

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

TESE

Avaliação da infecção experimental do carrapato
***Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e do marsupial**
Monodelphis domestica* por *Rickettsia parkeri

Matheus Dias Cordeiro

2015



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

**AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL DO CARRAPATO
Rhipicephalus (Boophilus) microplus E DO MARSUPIAL *Monodelphis
domestica* POR *Rickettsia parkeri***

MATHEUS DIAS CORDEIRO

Sob a Orientação do Professor
Adivaldo Henrique da Fonseca

Seropédica, RJ
Novembro de 2015

595.45

Cordeiro, Matheus Dias, 1983-

C794a

T

Avaliação da infecção experimental do carrapato *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* e do marsupial *Monodelphis domestica* por *Rickettsia parkeri* / Matheus Dias Cordeiro. - 2015.

64f. : il.

Orientador: Adivaldo Henrique da Fonseca.

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

Bibliografia: f. 42-50.

1. Carrapato - Teses. 2. *Boophilus microplus* - Teses. 3. *Rickettsia* - Teses. 4. Carrapato - Infecções - Teses. 5. Carrapato como transmissor de doenças - Teses. I. Fonseca, Adivaldo Henrique da, 1953- 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

MATHEUS DIAS CORDEIRO

Tese submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutor em ciências**, no Curso do Pós-graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração Sanidade Animal.

TESE APROVADA EM 19/11/2015

ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA Ph.D., L.D. UFR-RJ
(Presidente da Banca)

MARIA HALINA OGRZEWALSKA, Dr., FIOCRUZ

NATHALIE DA COSTA CUNHA, Dr. UFF-RJ

ADRIANO PINTER, Dr. SUCEN-SP

CARLOS LUIZ MASSARD, Ph.D., UFRRJ

Dedico esta conquista aos meus pais, Pedro e Isa,
aos meus irmãos Nora Ney, Sócrates, Daniel e
Letícia, sobrinhos e à minha amada família
Daiana, Lavigne e Lara. Amo vocês demais!!

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer a todos que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui.

Ao meu pai e minha mãe, que não mediram esforços para o melhor de minha formação. Eles são minha inspiração.

Ao Professor Dr. Adivaldo Henrique da Fonseca, não só pela orientação e ensinamentos, mas pela confiança e amizade nesses 9 anos de convívio.

À nossa querida Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e a todos os professores pelos quais passei, por compartilhar seus conhecimentos.

Aos professores do Ensino Fundamental e Médio e em especial à Professora Esther da 3ª e 4ª série do ensino fundamental da Escola Municipal Dr. Justino Pereira da cidade de Mirai-MG, quem me deu uma advertência que me fez abrir os olhos e assumir a responsabilidade de estudar.

Aos antigos e atuais colegas de equipe e amigos do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ, Lucinéia da Costa Oliveira, Bruna de Azevedo Baêta, Patricia Barizon Cepeda Garcia, Rafaella Câmara Teixeira, Carla Carolina Dias Uzedo Ribeiro, Jaqueline Rodrigues de Almeida Valim, Marcio Barizon Cepeda, Adlilton Pacheco de Oliveira, Fabrício do Nascimento Gaudêncio (Agregado), Carolina Marota Ribeiro, Andrea Kill Silveira, Paulo César Magalhães Matos, Vanessa de Almeida Raia, Priscilla Nunes dos Santos, Gustavo Nunes de Santana Castro, Juliana Ferreira, Bruna Sampaio Martins Land Manier, Jéssica Fernandes de Souza, Michele Bahia do Vale Silva, Laura Ribeiro, Taís Medeiros Siqueira Carvalho e Max Ferreira de Andrade pelo companheirismo, auxílio nas tarefas, discussão de ideias e sugestões.

À Professora Drª Teresa Cristina Bergamo do Bonfim por ser tão prestativa em ajudar a encontrar os gambás de laboratório e por ceder espaço em seu biotério para a criação dos animais.

À Professora Drª Maria Araújo Teixeira da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul por, praticamente, ceder os gambás de laboratório para a realização deste experimento.

Ao Dr. Adriano Pinter pesquisador da SUCEN-SP pela colaboração aos trabalhos e por ceder a *Rickettsia parkeri*, fundamental para esse estudo.

À Professora Drª Nathalie da Costa Cunha da Universidade Federal Fluminense

por tudo que fez por mim desde a graduação até a minha defesa de doutorado e por estar sempre em colaboração com nosso laboratório.

Ao Dr. Daniel da Silva Guedes Junior pesquisador da FIOCRUZ por ceder gentilmente a célula VERO e por estar sempre a disposição em ajudar.

À técnica do Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular, Tássia Furtado e aos pós-graduandos João Varela e Viviane Zeringóta por toda ajuda prestada.

Ao Prof. Dr. Douglas McIntosh, pelos ensinamentos em Biologia Molecular e por estar sempre disposto em sanar dúvidas.

À Prof^a Maylin Gonzalez Navarrete da Universidad Agraria de la Habana de Cuba pela amizade, incentivo, convívio e por toda a ajuda.

Ao senhor Adenir pela prestatividade e eficiência em cuidar tão bem dos nossos animais.

Ao Professor Dr. Carlos Luiz Massard pelo incentivo e ensinamentos.

À Professora Marília Massard da Fonseca por estar sempre de prontidão e pelo carinho com a minha família.

Ao servidor público Arthur Santiago, secretário do curso de Pós-graduação em Ciências veterinárias, por sempre estar à disposição para ajudar.

A todos os meus amigos que não participaram deste trabalho, mas que sempre torceram por mim.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, pela amizade e convívio.

Aos Professores do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da UFRRJ, pelos ensinamentos e conselhos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro.

Aos animais que participaram deste estudo, sem os quais nada disso teria sido possível, meu profundo respeito e gratidão.

BIOGRAFIA

MATHEUS DIAS CORDEIRO, filho de **Pedro Dias Moreira** e **Isa Cordeiro Pires Moreira**, natural da cidade de Carangola, MG.

Cursou o Ensino Fundamental na Escola Estadual Mello Viana da Cidade de Divino, MG. Ingressou o Ensino Médio nível técnico no ano 2000, na Escola Agrotécnica Federal de Rio Pomba, atual IFET-Sudeste *campus* Rio Pomba, sendo diplomado como Técnico Agrícola em Agropecuária no ano de 2002.

Em 22 de Novembro de 2004, ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, graduando-se Médico Veterinário no dia 5 de Setembro de 2009.

Durante a graduação, realizou estágios em diversas áreas da Medicina Veterinária, integrando-se como estagiário do Laboratório de Doenças Parasitárias em Outubro de 2006, onde foi bolsista de Iniciação Científica–CNPq, no período de 2007 a 2009.

Em Fevereiro de 2012, obteve o título de Mestre em Ciências através do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias área de concentração Sanidade Animal.

No mês de Março do ano de 2012, ingressou no doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias na área de concentração Sanidade Animal, desenvolvendo estudos com ênfase em doenças transmitidas por carrapatos.

Recentemente foi aprovado em concurso e atua no Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro como servidor público.

E nesta data, apresenta e defende esta tese como requisito parcial para obtenção de título de Doutor em Ciências.

RESUMO GERAL

CORDEIRO, Matheus Dias. **Avaliação da infecção experimental do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e do marsupial *Monodelphis domestica* por *Rickettsia parkeri***. 2015. 54p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Rickettsia parkeri é uma bactéria patogênica, transmitida por carrapatos e isolada pela primeira vez no ano de 1937 nos Estados Unidos. Ainda existem poucos estudos sobre a história natural dessa espécie de rickettsia. O objetivo do presente estudo foi avaliar, por meio da alimentação artificial, a interação entre uma rickettsia patogênica e o carrapato monoxeno *Rhipicephalus microplus* utilizando a bactéria *R. parkeri* como modelo de estudo e verificar a infecção experimental de *Monodelphis domestica* por *R. parkeri* e a transmissão dessa rickettsia para o carrapato *Amblyomma sculptum*, caracterizando, esse marsupial, como possível amplificador desse agente. Fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *R. microplus* foram infectadas por *R. parkeri* através da alimentação artificial utilizando ponteiras plásticas, seguindo uma padronização prévia. Os carrapatos infectados e não-infectados foram avaliados quanto aos parâmetros biológicos da fase não parasitária e transmissão da bactérias à cobaias. Dez *M. domestica* foram infectados por *R. parkeri* (sete por via intramuscular e três por via subcutânea), os três animais inoculados por via intraperitoneal foram infestados por larvas e ninfas do carrapato *A. sculptum* como xenodiagnóstico. Os marsupiais foram avaliados clinicamente e quanto à parasitemia. Apesar de não ter infectado cobaias, a infecção experimental de *R. microplus* por *R. parkeri* causou um efeito deletério em alguns parâmetros de postura e proporcionou o primeiro relato da transmissão transovariana de uma rickettsia nesse carrapato. Os marsupiais *M. domestica* apresentaram órgãos infectados e uma parasitemia por pelo menos até o 9º dia pós-infecção (DPI), detectados pela PCR convencional. Os animais apresentaram prostração, pêlos arrepiados, emagrecimento e aumento da temperatura nos 3 primeiros DPI. Os carrapatos que se alimentaram nos animais infectados apresentaram-se positivos quando testados pela PCR. O sucesso da infecção de *R. microplus* por *R. parkeri* utilizando a alimentação artificial e da infecção experimental de *M. domestica* por *R. parkeri* irão contribuir para o conhecimento de novos dados sobre história natural dessa rickettsia patogênica.

Palavras-Chaves: Infecção experimental, Alimentação artificial, Carrapato do bovino

ABSTRACT

CORDEIRO, Matheus Dias. **Experimental infection of *Rhipicephalus microplus* ticks and *Monodelphis domestica* marsupials by *Rickettsia parkeri***. Thesis (Doctor Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). 2015 54p. Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

Rickettsia parkeri is a pathogenic bacteria transmitted by ticks and first isolated in 1937 in the United States. There are few studies on the natural history of this specie of rickettsia. The aim of this study was to evaluate the interaction between a pathogenic rickettsia and *Rhipicephalus microplus* tick and evaluate the infection of *Monodelphis domestica* by *Rickettsia parkeri* and the rickettsial transmission for *Amblyomma sculptum* tick, featuring, these marsupials as possible amplifiers that agent. Partially engorged females of the *R. microplus* were infected by *R. parkeri* through artificial feeding using plastic tips, following a previous standardization. Infected and non-infected ticks were evaluated for the biological parameters of the non-parasitic phase and transmission of bacteria in guinea pigs. Ten *M. domestica* were infected by *R. parkeri* (seven intramuscularly and subcutaneously three), the three animals inoculated intraperitoneally were infested with ticks as xenodiagnostic *A. sculptum*. Marsupials were evaluated clinically and as the parasitaemia. Despite not having infected guinea pigs, experimental infection of *R. microplus* by *R. parkeri* caused a deleterious effect on some posture parameters and provided the first report of transovarial transmission of rickettsia that tick. Marsupials *M. domestica* presented infected organs and parasitaemia, at least until the 9th day post-infection (DPI), detected by PCR. The animals showed prostration, rough hair coat, weight loss and increases the temperature in the first 3 DPI. Ticks that fed on infected animals were positive when tested by PCR. The success of the infection of *R. microplus* and *M. domestica* by *R. parkeri* contributed to the knowledge of new data on the natural history of that *Rickettsia*.

Key words: Experimental infection, Artificial feeding, Cattle tick

SUMÁRIO

Pág.

1 INTRODUÇÃO GERAL	1
---------------------------------	----------

2 REVISÃO DE LITERATURA.....	2
-------------------------------------	----------

2.1 <i>Rickettsia parkeri</i>.....	2
---	----------

2.2 Infecção experimental por <i>Rickettsia</i> spp. em animais	2
--	----------

2.3 Infecção experimental por <i>Rickettsia</i> spp. em carrapatos	5
---	----------

Capítulo I - Infecção experimental de *Rickettsia parkeri* em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* através da alimentação artificial

1 RESUMO.....	9
----------------------	----------

2 ABSTRACT	10
-------------------------	-----------

3 INTRODUÇÃO	11
---------------------------	-----------

4 MATERIAL E MÉTODOS.....	12
----------------------------------	-----------

4.1 Carrapatos	12
-----------------------------	-----------

4.2 Preparo do inóculo de <i>Rickettsia parkeri</i>	12
--	-----------

4.3 Procedimento experimental	12
--	-----------

4.4 Infestação em <i>Cavia aperea porcellus</i> (cobaias)	13
--	-----------

4.5 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....	13
--	-----------

4.6 Extração de DNA	14
----------------------------------	-----------

4.7 Reação em cadeia de Polimerase (PCR).....	14
--	-----------

4.8 Análise estatística	15
--------------------------------------	-----------

5 RESULTADOS	16
---------------------------	-----------

6 DISCUSSÃO	24
--------------------------	-----------

Capítulo II - Infecção experimental de *Monodelphis domestica* por *Rickettsia parkeri*

1 RESUMO.....	27
----------------------	-----------

2 ABSTRACT	28
-------------------------	-----------

3 INTRODUÇÃO	29
---------------------------	-----------

4 MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Origem e manutenção de <i>Monodelphis domestica</i> (Cuícas) em laboratório	30
4.2 Aprovação do Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA) e autorização do IBAMA	30
4.3 Inóculo de <i>Rickettsia parkeri</i>	31
4.4 Preparo do veículo de inoculação	31
4.5 Delineamento experimental	32
4.6 Infestação por carrapatos (Xenodiagnóstico)	33
4.7 Coleta de sangue	33
4.8 Preparo das amostras e extração do DNA	34
4.9 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)	34
5 RESULTADOS	36
6 DISCUSSÃO	40
3 CONCLUSÕES GERAIS	41
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
5 ANEXOS	51

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os carrapatos são artrópodes da classe Arachnida, subclasse Acari e ordem Ixodida subdividida em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. Todas as espécies de ixodídeos necessitam, obrigatoriamente, de sangue para seu desenvolvimento em, pelo menos, um estágio de seu ciclo de vida.

O longo período de íntima associação com seu hospedeiro caracteriza, os carrapatos, como excelentes transmissores de muitos patógenos virais, bacterianos e parasitários. Dentre esses patógenos, muitos infectam animais domésticos e humanos. Entre as doenças bacterianas transmitidas por carrapatos, as rickettsioses são as de maior importância na América latina, devido ao seu potencial zoonótico.

Rickettsia parkeri é uma bactéria patogênica transmitida por carrapatos. Já se passaram 78 anos de sua descoberta e ainda existem poucos estudos elucidativos sobre os reservatórios, amplificadores e sua interação com carrapatos.

Marsupiais são mamíferos primitivos encontrados apenas nas Américas e na Austrália. Dentre as espécies de marsupiais, destaca-se *Monodelphis domestica*, um animal usado como modelo experimental em estudos científicos. Esta foi a primeira espécie de marsupial a ter seu genoma todo sequenciado.

O “carrapato do boi”, *Rhipicephalus microplus* é um carrapato de grande importância econômica para a pecuária no mundo. O processo espoliativo e a transmissão de doenças aos bovinos causam uma grande perda na produção, além disso, esta espécie pode transmitir doenças aos bovinos e à outros animais e, também já foi relatada infestando humanos.

Com o objetivo de aumentar o conhecimento sobre a história natural da *R. parkeri*, a presente tese foi dividida em dois capítulos. O primeiro capítulo aborda a infecção *in vitro* da *R. parkeri* em *Rhipicephalus microplus* (carrapato-do-boi) utilizando a alimentação artificial. Este trabalho é o primeiro envolvendo os dois agentes, mostrando a interação de uma rickettsia patogênica com um carrapato monoxeno.

O segundo capítulo aborda a possibilidade de pequenos marsupiais serem mamíferos amplificadores de *R. parkeri*. O estudo mostra a sintomatologia desses marsupiais e a transmissão de *R. parkeri* à carrapatos alimentados em *Monodelphis domestica* infectados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 *Rickettsia parkeri*

Bactérias da ordem Rickettsiales e família Rickettsiaceae, o gênero *Rickettsia* agrupa diferentes espécies de bactérias GRAM-negativas, pleomórficas, parasitas intracelular obrigatório. Algumas espécies são patogênicas e, em mamíferos, estes organismos se multiplicam, principalmente em células endoteliais, ocasionando vasculite multissistêmica em pequenas artérias, veias e capilares (LA SCOLA; RAOULT, 1997). Nos invertebrados, as rickettsias determinam uma infecção múltipla em todos os órgãos (hemolinfa, glândula salivar, intestino, ovários, túbulos de Malpighi) podendo causar um efeito deletério no ciclo de vida desses hospedeiros (SOCOLOVSKY et al., 2009).

Recentemente, as espécies de rickettsias são classificadas em quatro grupos, Grupo da Febre Maculosa (GFM), Grupo Tifo (GT), Grupo *Rickettsia belli* e Grupo *Rickettsia canadensis* (MERHEJ; RAOULT, 2011). Dentro do GFM, destaca-se *Rickettsia rickettsii*, uma espécie altamente patogênica, letal a humanos e de ocorrência em grande parte da América Latina (PAROLA et al. 2014). *Rickettsia parkeri* é outra rickettsia patogênica pertencente ao GFM que merece destaque. Conhecida por ter patogenicidade, porém ainda sem letalidade observada, essa espécie já foi detectada e isolada em diferentes regiões do território americano (GODDARD; NORMENT, 1986; VENZAL et al. 2004; VARELA-STOKES et al., 2011; SILVEIRA et al., 2007; NAVA et al, 2008; ROMER et al. 2011).

