. 1-20, 2013.
- BUSTAMANTE, M. E.; VARELA, G. Distribucion de las rickettsias en Mexico. **Revista del Instituto de la Salub y Enfermidades Tropicales**, v. 8, p. 3-14, 1947.
- CARMICHAEL, J.R.; FUERST, P.A. Molecular detection of *Rickettsia bellii*, *Rickettsia montanensis*, and *Rickettsia rickettsii* in a *Dermacentor variabilis* tick from nature. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.10, n. 2, p. 111–115, 2010
- DEBÁRBORA, V. N.; MANGOLD, A. J.; OSCHEROV, E. B.; GUGLIELMONE, A. A.; NAVA, S. Study of the cycle of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) based on field and laboratory data. **Experimental and Applied Acarology**, v. 63, n. 1, p. 93-105, 2014.
- DEMMA, L. J.; TRAEGER, M. S.; NICHOLSON, W. L.; PADDOCK, C. D.; BLAU, D. M.; EREMEEVA, M. E.; DASCH, G. A.; LEVIN, M. L.; SINGLETON JR, J.; ZAKI, S. R.; CHEEK, J. E.; SWERDLOW, D. L.; MCQUISTON, J. H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. **New England Journal Medicine**, v. 353, p. 587-594, 2005.
- DIAS, E.; MARTINS, A. V. Spotted fever in Brazil. **American Journal of Tropical Medicine**, v. 19, p. 103-108, 1939.
- EREMEEVA, M. E.; BOSSERMAN, E. A.; DEMMA, L. J.; ZAMBRANO, M. L.; BLAU, D. M.; DASCH, G. A. Isolation and identification of *Rickettsia massiliae* from *Rhipicephalus sanguineus* ticks collected in Arizona. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n. 8, p. 5569–5577, 2006.
- ESTRADA, D. A.; SCHUMAKER, T. T. S.; SOUZA, C. E.; NETO, E. J. R.; LINHARES, A. X. Detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) coletados em parque urbano do município de Campinas, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, n.1, p. 68-71, 2006.
- FACCINI, J. L. H.; CHACON, S. C.; LABRUNA, M.B. Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) as experimental hosts for *Amblyomma dubitatum* Neumann (Acari: Ixodidae). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p. 1236-1239, 2006.

FREITAS, L. T. H.; FACCINI, J. L. H.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris*, with the bacterium *Rickettsia rickettsia*, and comparative biology of infected and uninfected tick lineages. **Experimental and Applied Acarology**, v.47, n. 4, p. 321-345, 2009.

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

GALVÃO, M. A.; CALIC, S. B.; CHAMONE, C. B.; MAFRA, C. L. CESARINO FILHO, G.; OLANO, J. P.; WALKER, D. H. Spotted fever rickettsiosis in Coronel Fabriciano, Minas Gerais State. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p. 479-481, 2003.

GILFORD, J. H.; PRICE, W. H. Virulent-avirulent conversions of *Rickettsia rickettsii* in vitro. **Biochemistry**, v. 41, p. 870-873, 1955.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PRATA, M. C.; PACHECO, R. C.; WALKER, D. H.; LABRUNA, M. B. Detection of *Rickettsia rickettsia* 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.

GUEDES, E.; LEITE, R. C. Dinâmica sazonal de estádios de vida livre de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* (ACARI: IXODIDAE) numa área endêmica para febre maculosa, na região de Coronel Pacheco, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.17, s. 1, p. 78-82, 2008.

GUEDES, E.; LEITE, R. C.; PACHECO, R. C.; SILVEIRA, I.; LABRUNA, M. B. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma* ticks from an area endemic for Brazilian spotted fever in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 20, n. 4, p. 308-311, 2011.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de Importância Veterinária**. São Paulo: Plêiade Ltda M.E./FAPESP. 2001, 218p.

HAYES, S. F.; BURGDORFER, W. Reactivation of *Rickettsia rickettsii* in *Dermacentor andersoni* ticks: an ultrastructural analysis. **Infection and Immunity**, v. 37, n. 2, p. 779-785, 1982.

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

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

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

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

KATAVOLOS, P.; ARMSTRONG, P. M.; DAWSON, J. E.; TELFORD, S. R. Duration of tick attachment required for transmission of Granulocytic Ehrlichiosis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 177, p. 1422-1425, 1998.

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

LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J.W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S.M.; WALKER, D.H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology**, v.42, n.1, p.90-98, 2004.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; ATALIBA, A. C.; SZABÓ, M. P. J. Human parasitism by the capybara tick *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). **Entomological News**, v. 118, n. 1, p. 77-80, 2007a.

