

UFRRJ

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

TESE

**Avaliação da Biologia e da Infecção por
Rickettsia rickettsii (Rickettsiales: Rickettsiaceae) em
Haemaphysalis leporispalustris (Acari: Ixodidae)
Utilizando Coelho Doméstico como Hospedeiro**

Luciana Helena Teixeira de Freitas

2007



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

**AVALIAÇÃO DA BIOLOGIA E DA INFECÇÃO POR *Rickettsia rickettsii*
(RICKETTSIALES: RICKETTSIACEAE) EM *Haemaphysalis
leporispalustris* (ACARI: IXODIDAE) UTILIZANDO COELHO
DOMÉSTICO COMO HOSPEDEIRO**

LUCIANA HELENA TEIXEIRA DE FREITAS

Sob a Orientação do Professor

João Luiz Horacio Faccini

e Co-orientação do Professor

Marcelo Bahia Labruna

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

Seropédica, RJ

Maio de 2007

636.932089696

F866a

Freitas, Luciana Helena Teixeira de,

T

1972-

Avaliação da biologia e da infecção por *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) em *Haemaphysalis leporispalustris* (Acari: Ixodidae) utilizando coelho doméstico como hospedeiro / Luciana Helena Teixeira de Freitas. - 2007.

76f. : il.

Orientador: João Luiz Horacio Faccini.
Tese (doutorado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Instituto de Veterinária.

Bibliografia: f. 65-67.

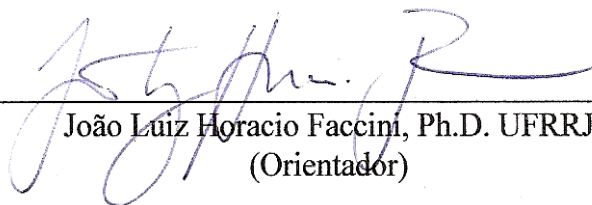
1. Coelho - Parasito - Teses. 2. Carrapato - Biologia - Teses. 3. *Rickettsia* - Teses. I. Faccini, João Luiz Horacio, 1947- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Instituto de Veterinária. III. Título.

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

LUCIANA HELENA TEIXEIRA DE FREITAS

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

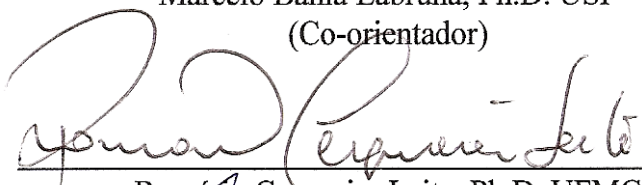
TESE APROVADA EM 21/05/2007



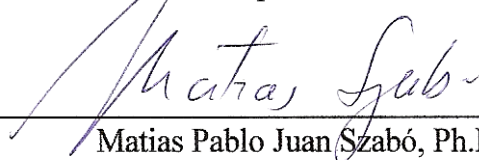
João Luiz Horacio Faccini, Ph.D. UFRRJ
(Orientador)




Marcelo Bahia Labruna, Ph.D. USP
(Co-orientador)



Romário Cerqueira Leite, Ph.D. UFMG



Matias Pablo Juan Szabó, Ph.D. UFU



Carlos Luiz Massard, Ph.D. UFRRJ

*Ao meu companheiro
Leonardo Menezes Xavier
Pelo amor e incentivos constantes
Á minha querida filhinha Isabel,
Pela oportunidade de ser mãe
Luz da minha vida
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

Ao professor JOÃO LUIZ HORÁCIO FACCINI, pela orientação, conselhos sempre pertinentes e por acreditar em meu potencial para a realização deste trabalho.

Ao professor MARCELO BAHIA LABRUNA, pessoa prodigiosa e incansável nas pesquisas, por possibilitar a execução deste trabalho e disponibilizar sua vasta coletânea de artigos científicos.

Aos colegas de equipe e amigos do Laboratório de Ixodologia da UFRRJ, SANDRA SANTOS, ELIANE e PAULINHO, pelo companheirismo, auxílio nas tarefas, discussão de idéias e sugestões.

Aos colegas de equipe e amigos do VPS, Prof^ª. SOLANGE, PEDRINHO, ADRIANO, RICHARD, ALEXANDRE, MAURÍCIO, pelo auxílio nas tarefas, paciência em ensinar, discussão de idéias e sugestões.

Em especial à IARA, pela amizade e companheirismo dentro e fora do VPS.

Ao CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS da UFRRJ, pela oportunidade de aperfeiçoamento científico e crescimento pessoal.

Ao CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq), pelo suporte financeiro.

Ao LABORATÓRIO BIOVET, pelo fornecimento das cobaias utilizadas neste experimento.