Rickettsia parkeri foi isolada pela primeira vez nos EUA no ano de 1937 de *Amblyomma maculatum* coletado de bovino, sendo inicialmente tratada como não patogênica (PARKER et al., 1939). Apenas reconhecida como uma rickettsia patogênica no ano de 2004 (PADDOCK et al., 2004).

Na América do sul foi detectada pela primeira vez no Uruguai em *Amblyomma triste* por Venzal et al. (2004), segundo os autores existe uma associação epidemiológica desse achado com um caso relatado de rickettsiose humana. No Brasil, há relatos de casos não fatais dessa rickettsiose possivelmente ligados a uma cepa de *R. parkeri* denominada de cepa Mata Atlântica tendo o carrapato *Amblyomma ovale* como principal vetor (SPOLIDORIO et al., 2010; SABATINI et al. 2010; SILVA et al., 2011; SZABÓ et al. 2013), porém *A. triste* pode estar envolvido em algumas regiões. Além disso, outras espécies de carrapatos, como *Amblyomma aureolatum* e *Amblyomma nodosum*, também foram encontradas infectadas por *R. parkeri* (OGRZEWALSKA et al., 2009; MEDEIROS et al. 2011).

A prevalência desta rickettsia, entre os principais vetores, *A. triste* e *A. ovale*, é alta (VENZAL et al., 2004; NAVA et al., 2008) quando comparada à de *R. rickettsii* (GUEDES et al. 2005). Porém, a patogenicidade conferida ao carrapato *A. triste* pela *R. parkeri*, sugere que, na história natural dessa rickettsia, provavelmente, também se faz necessário um hospedeiro amplificador para a sua manutenção na natureza (NIERIBASTOS et al., 2013).

2.2 Infecção experimental em animais por *Rickettsia* spp.

Alguns membros do gênero *Rickettsia* são conhecidos como patógenos humanos transmitidos, principalmente, por artrópodes hematófagos. *Rickettsia rickettsii* é a espécie mais patogênica, e pode causar uma doença aguda que possui alta taxa de

letalidade, podendo passar de 80% (ANGERAMI et al. 2006). Existem pelo menos 14 doenças rickettsiais reconhecidas. Porém, patogenicidade através da infecção com outras espécies pode variar sendo, geralmente, sem letalidade (PAROLA et al. 2014).

Vários estudos demonstram que na maioria das espécies de rickettsia ocorre transmissão transovariana e a perpetuação transestadial. Porém, devido a patogenicidade conferida ao carrapato, a taxa de infecção de *R. rickettsii* geralmente se encontra no entorno de 1% (BURGDORFER, 1988; NIEBYLSKI et al., 1999; GUEDES et al. 2005). Essa patogenicidade impede que sua estabilidade enzoótica ocorra apenas por transmissão transovariana e perpetuação transestadial. Neste caso, a participação de amplificadores (animais vertebrados que desenvolvem uma rickettsemia em alguns dias) é crucial, pois novos indivíduos não infectados tornam-se infectados e iniciam novas linhagens de infectados dentro de uma população de carrapatos (LABRUNA, 2009). Desta forma, a procura de hospedeiros amplificadores tornou-se importante para o conhecimento da ecologia das rickettsias.

Cavia aperea porcellus (cobaios de laboratórios) foi uma das primeiras espécies de mamíferos descoberta como sensível à infecção por *R. rickettsii* (SPENCER; PARKER, 1923; GILFORD; PRICE, 1955). Até os dias atuais, essa espécie é eleita como modelo experimental para estudos com essa bactéria (KRAWCZAK et al. 2014). A infecção experimental feita por via intraperitoneal ou por infestação de carrapatos infectados pode causar febre, prostração, uma reação escrotal (edema e/ou necrose escrotal) e na maioria das vezes leva ao óbito do animal. Durante o período patente da infecção por *R. rickettsii*, os cobaios desenvolvem uma parasitemia suficiente para infectar novos carrapatos e manter uma nova geração de carrapatos positiva (LABRUNA et al. 2008b; KRAWCZAK et al. 2014; SAKAI et al., 2014). Essa mesma eficiência foi observada durante a infecção por *R. parkeri* cepa Porstmouth, utilizando *Amblyomma americanum* infectados e não infectados (GODDARD, 2003).

Burgdorferi; Friedhoff; Lancaster (1966) testou se algumas espécies de esquilos (*Citellus lateralis tescorum*, *Citellus columbianus columbianus*, *Eutamias amoenus*), uma espécie de lagomorfo (*Lepus americanus*) e duas espécies de pequenos roedores (*Microtus pennsylvanicus* e *Neotoma c. Cinerea*), podem ser amplificadores de *R. rickettsii*, uma vez que estes mamíferos estão presentes em áreas endêmicas para Febre Maculosa das Montanhas Rochosas e são hospedeiros para fases imaturas do vetor *Dermacentor andersoni*. Os resultados provaram que com exceção de *Neotoma c. Cinerea*, todas as espécies testadas experimentalmente, quando picados por carrapatos infectados, responderam com rickettsiaemias em quantidade suficiente para infectar larvas do carrapato *D. Andersoni*.

No Brasil, os principais estudos experimentais envolveram a capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e o gambá (*Didelphis aurita*). Estas espécies de mamíferos são altamente prolíferas, abundantes em área endêmica para Febre Maculosa (FM) e se comportam como excelentes hospedeiros naturais para os carrapatos vetores. Precisava saber se seriam susceptíveis à *R. rickettsii*, mantendo-a em níveis circulantes na corrente sanguínea (rickettsaemia) o suficiente para causar infecção de carrapatos negativos que neles se alimentem. Deste modo, Souza et al. (2009) infectaram, experimentalmente, capivaras com *R. rickettsii* através de carrapatos *A. sculptum* infectados e macerado de baço de cobaio infectado. O estudo provou que, capivaras podem se infectar e transmitir a bactéria para carrapatos não infectados sem desenvolver febre e chegar ao óbito. Em gambás da espécie *Didelphis aurita*, Horta et al. (2009) também infectaram utilizando carrapatos *A. sculptum* infectados e macerado de baço de cobaio infectado. A espécie de marsupial usada se infectou e obteve uma parasitemia

suficiente para transmitir *R. rickettsii* à carrapatos não infectados. Porém, três animais infectados por via intraperitoneal, vieram a óbito, além disso, a parasitemia foi intermitente, apesar de ter sido detectada até 30 dias após a infecção.

Piranda et al. (2008) avaliaram a infecção por *R. rickettsii* em cães domésticos da raça Beagle. Os cães foram considerados bons amplificadores de *R. rickettsii* para os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e desenvolveram uma doença com características semelhantes à Ehrlichiose monocítica canina. Esse achado se tornou um importante alerta, de que muitos dos casos de rickettsiose canina poderiam estar sendo diagnosticado como Ehrlichiose e, com isso, o risco de infecção humana não seria controlado.

Outras rickettsias também foram avaliados experimentalmente em mamíferos, no entanto as infecções não obtiveram o mesmo efeito. Horta et al (2010) infectaram *D. aurita* com *R. parkeri*, *Rickettsia belli* e *Rickettsia felis*, porém nenhum animal teve sintomatologia clínica e, principalmente, não desenvolveram uma parasitemia suficiente para ser detectada ou até mesmo infectar uma nova geração de carrapatos.

Procurando o desenvolvimento de um bom e viável modelo de transmissão, e assim, caracterizar melhor a patologia associada à infecção por *R. parkeri*, Grasperge et al. (2012) infectaram, por via intravenosa e intradérmica, quatro linhagens puras de camundongos (A/J, BALB/c, C3H/HeJ, e C3H/HeN). A linhagem C3H / HeJ, quando inoculado por via intravenosa, apresentou esplenomegalia e um edema facial bem marcado. E quando inoculados por via intradérmica, os camundongos desenvolveram lesões do tipo escaras, bem características dessa rickettsiose. Além disso, altas concentrações de DNA no coração, pulmão, fígado, baço e sangue quando examinados por PCR quantitativa. A semelhança entre a patologia da doença humana e a desenvolvida por essa linhagem, a torna um excelente modelo para estudo experimental dessa doença.

Moraru et al. (2013) estudaram a infectividade de *R. parkeri* ao roedor *Sigmodon hispidus* (ratos de algodão) e a ave *Colinus virginianus* (Codorna virginiana). Os resultados demonstraram que *R. parkeri* pode persistir viável em tecidos dos roedores durante pelo menos 7 dias após a inoculação subcutânea, no entanto, aparentemente, os codornizes são resistentes à infecção. A rickettsia não foi detectada em ninfas de carrapatos que se alimentavam nos roedores e codornizes, sugerindo portanto, que essas espécies não são eficientes como hospedeiros amplificadores de *R. parkeri*.

Procurando entender melhor sobre a história natural da *R. parkeri*, Edwards et al. (2011), estudaram sua infecção em bovinos domésticos, uma vez que são um dos principais hospedeiros para o carrapato vetor *Amblyomma maculatum*. Nesse estudo foi observado que, dois dos seis animais infectados com a rickettsia apresentaram uma rickettsemia transiente, porém nenhum animal desenvolveu sintomatologia de doença, apesar de terem soroconvertido depois de testados para Reação de imunofluorescência indireta (RIFI). No estudo a campo, nenhum animal foi positivo à PCR para os genes de rickettsia. Porém, 49,7% foram reativos à RIFI e 22% dos 23 carrapatos testados foram positivos à Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Estas avaliações permitiram observar que, o bovino não pode ser considerado como reservatório de *R. parkeri*, mas tem um importante papel na epidemiologia deste agente, sendo um amplificador do carrapato vetor e, ao mesmo tempo, um transportador de carrapatos infectados para próximo ao homem.

Na América do Sul, o primeiro carrapato identificado como vetor de *R. parkeri*, *A. triste*, pertence ao mesmo grupo de carrapatos do *A. maculatum* e a fase adulta dessa espécie, frequentemente, é encontrada parasitando o cão doméstico (VENZAL et al.

2008) e, principalmente, cervídeos silvestres *Blastocerus dichotomus* (SZABÓ et al., 2007; GUGLIELMONE et al. 2013), mas também pode ser encontrada em bovinos (VENZAL et al., 2008). Entretanto pouco se sabe sobre os principais mamíferos mantedores dessa rickettsia no ciclo silvestre. Maciel (2013) infectou galinhas domésticas, a fim de tentar observar alguma possível participação dessa espécie na epidemiologia da *R. parkeri*. Com isso, foi possível demonstrar que as aves soroconverteram mediante o desafio da inoculação por *R. parkeri*, todavia não houve a identificação do agente nos tecidos analisados (baço e pulmão), bem como a presença de rickettsemia.

2.3 Infecção experimental por *Rickettsia* spp. em artrópodes

É provável de que a associação entre os membros da família Rickettsiaceae com invertebrados seja evolutivamente antiga, pois os artrópodes não apresentam patologias evidentes associadas à infecção por alguns destes microrganismos atuando, portanto, como vetores ou hospedeiros primários (HOOGSTRAAL, 1967). Além de vetores, os carrapatos ixodídeos podem atuar como reservatórios e amplificadores de rickettsias do GFM (BACELLAR, 1996; PAROLA et al., 2005). Os carrapatos podem adquirir rickettsias através do repasto sanguíneo em um hospedeiro rickettsêmico, pela co-alimentação com carrapatos infectados, transmissão venérea e a transmissão transovariana (SOCOLOVSKY et al. 2009).

Visto a importância de se conhecer a interação entre as rickettsias e seus vetores, diversos estudos foram desenvolvidos promovendo a infecção experimental de artrópodes com bactérias do gênero *Rickettsia* (MACALUSO et al., 2001; MACALUSO et al., 2002; SAKAI et al. 2014).

A metodologia experimental mais usada para a infecção de rickettsias em carrapatos livres é a utilização de hospedeiros mamíferos susceptíveis. O mamífero susceptível desenvolve uma rickettsaemia, mesmo que transitória e por um curto período, de modo que, as infestações durante esse período serão suficientes para infectar uma maior parte dos carrapatos nele alimentado. A espécie mamífera mais usada como fonte de infecção de *R. rickettsii* à carrapatos é o roedor *C. porcellus aperea* (cobaio de laboratório) (SPENCER; PARKER, 1923; GILFORD; PRICE, 1955; LABRUNA et al. 2008b; SAKAI et al. 2014).

Com o intuito de estudar a participação do carrapato *Amblyomma dubitatum* na epidemiologia da Febre Maculosa Brasileira, Sakai et al. (2014) testou a competência vetorial desse carrapato. Os espécimes de *A. dubitatum*, adquiridos de infestações naturais em capivaras, já se encontravam infectados naturalmente com *Rickettsia bellii*. Os carrapatos foram infestados em cobaios infectados experimentalmente por duas cepas de rickettsia, *R. rickettsii* Cepa Taiacu (PINTER; LABRUNA, 2006) e *R. rickettsii* Cepa Itu (KRAWCZAK et al. 2014). Após a aquisição da *R. rickettsii* foi possível observar perpetuação transestadial e transmissão dessa bactéria infectada artificialmente à cobaios não infectados. Porém, a transmissão transovariana foi inibida pela presença da *R. bellii* que primariamente infectavam os carrapatos ou por outro fator intrínseco ainda não elucidado.

Goddard (2003) constatou que o cobaio de laboratório também pode ser um bom modelo experimental para infecção de *R. parkeri* em carrapatos livres de rickettsias. O autor observou que os cobaios infectados previamente com *R. parkeri* desenvolveram uma rickettsaemia suficiente para infectar carrapatos *Amblyomma americanum*. Neste mesmo estudo, Goddard (2003) infectou carrapatos *A. americanum* com *R. parkeri* a

partir da inoculação direta na subcutícula. De 150 ninfas inoculadas diretamente com suspensões de *R. parkeri*, 53% foram positivos no exame de hemolinfa e pela fluorescência direta quando examinadas após a mudança para a fase adulta.

A crescente preocupação envolvendo questões relacionadas à ética tem estimulado cada vez mais a substituição do uso de animais na experimentação científica por métodos alternativos. Desta forma, a alimentação artificial surge como uma importante ferramenta, por possibilitar a análise dos aspectos biológicos e a avaliação da eficiência de artrópodes como vetores, além de tornar possível a redução do número de animais de laboratório necessários em pesquisas que envolvam a transmissão de bioagentes (RANGEL, 2011). No que diz respeito ao estudo de rickettsias, a alimentação artificial, também facilita o estudo da infecção de rickettsias não patogênicas em artrópodes, uma vez que, essas rickettsias não promovem rickettsaemias em hospedeiros vertebrados para infectar carrapatos livres (HORTA et al., 2010).

Por meio da alimentação artificial, vários estudos foram desenvolvidos no sentido de testar novos hospedeiros para o agente e, também interação entre o patógeno e o artrópode (MACALUSO et al., 2001; MACALUSO et al., 2002; REIF et al., 2011; GODDARD et al., 2012; RIBEIRO, 2015).

A partir da alimentação artificial usando tubos capilares, Macaluso et al. (2001) infectaram fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Dermacentor variabilis* com *Rickettsia montana* e *Rickettsia rhipicephali* cultivadas *in vitro*. Os autores observaram que a infecção por rickettsias no intestino, hemolinfa e glândula salivar ocorreu em 40% (7/18) dos carrapatos. A eficiência da transmissão transovariana de rickettsias em carrapatos foi verificada, através da PCR, em 85% (11/13) e 69% (11/16) dos carrapatos infectados por *R. montana* e *R. rhipicephali*, respectivamente. Porém, quando testados pela reação de Imunofluorescência direta, 100% (18/18) das amostras de ovos testadas foram positivas. Os autores avaliaram ainda o volume da solução ingerida pelos carrapatos utilizando aminoácidos marcados diluído no meio BSK, suplementado com soro de coelho. Após o período de 24 horas, os carrapatos ingeriram um volume médio de $1,35 \pm 2,15$ ml da solução.

Em seguida, usando a mesma metodologia, Macaluso et al. (2002) infectaram *R. rhipicephali* em *D. variabilis* previamente infectados com *R. montana* e, também foi feito o oposto. Os autores identificaram que as rickettsias, *R. montana* e *R. rhipicephali* são refratárias às respectivas rickettsias desafiadas, pois a taxa de infecção dos ovos tanto na primeira geração quanto na geração seguinte foi apenas da rickettsia primariamente infectada. Estes resultados possibilitaram sugerir que as infecções de rickettsias no ovário dos carrapatos podem alterar a expressão molecular dos oócitos de tal maneira que uma infecção secundária não será possível.