LABRUNA, M. B.; PACHECO, R. C.; RICHTZENHAIN, L. J.; SZABÓ, M. P. J. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 3, p. 869-873, 2007b.

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

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

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

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. L. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches diagnosis of old and new Rickettsial Diseases. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 35, n. 11, p. 2715-2727, 1997.

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, 1996.

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.

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

MERHEJ, V.; RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics. **Biology review**, v. 86, n. 2, p. 379-405, 2011.

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

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; LABRUNA, M. B.; MASTROPAOLO, M.; GONZALEZ, E. M.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. Hosts, distribution and genetic divergence (16S rDNA) of *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae). **Experimental Applied Acarology**, v. 51, n. 4, p. 335-351, 2010.

ONOFRIO, V. C. **Revisão do gênero *Amblyomma* Koch, 1844 no Brasil**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

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

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

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, n. 6, p. 897-928, 2001.

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

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

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, n. 1, p. 79-88, 2002.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Isolation of *Rickettsia rickettsia* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of New York Academy of Sciences**, v. 1078, p. 523-529, 2006.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n.7, p.696-701, 2008.

PIZA, J. T. Considerações epidemiológicas e clínicas sobre o Tifo Exantemático de São Paulo. São Paulo. **Sociedade Imprensa Paulista**, p. 11-119, 1932.

QUADROS, R. M.; LAVINA, M. S.; MARQUES; S. M. T.; FRANÇA, M.; VERONEZI, W. R.; JÚNIOR, J. A. C. *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum* in capybaras run over on highways in Santa Catarina State, Brazil. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 8, n. 3, p. 176-179, 2013.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as Paradigms of New or Emerging Infectious Diseases. **Clinical Microbiology Reviews**, v.10, n. 4, p. 694-719, 1997.

RICKETTS, H. T. Some aspects of Rock Mountain Spotted Fever as shown by recent investigations. **Medical Record**, v.76, p. 843-855, 1909.

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

ROZENTAL, T.; BUSTAMANTE, M. C.; AMORIM, M.; SERRA-FREIRE, N. M.; LEMOS, E. R. Evidence of spotted fever group rickettsiae in state of Rio de Janeiro, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n.3, p. 155-158, 2002.

SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Diseases**, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.

SERRA-FREIRE, N. M.; SENA, L. M. M.; BORSOI, A. B. P. Parasitismo humano por carrapatos na mata atlântica, Rio de Janeiro, Brasil. **Entomobrasilis**, v. 4, n. 2, p. 67-72, 2011.

SEXTON, D. J.; MUNIZ, M.; COREY, G. R.; BREITSCHWERDT, E. B.; HEGARTY, B.C.; DUMLER, S.; WALKER, D. H.; PECANHA, P. M.; DIETZE, R. Brazilian spotted fever in Espírito Santo, Brazil: description of a focus of infection in a new endemic region. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 49, n.2, p. 222-226, 1993.

SHAW, S. E; BIRTLES, R. J; DAY, M. J. Arthropod-transmitted infectious diseases of cats. **Journal of Feline Medicine and Surgery**, v. 3, n. 4, p.193-209, 2001.

SOARES, J. F.; SOARES, H. S.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26, n. 2, p. 139-151, 2012.

SOUZA, S. S. A. L.; SOUZA, C. E.; RODRIGUES NETO, E. J.; PRADO, A. P. Dinâmica sazonal de carrapatos (Acari: Ixodidae) na mata ciliar de uma área endêmica para febre maculosa na região de Campinas, São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 3, p. 887-891, 2006.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALKA, M.; UCHOA, F.C.; HORTA, M.C.; SOUZA, S. S. L.; BORBA, R.C.M.; LABRUNA, M.B. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v. 161, n.1-2, p.116-121, 2009.

SPENCER, R. R.; PARKER, R. R. Rocky Mountain spotted fever: infectivity of fasting and recently fed ticks. **Public Health Reports**, v. 38, p. 333-339, 1923.

SZABÓ, M. P.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, v. 140, n. 6, p.719–728, 2013.

TOLEDO, R. S.; TAMEKUNI, K.; SILVA FILHO, M. F.; HAYDU, V. B.; PACHECO, R. C.; LABRUNA, M. B.; DUMLER, J. S.; VIDOTTO, O. Study of infection by *Rickettsiae* of the spotted fever group in humans and ticks in an urban park located in the City of Londrina, State of Paraná, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 3, p. 313-317, 2011.

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

WU, F. J.; HUANG, D. B.; PANG, K. R.; TYRING, S. K. Rickettsial infections around the world, part 1: Pathophysiology and the Spotted Fever Group. **Journal of Cutaneous Medicine and Surgery**, v. 9, n. 2, p. 54-62, 2005.