Na tentativa de elucidar o potencial mecânico e biológico das doenças transmitidas por percevejos, Goddard et al. (2012) avaliaram a capacidade de sobrevivência da *R. parkeri* em *Cimex lectularius* após a alimentação artificial com sangue de galinha usando membranas artificiais feitas com Parafilm M®. Porém, a rickettsia não resistiu à passagem de estágio dos percevejos da fase imatura e apenas dois adultos alimentados (2/15) apresentaram-se positivos, tanto na PCR quanto na imunofluorescência direta duas semanas após a infecção. Apesar de ter havido sobrevivência de *R. parkeri* em dois percevejos por duas semanas, a viabilidade dessas bactérias foi questionada, pois não se conseguiu um novo cultivo nos espécimes testados.

Ribeiro (2015) padronizou uma metodologia de alimentação artificial para *Ornithodoros rostratus* usando membranas artificiais de silicone. Essa metodologia

permitiu infectar experimentalmente essa espécie de argasídeo com *R. parkeri* cepa at24. A rickettsia infectada permaneceu infectando o carrapato após a mudança de estágio (Ninfa de instar número 5 para adulto). Os carrapatos adultos infectados experimentalmente transmitiram *R. parkeri* à cobaias não infectados. Porém não houve a transmissão transovariana, provavelmente devido a presença de uma rickettsia, ainda não identificada, que infectava naturalmente a colônia utilizada (RIBEIRO, 2015).

Utilizando um sistema de alimentação artificial, Reif et al. (2011) avaliaram a capacidade da pulga do gato (*Ctenocephalides felis felis*) adquirir *Rickettsia felis* durante a alimentação e em seguida transmitir de maneira vertical a bactéria. Para isso pulgas livres de rickettsias foram expostas à sangue infectado com *R. felis*, a infecção foi monitorada em intervalos semanais, durante 4 semanas. A partir do 7º dia pós-exposição, 52% das pulgas adquiriram com sucesso rickettsias e o DNA de *R. felis* foi detectado nas fezes das pulgas. Apesar de ter sido detectado a rickettsia em pulgas adultas não foi possível observar transmissão transovariana na geração F1. Os autores concluíram que este estudo poderá servir como um modelo futuro para uma abordagem da avaliação da transmissão desta rickettsia entre hospedeiros vertebrados e artrópodes.

CAPÍTULO I

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE *Rickettsia parkeri* EM *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* POR MEIO DA ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL

1 RESUMO

Este estudo teve como objetivo avaliar, através da alimentação artificial, a interação entre uma rickettsia patogênica e o carrapato monoxeno *Rhipicephalus microplus*, utilizando a bactéria *R. parkeri* como modelo de estudo. Foram utilizadas 80 fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *R. microplus* pesando entre 40 e 71 mg e divididas em 3 grupos experimentais. O grupo 1 (G1) com 20 carrapatos foi alimentado apenas com sangue bovino heparinizado. O grupo 2 (G2) com 20 carrapatos foi alimentado com sangue heparinizado contendo células VERO não-infectadas, enquanto que o grupo 3 (G3), com 40 carrapatos, foi alimentado com sangue contendo células VERO infectadas com *R. parkeri*. Ambos os grupos foram alimentados por um período de 12 horas em estufa de B.O.D. à uma temperatura variando entre 30° e 32° C e umidade relativa do ar entre 80-90%. Os carrapatos infectados e não-infectados foram avaliados quanto aos parâmetros biológicos da fase não parasitária e transmissão da bactéria à cobaias. O ganho de peso foi observado em 60% (12/20) das fêmeas no G1 (Sangue negativo), 58% (11/19) no G2 (Sangue + VERO negativo) e 55% (22/40) no G3 (Sangue + VERO positivo). Ao final da postura todas as fêmeas do G3 foram positivas na PCR aos genes específicos para o gênero *Rickettsia*. O período de postura, peso total da postura, índice de produção de ovos (IPO) e o índice da eficiência nutricional (IEN) foram reduzidos no grupo infectado com *R. parkeri*, apresentando uma diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado com os grupos controles (G1 e G2). Apesar de não ter infectado cobaias, a infecção experimental de *R. microplus* por *R. parkeri* causou um efeito deletério na postura e proporcionou o primeiro relato da transmissão transovariana de uma rickettsia por esse carrapato.

2 ABSTRACT

This study aimed to evaluate the interaction between a pathogenic rickettsia and the *Rhipicephalus microplus* tick using the *Rickettsia parkeri* bacterium as a model. Eighty partially engorged females *R. microplus* ticks weighing between 40 and 71 mg were used. The experimental groups were divided in Group 1 (G1) with 20 ticks fed only with bovine blood heparin; Group 2 (G2) with 20 ticks fed heparinized blood containing non-infected VERO cells and Group 3 (G3) with 40 ticks fed blood containing VERO cells infected with *R. parkeri*. Both groups were fed for a period of 12 hours at a temperature ranging between 30 and 32° C and relative humidity between 80-90% .The ticks infected and non-infected were evaluated for the biological parameters of the non-parasitic phase and transmission of bacteria to guinea pigs. Weight gain was observed in 60% (12/20) of females in G1, 58% (11/19) in G2 and 55% (22/40) in the G3. The laying period, total weight posture, egg production index (IPO) and the index of the nutritional efficiency (IEN) were reduced in the infected group with *R. parkeri*, showing a statistically significant difference ($p < 0.05$) compared with control groups (G1 and G2). Despite not having infected guinea pigs, experimental infection of *R. microplus* by *R. parkeri* caused a deleterious effect on posture and provided the first report of transovarial transmission of rickettsia by this tick.

3 INTRODUÇÃO

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é um carrapato monoxeno amplamente distribuído, considerado de grande importância econômica para a pecuária mundial (GRISI et al., 2002). É comum encontrar propriedades rurais com infestações descontroladas. Apesar de ter o bovino como hospedeiro de predileção, este carrapato pode parasitar outras espécies de mamíferos como canídeos, felinos (LABRUNA et al. 2005^a), equinos (BITTENCOURT et al., 1990), búfalos (BENITEZ; CETRA; FLORIN-CHRISTENSEN, 2012; CORRÊA et al., 2012) e seres humanos (SOARES et al., 2007).

Os principais reservatórios de rickettsias são os carrapatos, pois esses podem as manter por várias gerações, através da transmissão transovariana e a perpetuação transestadial (NIERI-BASTOS et al., 2013).

As espécies de carrapatos monoxenos não são reconhecidas como relevantes na epidemiologia das rickettsioses, uma vez que, parasitam apenas um hospedeiro. No entanto, *R. microplus* é uma espécie, frequentemente, encontrada em regiões endêmicas para febre maculosa e em alguns casos são detectadas, através da reação em cadeia de polimerase (PCR), infectados por rickettsias patogênicas (MOURA-MARTINIANO et al., 2014). Porém a importância desta espécie na epidemiologia das rickettsioses ainda não foi esclarecida.

Deste modo, o objetivo desse estudo foi avaliar, por meio da alimentação artificial, a interação entre uma rickettsia patogênica e o carrapato monoxeno *R. microplus* utilizando a bactéria *R. parkeri* como modelo de estudo.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Carrapatos

Os espécimes de *R. microplus* utilizados nesse estudo foram oriundos de fêmeas parcialmente ingurgitadas, não-infectadas por *Rickettsia* spp., coletadas de infestação natural em bovinos do setor de bovinocultura de leite da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro no município de Seropédica, Rio de Janeiro. Para certificar-se que as mesmas estavam livres de agentes rickettsiais, as quenógenas da geração anterior foram testadas, por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) usando como alvo os genes *gltA* e *ompA* (descritos no item 4.7), após o fim da oviposição. Os testes não resultaram em produtos amplificados, atestando a ausência de infecção por *Rickettsia* spp. A colônia foi mantida sob passagens sequenciais em bezerros estabulados individualmente em uma área de 8 x 2 m, sem contato com outros animais e outras espécies de carrapatos.

4.2 Preparo do inóculo de *Rickettsia parkeri*

A cepa At24 de *R. parkeri*, originalmente isolada do carrapato *Amblyomma triste* no município de Paulicéia-SP (SILVEIRA et al., 2007) foi utilizada como modelo de rickettsia patogênica para a infecção dos carrapatos. Essa cepa de rickettsia foi cedida pelo Dr. Adriano Pinter e tem sido mantida através de passagens *in vitro* em células VERO à 30° C. Para o estudo, uma alíquota em estoque foi descongelado do nitrogênio líquido e inoculada em um frasco de 75 cm² contendo uma monocamada de células VERO. Quando a monocamada apresentou-se próximo de 100% infectada (7° dia pós-infecção), foi desprendida do fundo do frasco, transferida para um tubo de polipropileno de 15 mililitro (ml) e centrifugada à 5300 xg por 10 minutos à uma temperatura de 4° C. O meio Dubecco's modified Eagle's ontan (DMEM) foi todo retirado e as células ressuspensas em sangue bovino à concentração de 10⁶ de células VERO infectadas com *R. parkeri* por ml de sangue.

4.3 Procedimento experimental

A infecção dos carrapatos foi realizada através de um sistema de alimentação artificial utilizando ponteiros plásticos de 1000 µl como descrito previamente (RANGEL, 2011). O sangue aplicado à alimentação artificial pertencia ao mesmo bezerro em que se encontravam os carrapatos, cujo volume globular observado era de 28%. A coleta do sangue se fez através do sistema com tubos à vácuo contendo heparina sódica como anticoagulante. Uma alíquota do sangue foi testada para a presença de *Rickettsia* spp. usando genes específicos como descrito no item 5.1.5.

Foram utilizadas 80 fêmeas parcialmente ingurgitadas pesando entre 40 e 71 mg e divididas em 3 grupos experimentais. O grupo 1 (G1) com 20 carrapatos foi alimentado apenas com sangue heparinizado. O grupo 2 (G2) com 20 carrapatos foi alimentado com sangue heparinizado contendo 10⁶ de células VERO por ml não-infectadas, enquanto que o grupo 3 (G3), com 40 carrapatos, foi alimentado com sangue contendo 10⁶ de células VERO por ml infectadas com *R. parkeri* como descrito anteriormente. Ambos os grupos foram alimentados por um período de 12 horas em estufa de B.O.D. (Biological Oxygen Demand) a uma temperatura variando entre 30° e 32° C e umidade relativa do ar entre 80-90%. A faixa de peso, o tempo de alimentação e

a temperatura utilizada no experimento foram definidos segundo a padronização previamente estabelecida por Rangel (2011) com modificações em relação à temperatura (de 37°C para 32°C) e tempo de alimentação (de 7 horas para 12 horas) esperando alcançar o melhor ingurgitamento das fêmeas sem prejudicar o metabolismo da rickettsia. Os três grupos foram trabalhados em momentos diferentes para evitar contaminações por aerossóis.

Ao final do período de alimentação, os carrapatos foram higienizados e pesados em balança analítica para avaliação do ganho de peso. Essas fêmeas foram então fixadas com esparadrapos em placas de petri e mantidas em BOD à temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa de 80% para subsequente avaliação dos parâmetros biológicos da fase não parasitária. Para isso foram avaliados: período de pré-postura, período de postura e peso da massa de ovos. Os índices de eficiência nutricional e reprodutiva foram calculados de acordo com Bennet (1974) e Meléndez et al. (1998) (Anexo II).

No segundo dia após o término da postura, cada fêmea foi pesada e imersa em álcool isopropílico e conservadas, individualmente, desta maneira até o momento da extração do DNA. A massa de ovos de cada fêmea foi individualizada em tubos de ensaio devidamente identificadas, tampadas com algodão e mantidas em BOD à temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa de 80% até a eclosão das larvas. Após a eclosão, metade do pool de larvas dos grupos G2 e G3 foi imerso em álcool isopropílico e, em seguida, conservado em RNA later[®] à -20 °C até o momento da extração do DNA para a avaliação da transmissão transovariana, a outra metade das larvas foi usada para infestar cobaios.

4.4 Infestação de carrapatos em *Cavia aperea porcellus* (cobaios)

Foram utilizados quatro cobaios machos e uma fêmea, ambos sem históricos de contatos com carrapatos. Pools de larvas de aproximadamente 100 mg de ovos (postura de 5 fêmeas de *R. microplus*) foram infestados em cada cobaio. Os quatro cobaios machos receberam larvas do G3 e a cobaio fêmea recebeu ovos do G2. A infestação foi realizada em uma câmara feita com pano de algodão colada no dorso do animal.

A aferição da temperatura retal foi realizada diariamente do 0 ao 20º dia pós-infestação (DPI). No 45º DPI, para detectar a presença de anticorpos anti-*R. parkeri*, amostras de sangue foram coletadas de cada cobaio, através da veia marginal da orelha com o auxílio de tubos capilares de microhematócrito. Os tubos sem anticoagulante permitiram a coagulação do sangue e subsequente extração do soro em centrifuga de microhematócrito (FANEM[®]).

4.5 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Como controle positivo, foi utilizado o soro de um animal infectado experimentalmente por *R. parkeri*. Para controle negativo foi utilizada uma amostra de soro de um animal negativo previamente testado. O conjugado com soro anti-Guinea Pig marcado com isoticianato de fluoresceína (KPL[®]) foi utilizado na titulação de 1:40.

Para realização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) foram utilizadas lâminas de 10 orifícios, produzidas no Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ, sensibilizadas com antígeno de *R. parkeri* (cepa At24) em células VERO e conservadas a 20º Celsius negativos. As lâminas foram retiradas da refrigeração e imersas em tampão salino fosfatado (PBS) pH 7,2 por 10 minutos. A diluição dos soros-teste e controles, negativo e positivo, foi de 1:64. Assim, 10 µl dos soros-teste e dos controles

diluídos em PBS foram dispostos em cada orifício das lâminas, e estas, armazenadas em câmara úmida dentro de uma estufa bacteriológica a 37°C durante 30 minutos. Após este tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e secas ao ar. Sendo assim, foram adicionados 10 µl de conjugado diluído em PBS e as lâminas armazenadas sob as mesmas condições por mais 30 minutos. Posteriormente, foram lavadas duas vezes por imersão em PBS acrescido de Azul de Evans (na proporção de 0,3 ml de Azul de Evans para cada 100 ml de PBS) por 10 minutos em uma cuba coberta por papel alumínio para evitar a entrada de luz. Em seguida, as lâminas foram secas ao abrigo da luz em temperatura ambiente. Para realizar a leitura, foram montadas com duas pequenas gotas de glicerina tamponada e cobertas por lamínula. Realizou-se a leitura das lâminas em microscópio de fluorescência à luz ultravioleta com aumento de 40 vezes. Foram considerados positivos todos os poços que apresentaram pontos fluorescentes mais ou menos uniformes com formas cocóides, bacilares ou cocobacilares (HORTA et al., 2007).

4.6 Extração de DNA

Carrapatos adultos mantidos em álcool isopropílico e larvas conservadas em RNA later® foram lavados em água destilada por três vezes e re-hidratados em 200µL de PBS (phosphate buffered saline). Em seguida adicionou-se sete esferas de óxido de zircônio de 2 mm e 80 mg de esferas de vidro de 0,1 mm, ambas autoclavadas, para a trituração em Minibeadbeater BIOSPEC® por 1 minuto.

A lise celular foi efetuada com a adição de 250 µl de solução de digestão (20 mM Tris-HCl, 20 mM EDTA, 400 mM NaCl, 1% sodium dodecyl sulphate, 10 mM CaCl₂) com 20 µl de proteinase k (20 mg/ml) em incubação por 3 horas à temperatura de 56° Celsius. O DNA foi extraído por um tratamento com Fenol e outro tratamento com fenol-clorofórmio seguido de precipitação com isopropanol. O pellet de DNA (formado após centrifugação de 16000 xg) foi lavado duas vezes com álcool 70% e ressuspendido em 100 µl de tampão de eluição (10 mM Tris-HCl, 0,5 mM EDTA pH 9,0) em overnight à 4°C (SANTOLIN; FAMADAS; MCINTOSH, 2013). Em cada bateria de extração de DNA havia algumas amostras de carrapatos não infectados, usados como controle, para garantir que não houve contaminação nesta etapa.

4.7 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

A presença de DNA rickettsial foi detectada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (INVITROGEN / LIFE TECHNOLOGIES®) descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação de genes rickettsiais por Reação em Cadeia da Polimerase convencional.

<i>Primer</i>	Gene	Sequência de Nucleotídeo (5' - 3')	Tamanho do produto amplificado	Referência
CS-78	<i>gltA</i>	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401 pb	Regenery et al. 1991
CS-323		GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT		
17 kd3	<i>htrA</i>	TGTCTATCAATTCACAACTTGCC	549 pb	Webb et al. 1990
17kd5		GCTTTACAAAATTCTAAAAACCATATA		
Rr190.70p	<i>ompA</i>	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	532 pb	Labruna et al. 2004
Rr190.602n		AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT		

Por serem mais sensíveis quando testados previamente, os genes *gltA* e *htrA* foram utilizados para a triagem. As condições da PCR para esses genes foram idênticas, sendo desenvolvida da seguinte maneira: Em cada reação continha 3 µL de DNA (aproximadamente 200 ng de amostra padronizada a 75 ng/µL), 14,2 µL de água, 2 µL de *primers* (10 µM F+R), 2,5 µL de tampão (10X concentrado), 1,25 µL de MgCl₂ (50 Mm) e 2 µL de Dntp's (2,5 Mm) e 0,15µL *Taq Platinum* polimerase (LIFE TECHNOLOGY®) em um volume final de 25µL. A mistura de reação foi submetida à desnaturação inicial a 95^oC por 5 minutos; seguido por 40 ciclos de 20 segundos a 95^oC para desnaturação; 52^oC para anelamento por 20 segundos e 72^oC por 25 segundos para extensão; por último uma temperatura de extensão final de 72^oC por 5 minutos.

A confirmação da infecção por *R. parkeri* foi realizada usando o gene *ompA*, específico para rickettsias do GFM. A amplificação se deu da seguinte maneira: em cada tubo de reação continha 3 µL de DNA (150 ng de amostra padronizada a 50 ng/µL), 8,0 µl de água, 0,75 µL de cada *primer* (10 Mm F+R), e 12,5 µl *Master mix* (PROMEGA®) em um volume final de 25 µL. A mistura de reação foi submetida à desnaturação à 95^oC por 5 minutos; seguido por dez ciclos iniciais de 40 segundos a 95^oC para desnaturação; 60^oC para anelamento por 45 segundos, baixando 0,5^oC a cada ciclo até que o último ciclo o corresse a temperatura de 55^oC; 72^oC por 45 segundos para extensão. Após esses ciclos iniciais, ocorreram mais 35 ciclos iguais ao décimo ciclo, totalizando 45 ciclos; por último uma temperatura de extensão final de 72^oC por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.

4.8 Análise estatística

A avaliação estatística dos aspectos biológicos da fase não-parasitária como o peso da postura, período de postura, índices de produção de ovos e de eficiência reprodutiva, que apresentaram uma distribuição normal pelo teste Shapiro-Wilk aplicou-se a Análise de Variância (ANOVA) com nível de significância de 5% e como pós-teste Teste de Tukey. No caso dos aspectos que apresentaram distribuição não normal, mesmo após transformação logarítmica, a estratégia de análise foi não paramétrica, a partir do teste de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5% e como pós-teste o Teste de Student-Newman-Keuls.

5 RESULTADOS

Na tabela 2 são apresentadas as médias de ganho de peso dos três grupos de fêmeas de *R. microplus* alimentadas com sangue bovino usando ponteiras plásticas. O ganho de peso foi observado em 60% (12/20) das fêmeas no G1 (Sangue negativo), 58% (11/19) no G2 (Sangue + VERO negativo) e 55% (22/40) no G3 (Sangue + VERO positivo).

Tabela 2. Avaliação do ganho médio de peso em fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus microplus* alimentadas com sangue bovino heparinizado sem células (G1), com células VERO não infectadas (G2) e com células VERO infectadas com *Rickettsia parkeri* (G3).

Grupos	Peso das Fêmeas		
	Média ± Desvio Padrão		
	(Limite mínimo – Limite máximo)		
	Antes	Depois	Ganho de Peso
G1	49,9 ± 8,66	113,46 ± 67,01	63,57 ± 66,4 ^a
	(40,0 – 69,9)	(38,0 – 226,0)	(-3,1 – 177,2)
G2	52,8 ± 8,36	77,95 ± 37,25	25,1 ± 36,4 ^a
	(40,6 – 71,0)	(40,0 – 154,2)	(-5,3 – 102,3)
G3	50,38 ± 8,5	80,95 ± 44,52	30,57 ± 45,96 ^a
	(40,4 – 68,2)	(37,2 – 219,5)	(-6,0 – 169,3)

A avaliação com genes específicos para *Rickettsia* spp. (*gltA*, *htrA* e *ompA*) permitiu certificar que, todas as fêmeas alimentadas artificialmente com *R. parkeri* adicionado ao sangue, mesmo as que não ganharam peso, permaneceram infectadas até o final da postura (até aproximadamente 20 dias) (Figura 1). As fêmeas infectadas apresentaram escurecimento a partir do segundo dia pós-alimentação.

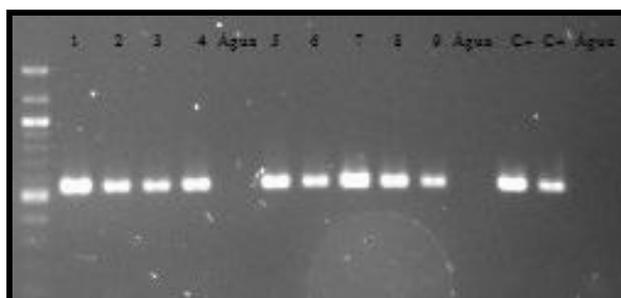


Figura 1. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando a amplificação de fita de DNA com 549 pb do gene *htrA* em fêmeas infectadas artificialmente por *Rickettsia parkeri*. Canaletas numeradas de 1 a 9: Fêmeas infectadas; Água: Reação controles negativos; C+ Controles positivos de *R. parkeri* cepa NOD;. Marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (Invitrogen®)

O ritmo de postura diário dos três grupos alimentados está apresentado no Gráfico 1. O pico de postura média ocorreu no segundo dia nos três grupos. O gráfico do ritmo de postura revela que, a presença de células VERO influenciou negativamente na quantidade da postura diária em função da menor ingestão de sangue. Em contrapartida a infecção por *R. parkeri* ocasionou para uma menor quantidade de ovos e

uma queda mais acentuada a partir do primeiro dia de postura (Gráfico 1). A viabilidade dos ovos foi pouco afetada, sendo a taxa de eclosão de aproximadamente 80% no grupo infectado, enquanto que, nos grupos controles estiveram acima de 90% de viabilidade em média.

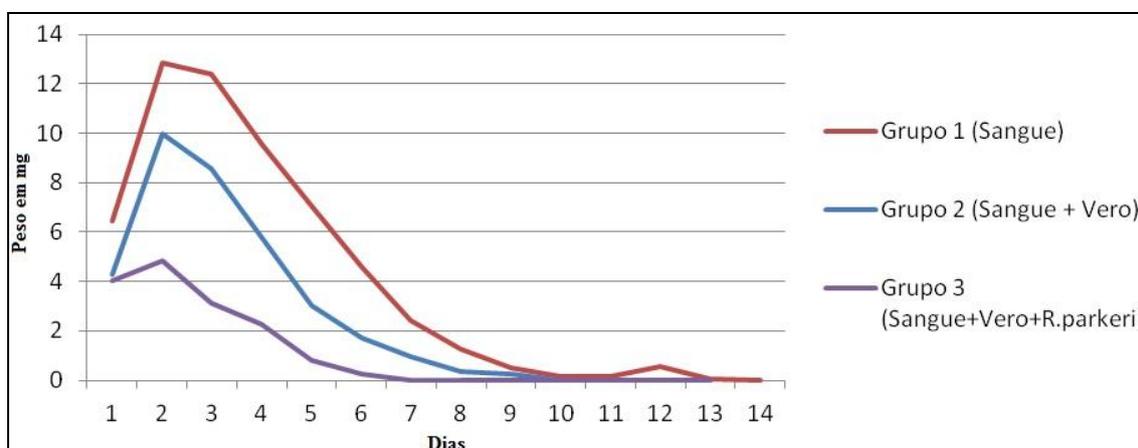


Gráfico 1. Ritmo diário de postura obtidos por fêmeas *Rhipicephalus (Boophilus microplus)* parcialmente ingurgitadas alimentadas, por meio da alimentação artificial, com sangue bovino (G1), sangue bovino com células VERO (G2) e sangue bovino com células VERO infectadas com *Rickettsia parkeri* (G3).

Avaliando os parâmetros biológicos, ficou evidente que a infecção por *R. parkeri* causou um efeito danoso na fase não parasitária das fêmeas de *R. microplus* (Tabela 3). O período de postura, peso total da postura, índice de produção de ovos (IPO) e o índice da eficiência nutricional (IEN) foram reduzidos no grupo infectado com *R. parkeri* e também no G2, apresentando uma diferença estatística ($p < 0,05$) quando comparado com o G1. A média do período de pré-postura teve um pequeno aumento em relação aos grupos controles.

A seguir, estão analisados, separadamente, os carrapatos que não ganharam peso (Tabela 4) e os que ganharam peso (Tabela 5) com a alimentação artificial, nos três grupos do estudo. Esta análise permite avaliar se há algum dano aos carrapatos causados pela *R. parkeri*, sem a influência do ganho de peso.

O grupo de fêmeas de *R. microplus* alimentados artificialmente com sangue bovino adicionado de *R. parkeri*, mesmo sem ganhar peso, foram positivas na PCR. Assim, os parâmetros biológicos também foram afetados, porém em proporções menores do que as fêmeas que ingeriram sangue.

Deste modo, as fêmeas de *R. microplus* positivas (G3), que não ganharam peso na alimentação artificial, reduziram significativamente ($p < 0,05$) o período de postura, o peso total da postura e o índice de produção de ovos em relação ao G1 (Sangue).

Quando analisados os carrapatos que ganharam peso (Tabela 5), observa-se que o período de postura, o peso total da postura e o índice de produção de ovos foram significativamente maiores ($p < 0,05$) nos grupos controles (G1 e G2) em relação ao grupo infectado (G3).

Tabela 3. Parâmetros biológicos referente à fase não-parasitária de fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* alimentadas artificialmente usando sangue bovino (G1), sangue bovino + células VERO (G2) e sangue bovino + células VERO infectadas com *Rickettsia parkeri* (G3).

Parâmetros Biológicos	Grupos de carrapatos alimentados artificialmente com sangue bovino		
	G1 (Sangue)	G2 (Sangue + VERO)	G3 (Sangue + <i>Rickettsia</i>)
	Média ± Desvio Padrão (Mínimo – Máximo)	Média ± Desvio Padrão (Mínimo – Máximo)	Média ± Desvio Padrão (Mínimo – Máximo)
	N=20	N=20	N=40
Período de Pré-postura (dias)	2,90 ± 0,45 ^a (2 – 4)	2,68 ± 0,48 ^a (2 – 3)	3,03 ± 0,48 ^a (2 – 5)
Período de Postura (dias)	11,10 ± 1,37 ^a (7 – 13)	10,26 ± 1,85 ^{ab} (7 – 12)	5,35 ± 3,40 ^b (1 – 14)
Peso da Postura (mg)	57,69 ± 45,36 ^a (9,56 – 135,11)	34,84 ± 25,41 ^b (5,23 – 85,03)	16,34 ± 11,32 ^b (0,96 – 57,0)
Índice de produção de ovos (%)	43,81 ± 14,04 ^a (23,72 – 61,55)	39,02 ± 12,38 ^{ab} (13,08 – 55,6)	21,90 ± 12,22 ^b (0,94 – 55,57)
Índice da Eficiência Nutricional (%)	70,60 ± 14,39 ^a (40,47 – 89,03)	67,39 ± 15,16 ^a (31,13 – 101,25)	56,46 ± 19,13 ^a (9,5 – 81,48)

Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas não diferiram entre si pelos testes ANOVA ou Kruskal-Wallis, ambos ao nível de 5% de significância.

Tabela 4. Parâmetros biológicos referente à fase não-parasitária de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas artificialmente usando sangue bovino (-), sangue bovino + células VERO (-) e sangue bovino + células VERO infectadas com *Rickettsia parkeri* (+), avaliação dos carrapatos sem ganho de peso.

Aspectos Biológicos	Grupos de carrapatos alimentados artificialmente sem ganho de peso		
	Sangue (-) Média ± Desvio Padrão (Mínimo – Máximo) N=8	Sangue + VERO (-) Média ± Desvio Padrão (Mínimo – Máximo) N=8	Sangue + VERO (+) Média ± Desvio Padrão (Mínimo – Máximo) N=18
Período de Pré-postura (dias)	2,89 ± 0,60 ^a (2 – 4)	2,88 ± 0,35 ^a (2 – 3)	3,17 ± 0,62 ^a (2 – 5)
Período de Postura (dias)	11,33 ± 1,22 ^a (10 – 13)	9,25 ± 1,83 ^a (7 – 12)	7,94 ± 3,46 ^b (2 – 14)
Peso da Postura (mg)	53,81 ± 47,25 ^a (9,56 – 124,24)	16,79 ± 8,19 ^b (5,23 – 29,23)	13,94 ± 8,71 ^b (0,96 – 32,51)
Índice de produção de ovos (%)	40,53 ± 15,15 ^a (23,72 – 59,26)	31,57 ± 10,92 ^{ab} (13,08 – 46,99)	25,64 ± 13,24 ^b (2,46 – 55,57)
Índice da Eficiência Nutricional (%)	70,87 ± 15,26 ^a (48,04 – 89,03)	63,17 ± 19,51 ^a (31,13 – 101,25)	53,16 ± 20,65 ^a (9,50 – 80,53)

Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas não diferiram entre si pelos testes ANOVA ou Kruskal-Wallis, ambos ao nível de 5% de significância.

Tabela 5. Parâmetros biológicos referente à fase não-parasitária de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas artificialmente usando sangue bovino (G1), sangue bovino + células VERO (G2) e sangue bovino + células VERO infectadas com *Rickettsia parkeri* (G3), avaliação dos carrapatos com ganho de peso.

Aspectos Biológicos	Grupos de carrapatos alimentados artificialmente com ganho de peso		
	G1 (Sangue) Média ± Desvio Padrão (Mínimo – Máximo) N=12	G2 (Sangue + VERO) Média ± Desvio Padrão (Mínimo – Máximo) N=11	G3 (Sangue + <i>Rickettsia</i>) Média ± Desvio Padrão (Mínimo – Máximo) N=22
Período de Pré-postura (dias)	2,91 ± 0,30 ^a (2 – 3)	2,55 ± 0,52 ^a (2 – 3)	2,91 ± 0,29 ^a (2 – 3)
Período de Postura (dias)	10,91 ± 1,51 ^a (7 – 12)	11,00 ± 1,55 ^a (8 – 12)	3,23 ± 1,15 ^b (1 – 6)
Peso da Postura (mg)	60,85 ± 45,81 ^a (12,54 – 135,11)	47,97 ± 25,79 ^a (14,06 – 85,03)	18,31 ± 12,95 ^b (1,8 – 57,0)
Índice de produção de ovos (%)	46,49 ± 13,16 ^a (27,22 – 61,55)	44,44 ± 10,75 ^a (27,49 – 55,61)	18,84 ± 10,67 ^b (0,94 – 41,39)
Índice da Eficiência Nutricional (%)	70,38 ± 14,40 ^a (40,47 – 85,64)	70,46 ± 11,07 ^a (41,77 – 83,23)	59,40 ± 17,74 ^a (15,25 – 81,48)

Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas não diferiram entre si pelos testes ANOVA ou Kruskal-Wallis, ambos ao nível de 5% de significância.

Dentro do grupo infectado, quando as fêmeas de *R. (B.) microplus* foram avaliadas em relação ao ganho de peso (quantidade de sangue ingerida) foi possível perceber que, quanto maior o ganho de peso menor a média do período de pré-postura, do período de postura e índice de produção de ovos e maior o peso da postura. Porém o único parâmetro avaliado que foi expressivamente reduzido com a maior ingestão de sangue e, conseqüentemente, maior carga de *R. parkeri* foi o período de postura (Tabela 6).

O DNA dos *pools* de larvas de cada fêmea infectada foi testado à PCR para a constatação de transmissão transovariana por *R. parkeri*. Pelo menos 11 dos 20 *pools* de larvas testados foram positivos para os genes *gltA* (Figura 2) e *ompA*. A transmissão transovariana ocorreu de maneira irregular nas fêmeas de *R. microplus* utilizadas, pois apenas um *pool* apresentou produto amplificado de coloração mais intensa, os outros produtos produzidos tiveram variação na intensidade da coloração, sendo alguns quase imperceptíveis.

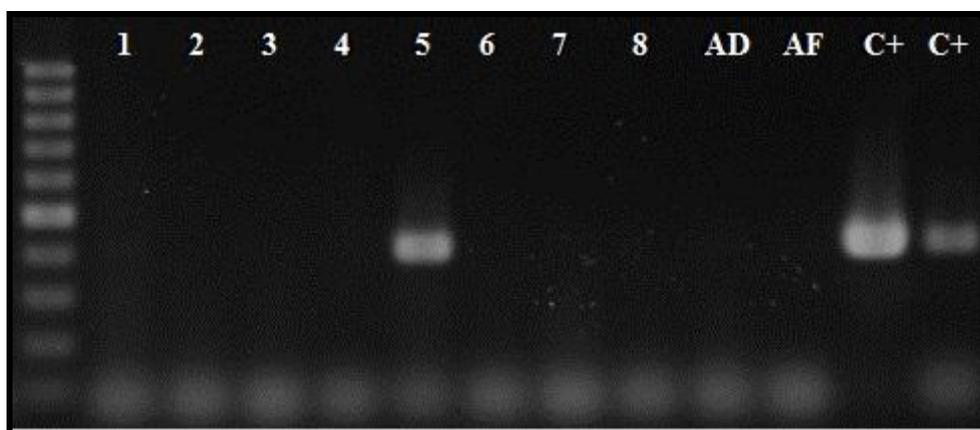


Figura 2. Fotografia de eletroforese em gel de agarose a 1,5%, corado com Brometo de Etídio, evidenciando a amplificação de 401 pb do gene *gltA* em *pool* de larvas providas de fêmeas infectadas artificialmente por *Rickettsia parkeri*. Canaletas numeradas de 1 a 8: *pools* de larvas por fêmea; AD: Reação controle negativo antes da distribuição dos DNA's; AF: Reação controle negativo após a aplicação do controle positivo; C+ Controles positivos de *R. parkeri* cepa NOD;. Marcador de tamanho molecular em escala de 100 pares de bases (INVITROGEN®)

Em relação à infestação dos cobaios por larvas de *R. (B.) microplus* infectadas por *R. parkeri*, nenhum cobaio apresentou sintomatologia característica da rickettsiose causada pela *R. parkeri*, como febre, escaras ou reação escrotal (edema e necrose escrotal) e também nenhum dos quatro animais foi reativo à RIFI. A temperatura retal dos cobaios do 0 ao 21º dia pós-infestação estão apresentadas no Gráfico 2. Poucas larvas se fixaram aos animais infestados, muitas permaneciam na toca sem se alimentar. Por volta do 15º pós-infestação, uma ninfa foi observada em apenas um animal e ao final das infestações (30 dias após a infestação) não havia carrapatos adultos nos cobaios e nenhum carrapato vivo (larva e/ou ninfa) pode ser encontrado.

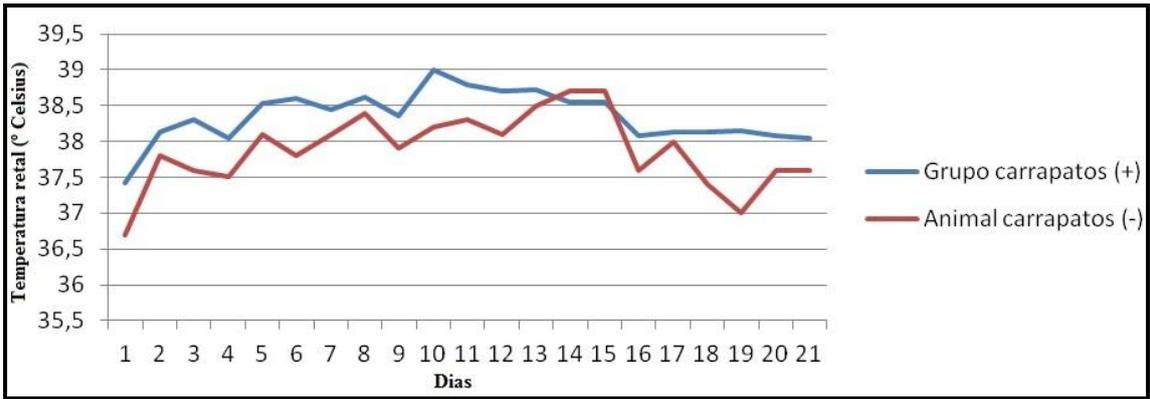


Gráfico 2. Temperatura retal dos cobaios infestados com larvas de fêmeas *Rhipicephalus (B.) microplus* alimentadas artificialmente com sangue + células VERO infectadas (+) e de um animal infestado com larvas de fêmeas alimentadas artificialmente com sangue + células VERO (-).

Tabela 6. Parâmetros biológicos referente à fase não-parasitária de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* alimentadas artificialmente usando sangue bovino + células VERO infectadas com *Rickettsia parkeri* (+), avaliação em relação ao ganho de peso.

Aspectos Biológicos	Grupo de carrapatos alimentados artificialmente com Células VERO infectadas		
	Sem ganho de peso Média ± Desvio Padrão (Mínimo – Máximo) N= 18	Ganho entre 4,2 ≤ 44,7 mg Média ± Desvio Padrão (Mínimo – Máximo) N= 11	Ganho entre 52,4 ≤ 169,3 mg Média ± Desvio Padrão (Mínimo – Máximo) N= 11
Período de Pré-postura (dias)	3,17 ± 0,62 ^a (2 – 5)	3,00 ± 0,00 ^a (3 – 3)	2,82 ± 0,4 ^a (2 – 3)
Período de Postura (dias)	7,94 ± 3,46 ^a (2 – 14)	3,36 ± 0,92 ^b (3 – 6)	3,09 ± 1,38 ^b (1 – 5)
Peso da Postura (mg)	13,94 ± 8,71 ^a (0,96 – 32,51)	15,27 ± 7,86 ^a (7,11 – 33,0)	21,35 ± 16,43 ^a (1,8 – 57,0)
Índice de produção de ovos (%)	25,64 ± 13,24 ^a (2,46 – 55,57)	21,43 ± 8,10 ^a (10,60 – 33,75)	16,25 ± 12,60 ^a (0,94 – 41,39)
Índice da Eficiência Nutricional (%)	53,16 ± 20,65 ^a (9,50 – 80,53)	61,78 ± 10,08 ^a (45,00 – 76,01)	56,42 ± 24,81 ^a (15,25 – 81,48)

Médias seguidas de letras minúsculas iguais nas linhas não diferiram entre si pelos testes ANOVA ou Kruskal-Wallis, ambos ao nível de 5% de significância.

6 DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo experimental avaliando aspectos biológicos envolvendo uma espécie de rickettsia patogênica (*R. parkeri*) e o carrapato monoxeno *R. microplus*. Isso foi possível, graças ao advento da técnica de alimentação artificial, pois a infecção experimental de carrapatos por rickettsias patogênicas, geralmente é realizada utilizando um hospedeiro mamífero susceptível amplificador (SAKAI et al., 2014). A escassez de dados de espécies de mamíferos amplificadores de *R. parkeri* dificulta a realização de infecções dessa rickettsia à carrapatos para estudos de sua interação. Além disso, essa espécie de carrapato monoxeno é extremamente específica, tornando ainda mais difícil sua infecção utilizando hospedeiros que não sejam de sua predileção.

Apesar de ser considerado pouco relevante na epidemiologia da Febre Maculosa, o carrapato *R. microplus* tem sido encontrado infectado por rickettsias do GFM em diversas áreas (BERMUDEZ et al., 2009; MOURA-MARTINIANO et al., 2014; PESQUERA et al., 2015). Até o momento, não está bem elucidado a participação deste carrapato na epidemiologia das rickettsias, porém é possível que, a aquisição de rickettsias patogênica por *R. microplus* possa ocorrer por meio dos mecanismos de infecção como a co-alimentação com um carrapato infectado e a alimentação em um hospedeiro rickettsaêmico (SOCOLOSVSKY et al., 2009).

A cepa de *R. parkeri* utilizada no presente estudo foi isolada de *Amblyomma triste* coletado de uma área alagada do Município de Paulicéia-SP (SILVEIRA et al. 2007). Nessas áreas, o Cervo-do-Pantanal (*Blastocerus dichotomus*) tem sido implicado como o principal hospedeiro da fase adulta deste carrapato (SZABO et al., 2007; SZABO et al., 2003). Os cervídeos costumam pastejar em área utilizadas para a bovinocultura e, por esse motivo, frequentemente são parasitados pelo carrapato *R. microplus* (SZABO et al., 2003). Da mesma forma, o bovino também pode ser parasitado pelo carrapato *A. triste* (VENZAL et al., 2008). Uma possível co-alimentação do *R. microplus* com um *A. triste* infectado por *R. parkeri* em um bovino ou até mesmo em um cervídeo poderá ocasionar essa infecção reproduzida *in vitro* nesse estudo.

Por meio da técnica de alimentação artificial foi possível infectar 100% das fêmeas parcialmente ingurgitadas, após o período de exposição, mesmo sem ganhar peso. Macaluso et al. (2001) e Macaluso et al. (2002) também utilizaram desse mecanismo e, a partir de tubos capilares, infectaram *D. variabilis* com *Rickettsia montana* e *Rickettsia rhipicephali*. Porém, ao invés de sangue foi utilizado o meio de cultivo e apesar de ter infectado 100% das fêmeas, a ingestão mensurada por Macaluso et al. (2001) foi pequena (1,37 µl em média). A presença das células VERO como componente na alimentação (infectadas ou não), provavelmente, interferiu no ganho de peso das fêmeas *R. microplus*. Esse ocorrido pode ser uma possível explicação para a diminuição dos valores dos parâmetros biológicos das fêmeas do G2 (Tabela 1).

Os valores tabelados neste estudo revelaram que o período de postura, peso total da postura e o IPO foram nitidamente afetados com a infecção por *R. parkeri* em *R. microplus*. Este fato foi evidenciado, principalmente, quando se avaliou apenas as fêmeas que ganharam peso após a alimentação (Tabela 5). O efeito deletério de rickettsias patogênicas e não patogênicas aos carrapatos, sempre relatado (BURGDORFERI, 1985; NIEBYLSKI; PEACOCK; SCHWAN, 1999; LABRUNA et al., 2008b; LABRUNA et al., 2011; NIERI-BASTOS et al., 2013), é apontado como um fator primordial para a baixa taxa de infecção entre os artrópodes (BURGDORFERI; BRINTON, 1975; GUEDES et al., 2005; PINTER; LABRUNA, 2006).

Diferente do que aconteceu com a infecção *in vitro* de *R. microplus*, Nieri-Bastos et al. (2013) não observaram diferenças estatísticas no peso total dos ovos e no IPO entre as fêmeas do carrapato *A. triste* naturalmente infectadas e fêmeas não infectadas por *R. parkeri*. Não se pode concluir que, a *R. parkeri* e o carrapato *A. triste* desenvolveram uma relação simbiótica perfeita, ou que a infecção é permanente e mutuamente benéfica, apesar de seu relacionamento de longo prazo, no entanto, estes dados mostraram que a relação entre *R. parkeri* e o carrapato *A. triste* é mais antiga, portanto, menos prejudicial que a relação ao carrapato *R. microplus*.

A transmissão transovariana ocorrida nos carrapatos infectados artificialmente pode ser considerada um dado importante observado neste estudo. Transmissão transovariana de diferentes agentes rickettsiais tem sido relatadas em muitas espécies de carrapatos (SOCOLOVSKY et al., 2009). Segundo Burgdorferi; Brinton (1975) a infecção transovariana da *R. rickettsii* em fêmeas do carrapato *Dermacentor andersoni* depende diretamente da fase em que o carrapato infectou-se com a bactéria, sendo que quando isto ocorre na fase adulta a transmissão é inexistente ou muito baixa, pois não haveria tempo suficiente para colonizar o ovário e penetrar nos ovócitos. No presente estudo, essa infecção ocorreu no período final da alimentação da fase adulta, mesmo assim, houve a transmissão da rickettsia pela maioria das progenitoras para suas progêneses e, em uma fêmea, essa transmissão ocorreu de forma contundente.

A escolha de cobaios se deu, pela possibilidade de ocorrência de uma sintomatologia clássica de *R. parkeri* como observado por Goddard (2003). Apesar de ter ocorrido transmissão transovariana, não foi possível observar transmissão horizontal de *R. parkeri* por larvas de *R. microplus* provindas dessas fêmeas infectadas à cobaios. A espécie *R. microplus* tem o bovino, como hospedeiro preferencial. Porém, apesar do alto grau de especificidade, esta espécie é capaz de utilizar hospedeiros alternativos, incluindo o homem, quando necessário (SOARES et al., 2007). No entanto, não podemos concluir que, *R. microplus* não tem competência vetorial para transmitir *R. parkeri*, pois, aparentemente, os cobaios não se apresentaram como bons hospedeiros para o carrapato *R. microplus*. Entretanto, novos estudos deverão ser realizados utilizando o bovino como modelo experimental.

CAPÍTULO II

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE *Rickettsia parkeri* EM *Monodelphis domestica*

1 RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar a infecção e o papel de *Monodelphis domestica* como hospedeiros amplificadores de *R. parkeri* para carrapatos *Amblyomma sculptum*. Dez espécimes machos de *M. domestica* foram inoculados com PBS + macerado de carrapatos + 10^6 células VERO infectadas com *R. parkeri*. Em 7 animais a aplicação foi feita por via intramuscular (IM) e 3 por via intraperitoneal (IP). Um macho (animal controle) recebeu, por via IP, 1 ml do mesmo veículo utilizado para inoculação. Os três animais inoculados por IP foram infestados por larvas e ninfas de *A. sculptum* entre o 2º e 9º dia pós-infecção (DPI). A parasitemia foi acompanhada do 3º ao 9º DPI por meio da PCR usando os primers 17kDa e *ompA*. Os animais foram avaliados clinicamente. Dos animais infectados por via IM, apenas um apresentou-se positivo no sangue no 5º DPI. Os três infectados por IP foram positivos no sangue no 2º, 5º, 7º e 9º DPI. Dos 10 pools de carrapatos recuperados, 6 apresentaram bandas positivas para os genes testados. O rim, fígado, coração e o baço de um animal infectado por via IM também foram positivos. Houve um aumento da temperatura retal dos animais experimentados apenas nos 3 primeiros DPI. Os animais inoculados por IP apresentaram prostração, pêlos arrepiados e emagrecimento. A espécie *M. domestica* apresentou uma parasitemia suficiente para transmitir ao carrapato a bactéria *R. parkeri*, portanto essa espécie pode atuar como amplificador desse agente, uma vez que frequentemente esse marsupial é encontrado em diferentes regiões sendo parasitado por fases imaturas de carrapatos do gênero *Amblyomma*.

2 ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the rickettsial infection and the role of *Monodelphis domestica* as hosts amplifiers of *Rickettsia parkeri* to *Amblyomma sculptum* ticks. Ten specimens of *M. domestica* males were inoculated with macerated ticks and *R. parkeri*. In 7 animals the application was made by intramuscular (IM) and 3 intraperitoneally (IP). A male (animal control) received via IP, 1 ml of the same vehicle used for inoculation. The three animals inoculated IP were infested with larvae and nymphs of *A. sculptum* between the 2nd and 9th day post-infection (DPI). The parasitaemia was accompanied by the 3rd to 9th DPI by PCR using primers *17kDa* and *ompA*. The animals were evaluated clinically. Of animals infected intramuscularly, only a positive blood introduced himself on the 5th DPI. The three infected IP were positive in the blood 2, 5, 7 and 9 DPI. Of the 10 pools of recovered ticks, 6 had positive bands for the tested genes. The kidney, liver, heart and spleen of an animal infected intramuscularly were also positive. There was an increase in rectal temperature of the animals experienced only the first at the 3^o DPI. The animals inoculated IP presented prostration, rough hair coat and weight loss. The *M. domestica* species showed parasitemia sufficient to transmit the *R. parkeri* bacteria to ticks, therefore this kind can act as an amplifier of this agent, since this often marsupial is found in different regions being parasitized by immature stages of *Amblyomma* ticks of the genus .

3 INTRODUÇÃO

Rickettsia parkeri é uma bactéria Gram-negativa, membro do grupo da febre maculosa e foi isolada pela primeira vez no Texas, Estados Unidos no ano de 1939 (PARKER, 1939). Na América do Sul foi detectada pela primeira vez no Uruguai em *Amblyomma triste* (VENZAL et al., 2004) e no Brasil há relatos de casos não fatais dessa rickettsiose, possivelmente, ligados a uma cepa denominada de Mata Atlântica tendo o carrapato *Amblyomma ovale* como principal vetor (SABATINI et al., 2010), mas o carrapato *A. triste* pode estar envolvido em algumas regiões (SILVEIRA et al., 2007).

Monodelphis domestica é um pequeno marsupial presente na América do Sul. Essa espécie animal vem sendo utilizada em estudos experimentais em diversas partes do mundo. Foi a primeira espécie de marsupial que teve seu genoma todo sequenciado (MIKKELSEN et al. 2007).

Alguns animais silvestres são reconhecidos como amplificadores de rickettsias patogênicas, dentre eles, podemos citar os marsupiais (HORTA et al. 2009). Por serem de porte pequeno e terem hábitos crepusculares e noturnos, esses animais percorrem facilmente diversas áreas, aumentando as possibilidades de dispersão ou recolonização de carrapatos (PEREZ et al., 2008).

No Uruguai, marsupiais da espécie *Monodelphis dimidiata* são reconhecidos como bons hospedeiros do carrapato *A. triste* na fase imatura (VENZAL et al., 2008). Deste modo, o objetivo desse estudo foi avaliar a infecção de *R. parkeri* em *M. domestica* e a transmissão dessa rickettsia para larvas e ninfas de *Amblyomma sculptum*, caracterizando, esse marsupial, como uma possível espécie amplificadora desse agente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Origem e manutenção de *Monodelphis domestica* (Cuícas) em laboratório

Dezesseis exemplares adultos de *M. domestica* (cuícas) cedidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (BC-UFMS) foram utilizados no experimento. Os animais tinham idades entre 6 a 24 meses, foram mantidos em caixas de polipropileno individuais com cama de maravalha. Diariamente recebiam ração peletizada CATCHOW® (seguindo recomendações do Biotério de origem) e água *ad libitum*. O recinto era provido de condições ideais de ventilação, com ar condicionado para manter uma temperatura da sala em aproximadamente 26°C e impedir excesso de odores (Figura 1). Ao ambiente de vivência estava presente um abrigo de plástico utilizado como enriquecimento ambiental, pois se trata de animais de hábitos noturnos que vivem entocados.



Figura 1. Biotério de criação dos animais utilizados no experimento, em destaque, a temperatura da sala apresentando aproximadamente 26° Celsius.

4.2 Aprovação do Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA) e autorização do IBAMA

Esse estudo está de acordo com os princípios éticos e experimentação animal sendo aprovado pelo Comitê de ética ao uso de animais sob o protocolo número 107/2014 em reunião extraordinária (Anexo I).

Por se tratar de espécie nativa brasileira, o BC-UFMS possui um Certificado de regularidade no IBAMA, sob os cadastros número 1621754 e 271610 que permitem o uso de recursos naturais envolvendo importação de fauna nativa brasileira, utilização do

patrimônio genético natural, introdução de espécies geneticamente modificadas e criadouro científico de fauna silvestre para fins de pesquisa.

4.3 Inóculo de *Rickettsia parkeri*

A cepa At24 de *R. parkeri*, originalmente isolada do carrapato *Amblyomma triste* no município de Paulicéia, estado de São Paulo, Brasil (SILVEIRA et al., 2007), cedida pelo Dr. Adriano Pinter da SUCEN-SP foi utilizada para a infecção de *M. domestica*.

Para o estudo, uma alíquota de *R. parkeri* foi descongelada do nitrogênio líquido e inoculada em um frasco de 75 cm² contendo uma monocamada de células VERO. Quando a monocamada apresentou-se próxima de 100% infectada (7º dia pós-infecção), foi desprendida do fundo do frasco, transferida para um tubo de polipropileno de 15 ml e centrifugada à 5300 xg por 10 minutos à uma temperatura de 4º C. O meio DMEM foi todo retirado, e para ressuspender as células infectadas foi usado um macerado de carrapatos adultos como descrito no item 4.4 (Figura 2).

4.4 Preparo do veículo de inoculação

Esperando um melhor desempenho em relação à patogenicidade da *R. parkeri*, carrapatos das espécies *R. (B.) microplus* (adultos recém alimentados em bezerros), *Rhipicephalus sanguineus* e *Amblyomma sculptum* (adultos em jejum) foram mantidos em estufa de B.O.D (Biological Oxygen Demand) à 37º Celsius por 24 horas (GILFORD;PRICE, 1955; SPENCER;PARKER, 1923; GALLETTI et al. 2013). Após esse tempo, os espécimes (15 machos e 15 fêmeas de cada espécie) passaram por uma imersão de 10 segundos em álcool, seguido de uma lavagem em hipoclorito a 1% e água destilada. Uma vez lavados, todos os indivíduos das três espécies de carrapatos foram colocadas em um Becker e macerados com auxílio de um pistilo. A massa de macerado de carrapatos foi suspensa em PBS, homogeneizada, transferida para um tubo de polipropileno de 15 ml e centrifugada à uma velocidade de 500 xg por 5 minutos. O sobrenadante foi utilizado como veículo para inoculação de *R. parkeri*. Esses carrapatos pertencem à colônia do Laboratório de Doenças Parasitárias – UFRRJ e são livres de infecção por rickettsias, atestando sua negatividade através da avaliação de seus ancestrais por meio da PCR utilizando os *primers* *gltA* e *ompA* descritos no item 4.9.

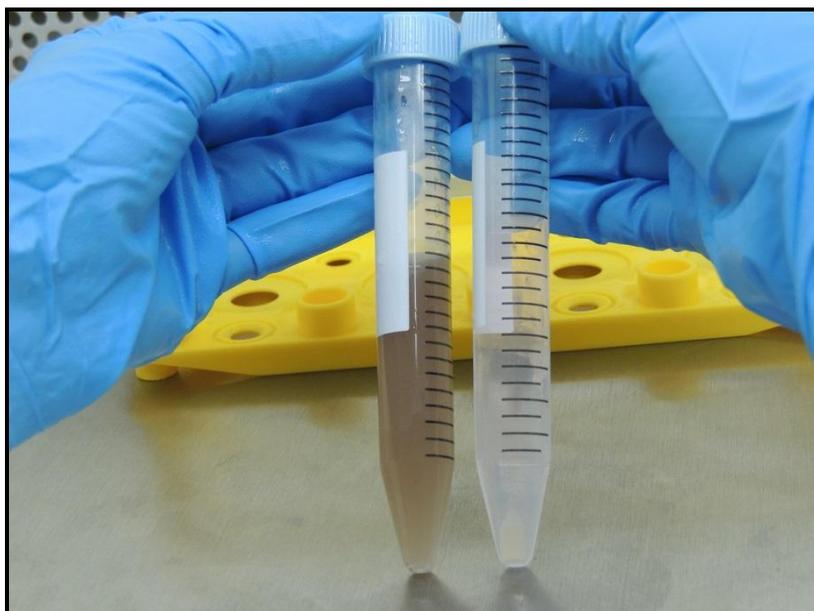


Figura 2. Tubos de polipropileno de 15 ml contendo o inóculo utilizado para infectar os animais. Tubo da esquerda com macerado de carrapatos + PBS e tubo da direita com o *pellet* de células VERO infectadas com *Rickettsia parkeri*.

4.5 Delineamento experimental

Foram utilizados 15 espécimes de *M. domestica*. Estes animais foram divididos em 4 grupos como mostra a tabela 1. O G1 possui um número O volume do inóculo aplicado aos animais nos grupos G1, G2 e G3 foi de 1 ml e o veículo infectado estava em uma concentração de 10^6 células VERO infectadas com *R. parkeri* por ml. Todos os animais dos grupos G1, G2 e G3 eram machos. A escolha de machos é justificada pela possibilidade de haver reações escrotais (edemas, congestão, necrose) típicas em rickettsioses (GODDARD, 2003; SAKAI et al., 2014). O G4 foi composto por dois machos e duas fêmeas.

Tabela 1. Formação dos grupos de infecção de *Monodelphis domestica* por *Rickettsia parkeri*.

Grupos	Número de animais	Via de inoculação	Inóculo	Categoria
G1	7	Intramuscular	Macerado de carrapatos + <i>Rickettsia parkeri</i>	Infectado
G2	3	Intraperitoneal	Macerado de carrapatos + <i>Rickettsia parkeri</i>	Infectado
G3	1	Intraperitoneal	Macerado de carrapatos	Controle
G4	4	-	Sem inóculo	Saúde

Todos os dias os animais foram avaliados clinicamente e a temperatura retal (Figura 4) foi aferida até 15° DPI (GODDARD, 2003). Um animal do G1 que apresentou temperatura acima de 35° Celsius por 3 dias consecutivos foi eutanasiado, e após a necropsia, o baço, coração, rim e fígado foram coletados para a detecção da presença de *R. parkeri* por meio da PCR.

4.6 Infestação por carrapatos *Amblyomma sculptum* nos *Monodelphis domestica* infectados experimentalmente (Xenodiagnóstico)

Os animais do G2 foram infestados no 2°, 5°, e 9° DPI com 30 ninfas e aproximadamente 15 larvas de *A. sculptum* (1 mg de ovos). As infestações foram efetuadas diretamente no dorso dos animais (Figura 3) e transferidos 3 dias após a primeira infestação para gaiolas suspensas que ficaram dentro das caixas de polipropileno forradas com papel filtro branco no fundo e com fita gomada dupla face no entorno (Figura 3). Os carrapatos que se fixaram foram recuperados em 5 a 7 dias pós-infestação e estocados em freezer a 20° Celsius negativos até o momento da extração do DNA. Os carrapatos da espécie *A. sculptum* pertenciam à colônia de carrapatos do Laboratório de Doenças Parasitárias da UFRRJ que são livres de infecção por rickettsias, atestando sua negatividade através da avaliação de seus ancestrais por meio da PCR utilizando os *primers gltA* e *ompA* descritos no item 4.9.



Figura 3. Infestação por larvas e ninfas de *Amblyomma sculptum* feita diretamente no dorso dos *Monodelphis domestica* (A) e esquema utilizado após o 3° dia de infestação até a queda de todas as larvas e ninfas ingurgitadas (B).

4.7 Coleta de sangue

O sangue de cada animal foi coletado ao 0, 3, 5, 7 e 9 dias pós-infecção (DPI). A coleta foi feita através de um pequeno corte na veia colateral da cauda e com o auxílio de tubos capilares de microhematócritos contendo heparina, em seguida o sangue retirado foi depositado diretamente em um tubo com anticoagulante EDTA (Figura 4).

Após coletado, o sangue foi armazenado em freezer a 20° Celsius negativos até o momento da extração.

4.8 Preparo das amostras e extração do DNA

Os carrapatos recuperados após o ingurgitamento foram reunidos em pools de acordo com o dia de recuperação e animal recuperado. A extração do DNA dos carrapatos foi feita após a lavagem em água destilada estéril por três vezes. Em seguida foi adicionado 200µL de PBS (phosphate buffered saline), sete esferas de óxido de zircônio de 2 mm e 80 mg de esferas de vidro de 0,1 mm para a trituração em Minibeatbeater BIOSPEC® por 1 minuto.

O volume de sangue retirado dos animais (aproximadamente 50 µL) foi completado com PBS para alcançar um volume final de 200 µL.

A extração do DNA do sangue, órgãos e carrapatos recuperados foi realizada com o Dneasy tissue Kit (QIAGEN®) usando o protocolo recomendado pelo fabricante para extração de DNA de sangue e tecidos de animais.

4.9 Reação em Cadeia de Polimerase (PCR)

A presença de DNA rickettsial foi detectada por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) usando os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) (INVITROGEN/LIFE TECHNOLOGIES®) descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) utilizados para a amplificação de genes rickettsiais por Reação em cadeia da polimerase convencional.

<i>Primer</i>	Gene	Sequência de Nucleotídeo (5' - 3')	Tamanho do Produto amplificado	Referências
CS-78	<i>gltA</i>	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT	401 pb	Labruna et al. 2004
CS-323		GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT		
17 kd1	<i>htrA</i>	GCTCTTGCAACTTCTATGTT	434 pb	Webb et al. 1990
17kd2		CATTGTTTCGTCAGGTTGGCG		
Rr190.70p	<i>ompA</i>	ATGGCGAATATTTCTCCAAA	532 pb	Regenery et al. 1991
Rr190.602n		AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT		

Por serem mais sensíveis quando testados previamente, os genes *gltA* e *htrA* foram utilizados para a triagem. As condições da PCR para esses genes foram idênticas, sendo desenvolvida da seguinte maneira: Em cada reação continha 3 µL de DNA (aproximadamente 200 ng de amostra padronizada a 75 ng/µL), 14,2 µL de água, 2 µL de *primers* (10 µM F+R), 2,5 µL de tampão (10X concentrado), 1,25 µL de MgCl₂ (50 Mm) e 2 µL de DNTP's (2,5 mM) e 0,15µL *Taq Platinum* polimerase (LIFE TECHNOLOGY®) em um volume final de 25µL. A reação foi submetida à desnaturação inicial a 95⁰C por 5 minutos; seguido por 40 ciclos de 20 segundos a 95⁰C para desnaturação; 52⁰C (56⁰ C para o gene *htrA*) para anelamento por 20 segundos e 72⁰C por 25 segundos para extensão; por último uma temperatura de extensão final de 72⁰C por 5 minutos.

A confirmação da infecção rickettsial por *R. parkeri* foi realizada usando o gene *ompA*, específico para rickettsias do GFM. A amplificação se deu da seguinte maneira: em cada tubo de reação continha 3 µL de DNA (150 ng de amostra padronizada a 50

ng/ μ L), 8,0 μ l de água, 0,75 μ L de cada *primer* (10 Mm F+R), e 12,5 μ l *Master mix* (PROMEGA®) em um volume final de 25 ml. A mistura de reação foi submetida à desnaturação à 95°C por 5 minutos; seguido por dez ciclos iniciais de 40 segundos a 95°C para desnaturação; 60°C para anelamento por 45 segundos, baixando 0,5°C a cada ciclo até que o último ciclo o corresse a temperatura de 55°C; 72°C por 45 segundos para extensão. Após esses ciclos iniciais, ocorreram mais 35 ciclos iguais ao décimo ciclo, totalizando 45 ciclos; por último uma temperatura de extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e visualizados sob luz ultravioleta.



Figura 4. Fotos ilustrando os procedimentos realizados para a avaliação da infecção de *Monodelphis domestica* por *Rickettsia parkeri*. A - Contenção e coleta de sangue de *Monodelphis domestica*, acesso por meio de um corte na veia colateral da cauda e com o auxílio de um tubo de microhematócrito; B - Inoculação intramuscular de solução veículo (PBS + macerado de carrapatos) com cultivo de *Rickettsia parkeri* em *Monodelphis domestica* (Grupo 1); C - Inoculação intraperitoneal de solução veículo (PBS + macerado de carrapatos) com cultivo de *Rickettsia parkeri* em *Monodelphis domestica* (Grupos 2 e 3) e D - Medição da temperatura retal dos *Monodelphis domestica* usando termômetro digital.

5 RESULTADOS

As médias diárias da temperatura retal dos quatro grupos estão apresentadas no Gráfico 1. A temperatura retal dos animais não infectados variou entre 32,0 e 34,8° Celsius. Entre os animais infectados, o Grupo 1 teve temperatura retal mínima de 32,1° Celsius e máxima de 35,6° Celsius e o Grupo 2 variou entre 32 e 35,6° Celsius. Existe uma escassez de dados na literatura sobre os parâmetros de normalidade da temperatura retal desta espécie. As observações quanto aos dados da temperatura retal dos animais do G3 (Animal controle) e G4 (grupo saúde), nos leva a crer que a temperatura normal dessa espécie em cativeiro varia entre 32° e 34,5° Celsius.

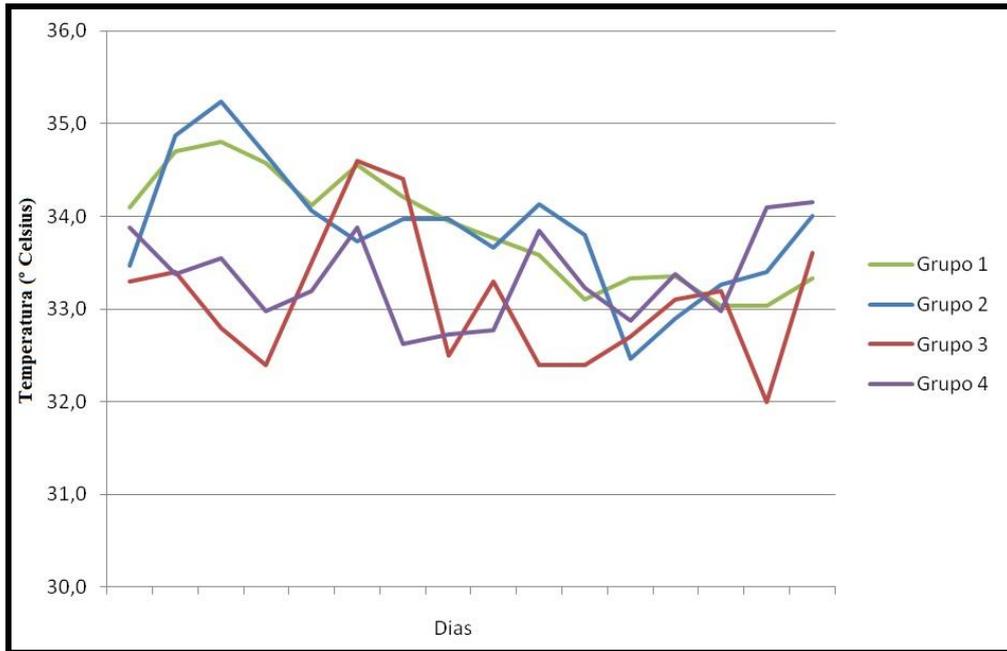


Gráfico 1. Temperatura retal dos marsupiais da espécie *Monodelphis domestica* infectadas e não infectadas por *Rickettsia parkeri* cepa At24, mensurados diariamente por 15 dias após a infecção.

Foi possível observar que, nos três primeiros dias de infecção houve um aumento da temperatura retal nos grupos 1 e 2, enquanto que, os grupos 3 e 4 houve um leve declínio (Gráfico 1).

Como era esperado, clinicamente, nenhum animal dos grupos não infectados (grupos 3 e 4) apresentou sinais e sintomas. E, embora o grupo 1 também não tenha apresentado sintoma aparente, o grupo 2 apresentou agitação em dois animais após a inoculação (intraperitoneal), pêlos arrepiados no 2 e 3° DPI, diminuição do escore corporal até o 9° DPI com normalização em seguida e prostração em um animal no 8° DPI.

Em relação à infestação por carrapatos da espécie *A. sculptum*, a recuperação de larvas e ninfas ingurgitadas (após cinco dias de infestação) foi muito baixa como mostra na tabela 3. Nos dias seguintes às infestações era possível visualizar boa parte das ninfas não alimentadas circulando pelas gaiolas.

Tabela 3. Dinâmica de infestação e recuperação de carrapatos de fases imaturas da espécie *Amblyomma sculptum* em *Monodelphis domestica* infectados, via intraperitoneal, por *Rickettsia parkeri*.

Infestação		Dias pós-infecção (DPI)		Carrapatos ingurgitados recuperados
Larvas (ovos)	Ninfas	Dia de infestação	Dias de recuperação	
1 mg	30	2	7	1 ninfa
1 mg	30	5	10	2 larvas
1 mg	30	9	14	4 ninfas
1 mg	30	15	20	2 larvas e 1 ninfa
-	-	-	21	1 larva e 1 ninfa

As larvas se fixaram por entre os pêlos em diversas partes do corpo, enquanto que as ninfas encontravam-se apenas nas patas dianteiras (Figura 5) e ao redor do ânus.

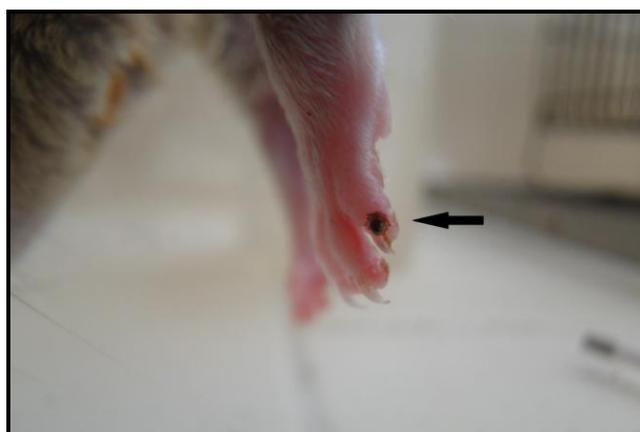


Figura 5. Ninfa do carrapato *Amblyomma sculptum* fixada no membro superior esquerdo de um *Monodelphis domestica* infectado experimentalmente por *Rickettsia parkeri* (seta).

A presença de *R. parkeri* em *M. domestica* infectados experimentalmente foi constatada no momento em que as amostras de DNA extraídas do sangue dos animais infectados (Grupos 1 e 2) apresentaram produtos amplificados quando testadas aos genes *htrA* (Figura 6) e *ompA*. Entretanto, no grupo 1 (intramuscular), apenas o animal 3 ao 5º DPI foi positivo. No grupo 2 (intraperitoneal), todos os três animais apresentaram positividade de maneira diferente. Os animais 8 e 9 amplificaram bandas no 3º e 7º DPI e o animal 10 amplificou em 3º, 5º, 7º e 9º DPI.

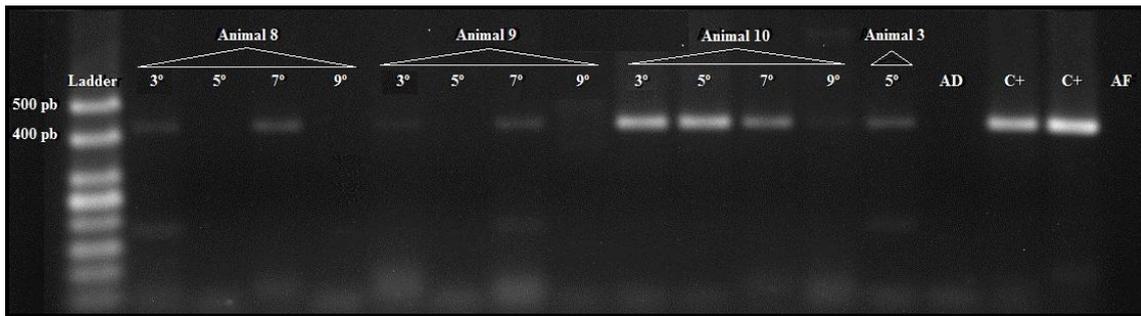


Figura 6. Avaliação da parasitemia dos animais que amplificaram bandas de 434 pares de base para o gene *htrA*. Ladder de 50 pb da Sinapse®. Animais 8, 9 e 10 (Grupo 2), Animal 3 (Grupo 1), Controle de cabine do fluxo (AD), 10^{-3} e 10^{-2} dos Controles positivo *Rickettsia parkeri* cepa NOD e Controle ambiental (AF).

A avaliação molecular utilizando os iniciadores do gene *htrA* também revelou que 7 dos 10 pools de carrapatos recuperados após o ingurgitamento total apresentaram-se positivos (Figura 7), sendo pelo menos um desses *pools* provindo dos três animais infestados (G2). Porém, quando testados ao gene *ompA*, apenas dois foram positivos, sendo um deles, negativo ao gene *htrA*. Todos os quatro órgãos coletados (Rim, coração, fígado e baço) amplificaram produtos específicos quando testados pela PCR para o gene *htrA* (Figura 8) e apenas o coração apresentou-se positivo para o gene *ompA*.

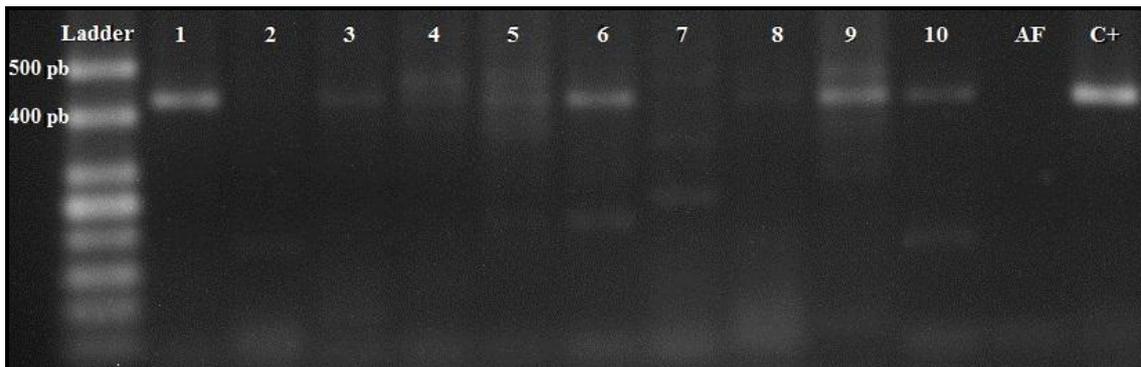


Figura 7. Resultado da PCR dos carrapatos recuperados após alimentados em animais infectados por *Rickettsia parkeri*. Amplificação de bandas de 434 pares de base para o gene *htrA*. Ladder de 50 pb da Sinapse®. Pools numerados de 1 a 10, Controle ambiental (AF), Controle positivo *Rickettsia parkeri* cepa NOD.

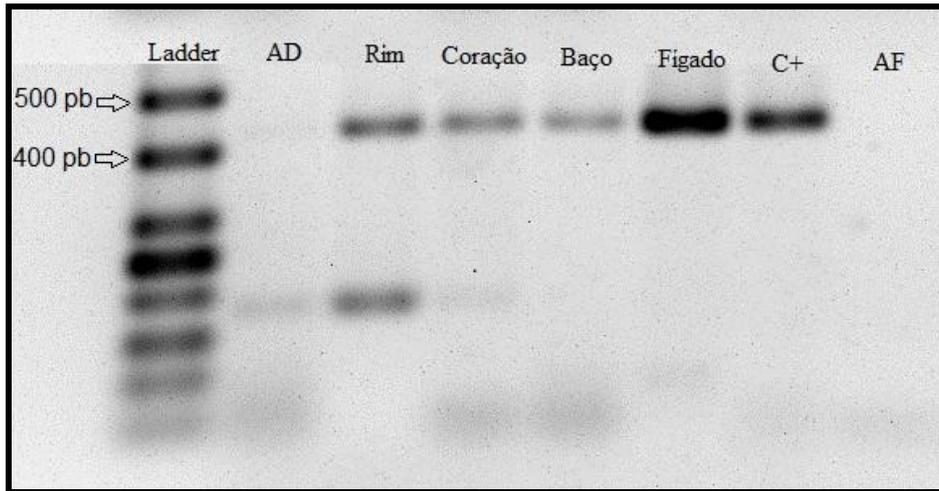


Figura 8. Resultado da reação da PCR dos órgãos do *Monodelphis domestica* infectado por via intramuscular e eutanasiado após apresentar temperatura acima de 35° Celsius por três dias consecutivos. Gene *htrA* mostrando amplificação de 434 pb. Ladder de 50 pb marca Sinapse® AD = Controle do fluxo, Amostras teste, C+ = controle positivo *Rickettsia parkeri* cepa NOD e AF = Controle ambiental.

6 DISCUSSÃO

O presente estudo demonstrou a susceptibilidade do marsupial *M. domestica* à infecção por *R. parkeri* apresentando aumento da temperatura retal, pêlos arrepiados e prostração, diferente do que ocorreu com a infecção de marsupiais da espécie *D. aurita* (gambás) pela mesma cepa de rickettsia (HORTA et al., 2010). Segundo a literatura, a infecção por *R. parkeri* pode ocasionar uma leve febre e uma reação escrotal em cobaias (GODDARD, 2003).

O aumento da temperatura retal dos *M. domestica* infectados por *R. parkeri* ocorreu de forma diferente aos relatos de Goddard (2003), Horta et al. (2010) e Ribeiro (2015), ambos em cobaias.

Em geral as cuícas infectadas apresentaram rickettsaemia intermitente por, pelo menos, 15 dias. Não podemos descartar a possibilidade de alguns desses animais desenvolverem uma infecção mais longa, pois não foi testado por mais tempo. Horta et al. (2009) infectando marsupiais *D. aurita* com *R. rickettsii* observaram uma rickettsaemia, também intermitente, por 26 dias. A bacteremia por *R. rickettsii* relatada para capivaras, pequenos roedores e lagomorfos é de 7 a 12 dias (MCDADE; NEWHOUSE, 1986; BURGDORFER, 1988; SOUZA et al., 2009).

Horta et al. (2010) usando PCR em tempo real (uma técnica considerada mais sensível que a PCR convencional) detectou no sangue, *R. parkeri* positivo no 8º DPI apenas em um gambá (1/4). Da mesma forma, um único carrapato *A. sculptum* que haviam se alimentado em um gambá infectado por via intraperitoneal apresentou-se positivo à PCR. O sucesso da infecção de *M. domestica* por *R. parkeri* com detecção de rickettsaemia e transmissão da bactéria à carrapatos pode estar ligado à reativação da patogenicidade, possivelmente alcançada, devido à adição do homogeneizado de macerado de carrapatos mantidos à 37°C por 24 horas. O aumento na temperatura, assim como o estímulo de alimentação e o processo de muda dos artrópodes são importantes no controle da virulência do rickettsias no vetor (SPENCER; PARKER, 1923; GILFORD; PRICE, 1955; GALLETTI et al., 2013).

As cuícas utilizadas neste estudo, não foram bons hospedeiros para larvas e ninfas do carrapato *A. sculptum*, devido à baixa recuperação após infestação. Embora tenha uma baixa afinidade, ninfas do carrapato *A. sculptum* foram encontradas parasitando, naturalmente, *M. domestica* em áreas de alta infestação no Pantanal Matogrossense (RAMOS, 2013). No estado do Maranhão, Reis et al. (2008) coletou ninfas de *Amblyomma* nas cuícas (*M. domestica*) capturadas, por falta de uma chave de identificação específica para ninfas de *Amblyomma* foram identificadas apenas a nível de gênero. Saraiva et al. (2012) coletou duas larvas de *A. sculptum* em *M. domestica* capturados em um município do estado de Minas Gerais.

Apesar de não se ter relatos de infestações por *A. triste* ou infecções por rickettsias em *M. domestica*, o presente estudo apresentou um possível amplificador de *R. parkeri*. No Uruguai e arredores, um pequeno marsupial é um grande candidato a novas abordagens. *Monodelphis dimidiata*, além de pertencer ao mesmo gênero do *M. domestica*, esta espécie é um dos principais hospedeiros do carrapato *A. triste* na fase imatura (VENZAL et al. 2004).

3 CONCLUSÕES GERAIS

Com base nos resultados obtidos nos dois estudos podemos concluir que:

- Foi possível infectar *R. microplus* com *R. parkeri* por meio da técnica de alimentação artificial.
- *Rickettsia parkeri* causa efeito deletério ao carrapato *R. microplus*, diminuindo diretamente nos parâmetros biológicos da fase não parasitária.
- *Rickettsia parkeri* é transmitida pela forma vertical (transovariana) ao carrapato *Rhipicephalus microplus* mesmo sendo adquirida no terço final da alimentação.
- *Monodelphis domestica* é uma espécie susceptível à infecção por *R. parkeri*.
- *Monodelphis domestica* desenvolve uma rickettsaemia após a infecção intraperitoneal por *R. parkeri* (por pelo menos 15 dias) suficiente para ser fonte de infecção ao carrapato *A. sculptum*.
- O marsupial *M. domestica* é um bom modelo experimental para estudo da infecção por *R. parkeri*.

4 REFERÊNCIAS

- ANGERAMI, R.N.; RESENDE, M.R.; FELTRIN, A.F.C.; KATZ, G.; NASCIMENTO, E.M.; STUCCHI, R.S.B.; SILVA, L.J. Brazilian Spotted Fever: A Case Series from an Endemic Area in Southeastern Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.1078, p.252–254, 2006.
- AZAD, A. F.; WEBB, L.; CARL, M.; DASCH, G. A. Detection of Rickettsiae in arthropod vectors by DNA amplification using the polymerase chain reaction. **Annals New York Academy of Sciences**, v. 590, p. 557–563, 1990.
- BACELLAR, F.C. **Rickettsias isoladas em Portugal: contribuição para identificação e classificação de estirpes**. Tese de doutorado, Universidade de Évora, 1996.
- BENITEZ, D.; CETRÁ, B.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks can complete their life cycle on the Water Buffalo (*Bubalus bubalis*). **Journal of Buffalo Science**, Mississauga, v. 1, n. 2, p.193-197, 2012.
- BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (ACARIDIDA: IXODIDAE): (I. Influence of tick size on egg production). **Acarology**, v. 16, n. 1, p. 52-61, 1974.
- BERMUDEZ, S.E.; EREMEEVA, M.E.; KARPATY, S.E.; SAMUDIO, F.; ZAMBRANO, M.L.; ZALDIVAR, Y.; MOTTA, J.A.; DASCH, G.A. Detection and Identification of Rickettsial Agents in Ticks From Domestic Mammals in Eastern Panama. **Journal of Medical Entomology**. V.46, n.4: p.856- 861, 2009.
- BURGDORFER W., Transovarial transmission: an effective ecological means for the survival of tickborne spotted fever group Rickettsiae, **Annals of the New York Academy of Sciences**, p.265–271, 1985.
- BURGDORFER, W.; BRINTON L.P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v.266, p.61-72, 1975.
- BURGDORFER, W.; FRIEDHOFF, K.T.; LANCASTER JR, J.L. Natural history of tick-borne spotted fever in the USA. Susceptibility of small mammals to virulent Rickettsia rickettsii. **Bull World Health Organ**, v.35, n.2, p.149–153, 1966.
- BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. In: WALKER, D. H. (Ed.). **Biology of rickettsial diseases**. Boca Raton: CRC Inc., p. 33-50, 1988.
- BITTENCOURT, A.J.; FONSECA, A.H.; FACCINI, J.L.H.; BUENO, B.H. Comportamento do *B. microplus* (Canestrini, 1887) (Acari) em infestações artificiais e naturais em diferentes hospedeiros. Arquivo **Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro**, Rio de Janeiro, v.13, n.2, p.173-182, 1990.

CHOMEL, B. Tick-borne infections in dogs – An emerging infectious threat. **Veterinary Parasitology**. V.179, p.294– 301, 2011.

EDWARDS, K.T.; GODDARD, J.; JONES, T.L.; PADDOCK, C.D.; VARELA-STOKES, A.S. Cattle and the natural history of *Rickettsia parkeri* in Mississippi. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.11, n.5:p.485–491, 2011.

GALLETTI, M.F.B.M.; FUJITA, A.; NISHIYAMA JR, M.Y.; MALOSSI, C.D.; PINTER, A.; SOARES, J.F.; DAFFRE, S.; LABRUNA, M.B.; FOGAÇA, A.C. Natural Blood Feeding and Temperature Shift Modulate the Global Transcriptional Profile of *Rickettsia rickettsii* Infecting Its Tick Vector. **Plos One**. V.8, n.10: p.1-12, 2013.

GILFORD J.H.; PRICE W.H. Virulent-avirulent conversion of *Rickettsia rickettsii* *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Science of the USA**.v.41: p.870-873, 1955.

GODDARD, J.; NORMENT, B. R. Spotted fever group rickettsia in the lone star tick, *Amblyomma americanum*. **Journal of Medical Entomology**. V.23: p.465-472, 1986.

GODDARD, J. Experimental Infection of Lone Star Ticks , *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and Exposure of Guinea Pigs to the Agent Experimental Infection of Lone Star Ticks , *Amblyomma americanum* (L.), with *Rickettsia parkeri* and Exposure of Guin. **Journal of Medical Entomology**, v. 40, n. 5, p. 686-689, 2003.

GODDARD, J.; VARELA-STOKES, A.; SMITH, W.; KRISTINE, T. Artificial Infection of the Bed Bug with *Rickettsia parkeri* Artificial Infection of the Bed Bug With *Rickettsia parkeri*. **Journal of Medical Entomology**, v. 49, n. 4, p. 922-926, 2012.

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

GUGLIELMONE, A.A.; NAVA, S.; MASTROPAOLO, M.; MANGOLD, A.J. Distribution and genetic variation of *Amblyomma triste* (Acari: Ixodidae) in Argentina. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.4, n.5, p.386-390, 2013.

GRASPERGE, B. J.; REIF, K. E.; MORGAN, T. D.; SUNYAKUMTHORN, P.; BYNOG, J.; PADDOCK, C. D.; MACALUSO, K. R. Susceptibility of Inbred Mice to *Rickettsia parkeri*. **Infection and Immunity**, v.80, n.5, p.1846–1852, 2012.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

HOOGSTRAAL, H. Ticks in relation to human diseases caused by *Rickettsia* species. **Annual Reviews of Entomology**. V.12, p. 377-420, 1967.

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

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.; SABATINI, G.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWALSKA, M.; CANAL, R.B.; PACHECO, R.C.; MARTINS, T.F.; MATUSHIMA, E.R.; LABRUNA, M.B. Experimental Infection of the Opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia bellii*, and *Rickettsia parkeri* and Evaluation of the Transmission of the Infection to ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, n. 10, p. 959-967, 2010.

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

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.; CAMARGO, L.M.A.; TERRASSINI, F.A.; FERREIRA, F.; SCHUMAKER, T.T.S.; CAMARGO, E.P. Ticks (Acari: Ixodidae) from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. **Systematic & Applied Acarology**, v.10, n.1 p.17-32, 2005b.

LABRUNA, M. B.; JORGE, R. S.; SANA, D. A.; JACOMO, A. T.; KASHIVAKURA, C. K.; FURTADO, M. M.; FERRO, C.; PEREZ, S. A.; SILVEIRA, L.; SANTOS, T. S.; JR. MARQUES S. R.; MORATO, R. G.; NAVA, A.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H.; GOMES, A. A.; CONFORTI, V. A.; AZEVEDO, F. C.; PRADA, C. S.; SILVA, J. C.; BATISTA, A. F.; MARVULO, M. F.; MORATO, R. L.; ALHO, C. J.; PINTER, A.; FERREIRA, P. M.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. **Experimental & Applied Acarology**, v. 36, p. 149–163, 2005a.

LABRUNA, M.B.; MCBRIDE, J.W.; BOUYER, D.H.; CAMARGO, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; WALKER, D.H. Molecular Evidence for a Spotted Fever Group *Rickettsia* Species in the Tick *Amblyomma longirostre* in Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.41, n.3, p.533-537, 2004b.

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

LABRUNA, M.B.; TERASSINI, F.A.; CAMARGO, L.M.A.; BRANDÃO, P.E.; P.E. RIBEIRO, P.E.; ESTRADA-PÉÑA, A. New reports of *Antricola guiglielmonei* and *Antricola delacruzi* in Brazil, and a description of a new Argasid species (Acari). **Journal of Parasitology**, v.94, n.4, p.788-792, 2008a.

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.; 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.

MACALUSO, K. R.; SONENSHINE, D. E.; CERAUL, S. M.; AZAD, A. F. Infection and transovarial transmission of *Rickettsia* in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v. 1, n. 1, p. 45-53, 2001.

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 Reviews Microbiology**, v. 40, p. 287-309, 1986.

MACIEL, J.F. **Detecção de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em galinhas de criação extensiva de uma região endêmica do estado do Rio Grande do Sul e infecção experimental por *Rickettsia parkeri***. 2013. 61 f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) Programa de pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2013.

MEDEIROS, A. P.; SOUZA, A. P.; DE MOURA, A. B.; LAVINA, M. S.; BELLATO, V.; SARTOR, A. A.; NIERI-BASTOS, F. A.; RICHTZENHAIN, L. J.; LABRUNA, M. B. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 8, p. 926-930, 2011.

MELÉNDEZ, R. D.; CORONADO, A.; MUJICA, F.; CERUTTI, F.; MOSQUERA, O. Levels of natural resistance to two *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Corra breed bulls. **Revista de Biología Tropical**, v. 46, n. 3, p. 691-696, 1998.

MERHEJ, V.; RAOULT, D. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics **Biological Reviews**. V.86, p.379-405, 2011.

MIKKELSEN, T.S.; WAKEFIELD, M.J.; AKEN, B.; AMEMIYA, C.T.; CHANG, J.L.; DUKE, S.; GARBER, M.; GENTLES, A.J.; GOODSTADT, L.; HEGER, A.; JURKA, J.; KAMAL, M.; MAUCELI, E.; SEARLE, S.M.; SHARPE, T.; BAKER, M.L.; BATZER, M.A.; BENOS, P.V.; BELOV, K.; CLAMP, M.; COOK, A.; CUFF, J.; DAS, R.; DAVIDOW, L.; DEAKIN, J.E.; FAZZARI, M.J.; GLASS, J.L.; GRABHERR, M.; GREALLY, J.M.; GU, W.; HORE, T.A.; HUTTLEY, G.A.; KLEBER, M.; JIRTLE, R.L.; KOINA, E.; LEE, J.T.; MAHONY, S.; MARRA, M.A.; MILLER, R.D.; NICHOLLS, R.D.; ODA, M.; PAPENFUSS, A.T.; PARRA, Z.E.; POLLOCK, D.D.; RAY, D.A.; SCHEIN, J.E.; SPEED, T.P.; THOMPSON, K.; VANDEBERG, J.L.; WADE, C.M.; WALKER, J.A.; WATERS, P.D.; WEBBER, C.; WEIDMAN, J.R.; XIE, X.; ZODY, M.C.; BROAD INSTITUTE GENOME SEQUENCING PLATFORM; BROAD INSTITUTE WHOLE GENOME ASSEMBLY TEAM; GRAVES, J.A.; PONTING, C.P.; BREEN, M.; SAMOLLO, P.B.; LANDER, E.S.; LINDBLADTOH, K. Genome of the marsupial *Monodelphis domestica* reveals innovation in non-coding sequences, **Nature**, v.447 n.7141, p.167-177, 2007.

MORARU, G. M.; GODDARD, J.; PADDOCK, C. D.; VARELA-STOKES, A. Experimental infection of cotton rats and bobwhite quail with *Rickettsia parkeri*. **Parasites & Vectors**, v.6, n. 70 p.1-5, 2013.

MOURA-MARTINIANO, N.O.; MACHADO-FERREIRA, E.; CARDOSO, K.M.; GEHRKE, F.S.; AMORIM, M.; FOGAÇA, A.C.; SOARES, C.A.G.; GAZÊTA, G.S.; SCHUMAKER, T.T.S. Rickettsia and vector biodiversity of spotted fever focus, Atlantic rain forest biome, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.20, n.3, p.498-500, 2014.

NAVA, S.; ELSHEWANY, Y; EREMEEVA, M.E.; SUMNER, J.W.; MASTROPAOLO, M.; PADDOCK, C.D. *Rickettsia parkeri* in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**. V.14: p.1894–1847, 2008.

NIEBYLSKI, M. L.; PEACOCK, M. G.; SCHWAN, T. G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Applied and environmental microbiology**, v.65, n.2, p.773-778, 1999.

NIERI-BASTOS, F. A. ; SZABÓ, M. P. J. ; PACHECO, R. C.; SOARES, J. F.; SOARES, H. S.; MORAES-FILHO, J.; DIAS, R. A.; LABRUNA, M. B. Comparative Evaluation of Infected and Noninfected *Amblyomma triste* Ticks with *Rickettsia parkeri*, the Agent of an Emerging Rickettsiosis in the New World. **BioMed Research International**, v.2013, p.1-6, 2013.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L. J. ; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma nodosum* ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 103, p. 413-425, 2009.

PADDOCK, C. D.; SUMNER, J. W.; COMER, J. A; ZAKI, S.R.; GOLDSMITH, S. C.; GODDARD, J.; McLELLAN, S. L. F.; TAMMINGA, C. L.; OHL, C. A. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States.

Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America, v. 38, n. 6, p. 805-11, 2004.

PAROLA P.; PADDOCK C.D.;RAOULT D. Tick-borne Rickettsioses around the world: Emerging Diseases Challenging Old Concepts. **Clinical Microbiology Reviews**, v.18, n.4, p.719-756, 2005.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; SOCOLOVSKI, C.; LABRUNA, M. B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ABDAD, M. Y.; STENOS, J.; BITAM, I.; FOURNIER, P. E.; RAOULT, D. Update on Tick- Borne Rickettsioses around the World: a Geographic Approach. **Clinical Microbiology Review** v.26, p.657-702, 2014.

PARKER, R.R.; KOHLS, G.M; COX, G.W.; DAVIS, G.E. Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. **Public Health Reports**. v.54: p.1482–1484, 1939.

PEREZ, C.A.; ALMEIDA, A.F.DE; ALMEIDA, A.; CARVALHO, V.H.B.DE; BALESTRIN, D. DO 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.

PESQUERA, C.; PORTILLO, A.; PALOMAR, A.M.; OTEO, J.A. Investigation of tick-borne bacteria (*Rickettsia* spp., *Anaplasma* spp., *Ehrlichia* spp. And *Borrelia* spp.) in ticks collected from Andean tapirs, cattle and vegetation from a protected area in Ecuador. **Parasites & Vectors**. V.8, n.46: p.1-10, 2015.

PIRANDA, E.M.; FACCINI, J.L.; PINTER, 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.

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

RAMOS, V.N. **Ecologia da interação entre carrapatos e hospedeiros no Pantanal: papel do porco monteiro, do gado Nelore e de pequenos mamíferos para a ixodofauna na sub-região da Nhecolândia – MS**. 2013. 184f. Tese (Doutorado em Ecologia e conservação de recursos naturais). Programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação de Recursos Naturais, Universidade Federal de Uberlândia, MG.

RANGEL, C.P. **Eficiência da Alimentação *in vitro* de fêmeas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2011. 61 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2011.

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

REIF, K. E., M. T. KEARNEY, L. D. FOIL, AND K. R. MACALUSO. Acquisition of *Rickettsia felis* by cat fleas during feeding. *Vector Borne Zoonotic Diseases*, v.1, n.7, p. 963-968, 2011.

REIS, F.S.; BARROS, M.C.; FRAGA, E.C.; PENHA, T.A.; TEIXEIRA, W.C. SANTOS, A.C.G.; GUERRA, R.M.S.N.C. Ectoparasitos de pequenos mamíferos silvestres de áreas adjacentes ao Rio Itapecuru e Área de Preservação Ambiental do Inhamum, Estado do Maranhão, Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 17, supl. 1, p. 69-74, 2008

RIBEIRO, C.C.D.U. **Alimentação de *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae) por meio de membranas de silicone: parâmetros biológicos e infecção *in vitro* de *Rickettsia parkeri***. 2015. 70 f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 2015.

ROMER, Y.; SEIJO, A. C.; CRUDO, F.; NICHOLSON, W. L.; STOKES, A. V.; LASH, R. R.; PADDOCK, C. D. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis, Argentina. **Emerging infectious diseases**, v. 17, n. 7, p. 1169-1173, 2011.

SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. Survey of Ticks (Acari: Ixodidae) and Their *Rickettsia* in an Atlantic Rain Forest Reserve in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, n. 5, p. 913-916, 2010.

SANTOLIN, I.D.A.C.; FAMADAS, K.M.; MCINTOSH, D. Detection and identification of *Rickettsia* agents in ticks collected from wild birds in Brazil by Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism (PCR-RFLP) analysis. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v.35, Supl.2: p.68-73, 2013.

SAKAI, R.K.; COSTA, F.B.; UENO, T.E.; RAMIREZ, D.G.; SOARES, J.F.; FONSECA, A.H.; LABRUNA, M.B.; BARROS-BATTESTI, D.M. Experimental infection with *Rickettsia rickettsii* in an *Amblyomma dubitatum* tick colony, naturally infected by *Rickettsia bellii*. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.5, n.6, p.917-23, 2014.

SARAIVA, D. G.; FOURNIER, G. F. S. R.; MARTINS, T. F.; LEAL, K. P.G.; VIEIRA, F.N.; CÂMARA, E. M. V. C.; COSTA, C. G.; ONOFRIO, V. C.; BATTESTI, D. M. B.; GUGLIELMONE, A. A.; LABRUNA, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. **Experimental & Applied Acarology**, v. 58, n. 2, p. 159-166, 2012.

SILVA, N.; EREMEEVA, M. E.; ROZENTAL, T.; RIBEIRO, G. S.; PADDOCK, C. D.; RAMOS, E. A. G.; FAVACHO, A. R. M.; REIS, M. G.; DASCH, G. A.; LEMOS, E. R. S.; KO, A. I. Eschar-associated spotted fever rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, n. 2, p. 275-278, 2011.

SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; RAMOS, H. G. C.; LABRUNA, M. B. “*Rickettsia parkeri* in Brazil,” **Emerging Infectious Diseases**, v. 13 (n.7): p. 1111–1113, 2007.

SOARES, J. F.; SANGIONI, L. A.; SILVEIRA, F.; VOGEL, F.; BARBOSA DA SILVA, C.F. Parasitismo em ser humano por *B. microplus* (Acari: Ixodidae) em Santa Maria, RS, Brasil. **Ciência Rural**.v.37, n.5: p.1495-1497, 2007.

SOCOLOVSKI, C.; HUYNH, T. P.; DAVOUST, B.; GOMEZ, J.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Transovarial and trans-stadial transmission of *Rickettsiae africae* in *Amblyomma variegatum* ticks. **Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 15, n. 2, p. 317-318, 2009.

SOUZA, C. E.; MORAES-FILHO, J.; OGRZEWAŁKA, 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.

SPOLIDORIO, M. G.; LABRUNA, M. B.; MANTOVANI, E.; BRANDÃO, P. E.; RICHTZENHAIN, L. J.; YOSHINARI, N. H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 3, p. 521-523, 2010.

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

SZABO, M.P.; LABRUNA, M.B.; PEREIRA, M.C.; DUARTE, J.M. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild marsh-deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast Brazil: infestations before and after habitat loss. **Journal of Medical Entomology**.v.40, n.3: p.268-74, 2003.

VARELA-STOKES, V.S.; PADDOCK, C.D.; ENGBER, B.; TOLIVER, M. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma maculatum* Ticks, North Carolina, USA, 2009–2010. **Emerging Infectious Diseases**, v.17, n.12, p.2350-2353, 2011.

VENZAL, J.M.; PORTILLO, A.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; CABRERA, P.A.; OTEO, J.A. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**. V.10: p.1493–1495, 2004.

VENZAL, J.M.; ESTRADA-PEÑA, A.; CASTRO, O.; DE SOUZA, C.G.; FÉLIX, M.L.; NAVA, S.; GUGLIELMONE, A.A. *Amblyomma triste* Koch, 1844 (Acari:

Ixodidae): hosts and seasonality of the vector of *Rickettsia parkeri* in Uruguay. **Veterinary Parasitology**, v.155, p.104–109, 2008.

WEBB, L.; MITCHELL, C.; MALLOY, D. C.; DASCH, G. A.; AZAD, A. F. Detection of murine typhus infection in fleas by using the polymerase chain reaction. **Journal of Clinical Microbiology**. v.28: p.530–534, 1990.

5 ANEXOS



Seropédica 10 de
outubro de 2014

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que foi aprovado o protocolo de número 107/2014 intitulado **“Infecção experimental de *Monodelphis domestica* por *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri* e avaliação da infecção por carrapatos do gênero *Amblyomma*.”** encaminhado pelo Professor (a) do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Aivaldo Henrique da Fonseca. Informamos que foi aprovado em reunião ordinária da CEUA-IV realizada no dia 10 de outubro de 2014, após avaliação do plenário da referida Comissão.

Fabio Barbour Scott
Coordenador CEUA-IV

Jonimar Pereira Paiva
Vice-Coordenador CEUA-IV

Anexo II

Aspectos Biológicos da Fase Não Parasitária de Fêmeas de *Rhipicephalus microplus*

Pesos das fêmeas alimentadas - Pesos das fêmeas após a alimentação artificial e pesos das fêmeas do grupo controle.

Pesos das quenóginas - Pesos obtidos três dias após o término das posturas de cada fêmea.

Pesos das posturas - Pesos totais das posturas de cada fêmea.

Índice de produção de ovos (IPO) - Índice calculado segundo Bennet (1974).

IPO= peso da postura (mg) x 100 / peso da fêmea alimentada (mg)

Índice de eficiência nutricional (IEN) - Índice calculado segundo Bennet (1974).

IEN= peso da postura (mg) x 100 / peso inicial fêmea - quenógina (mg)

Período de pré-postura - Número de dias decorridos entre o final da alimentação e o primeiro dia de postura.

Período de postura - Período entre o primeiro e o último dia de postura de cada fêmea.

Percentual de eclosão - Estimativa visual da quantidade de larvas eclodidas em relação à postura total.

Ritmo de postura diária - Peso da postura diária de cada fêmea.

ANEXO III

Análise multivariada dos 3 grupos de alimentação artificial (Capítulo I)