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

BIOGRAFIA

LUCIANA HELENA TEIXEIRA DE FREITAS, filha de **José Augusto Teixeira de Freitas** e **Anna Stina Teixeira de Freitas**, nascida na cidade de Vitória, Estado do Espírito Santo, ingressou no Curso de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro em março de 1997, graduando-se Médica Veterinária em novembro de 2001.

Durante a graduação, desde maio de 1998, realizou estágio no Setor de Parasitologia Animal da UFRRJ, passando a ser bolsista de Iniciação Científica – CNPq de março de 1999 a fevereiro de 2002.

Em março de 2002 ingressou no Mestrado em Parasitologia Veterinária do Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, sendo bolsista do CNPq.

Em 14 de agosto de 2003 apresentou a Dissertação de Mestrado intitulada “Influência da temperatura de manutenção da fase não parasitária sobre a fase parasitária de *Haemaphysalis leporispalustris* (Packard, 1869) (Acari: Ixodidae)”. A aluna foi considerada apta a receber o título de Mestre em Ciências e a ingressar prontamente no Doutorado pelo Programa de Pós Graduação Integrada (PGI).

No período de agosto de 2004 a março de 2006 realizou a parte prática da tese de doutorado em São Paulo, na Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP).

RESUMO

FREITAS, Luciana Helena Teixeira de. **Avaliação da biologia e da infecção por *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) em *Haemaphysalis leporispalustris* (Acari: Ixodidae) utilizando coelho doméstico como hospedeiro.** 2007. 85p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

Com o objetivo de acrescentar dados sobre a bioecologia de *Haemaphysalis leporispalustris* e a Febre Maculosa no Brasil, dois estudos foram conduzidos. O primeiro experimento avaliou parâmetros biológicos de ninfas de *H. leporispalustris* durante e após o parasitismo com o objetivo de relacioná-los com o surgimento de machos ou fêmeas e o parasitismo do sexo masculino. Procurou-se estipular qual o período de sobrevivência mínima e máxima de machos sobre o hospedeiro e a influência do número e da longevidade dos machos sobre a capacidade reprodutiva das fêmeas. O segundo experimento abordou o desempenho biológico do ixodídeo frente à infecção por *Rickettsia rickettsii*, agente causal da Febre Maculosa Brasileira. No primeiro experimento, as ninfas ingurgitadas mais leves mudaram para machos e apresentaram período parasitário mais curto ($p < 0,05$) do que as que mudaram para fêmeas. A razão sexual (RS) foi estabelecida de acordo com o período parasitário. Ninfas ingurgitadas de período parasitário mais curto (5 e 6 dias) deram origem a uma maior proporção de machos (1:0 e 1,70: 1, respectivamente) que as ninfas de período parasitário mais longo (9 a 10 dias, e RS de 1:3,07 e 1: 4,60, respectivamente). Já as ninfas que se ingurgitaram em 7 a 8 dias, deram origem a machos e fêmeas em proporção de 1: 1,73 e 1:1,67, respectivamente. Somente a eclosão larval foi influenciada pelo número de machos vivos, sendo que o peso da fêmea ingurgitada foi influenciado mais pela resistência do hospedeiro do que pelo número de machos vivos. No segundo experimento, alterações no desempenho biológico de *H. leporispalustris* expostos à infecção por *R. rickettsii*, foram avaliadas durante a fase parasitária e não parasitária de larvas, ninfas e fêmeas do carrapato. Foram gerados grupos de carrapatos infectados durante as fases de larva, ninfa e adulto, alimentados em coelhos inoculados com *R. rickettsii* e um grupo de larvas infectadas através de co-parasitismo com machos positivos para *R. rickettsii*. Os grupos de carrapatos diretamente alimentados em animais inoculados sofreram maior efeito da infecção sobre o desempenho biológico, com aumento do período parasitário e da mortalidade, e diminuição do peso e do período de postura. O grupo infectado na fase de ninfa gerou fêmeas mais leves, que produziram menos ovos que por sua vez não se desenvolveram adequadamente (baixa eclosão). O grupo experimental gerado pelo co-parasitismo entre larvas e machos representou o modelo mais próximo ao que ocorre na condição natural. Este grupo apresentou larvas mais pesadas e menor mortalidade de larvas e ninfas ingurgitadas em relação ao controle. A eficiência na ecdise de ninfas foi maior e mesmo as fêmeas ingurgitadas apresentando menor peso, obtiveram IER superior ao do grupo controle.

Palavras chave: *Haemaphysalis leporispalustris*, *Rickettsia rickettsii*, *Oryctolagus cuniculus*.

ABSTRACT

FREITAS, Luciana Helena Teixeira de. **Evaluation of *Haemaphysalis leporispalustris* (Acari: Ixodidae) biology and infection for *Rickettsia rickettsii* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) using domestic rabbit as host.** 2007. 85p. Thesis (Doctor Science in Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2007.

With the aim to increase data about the biology of *Haemaphysalis leporispalustris* in Brazil, two studies were conducted. The first experiment evaluated biological parameters of nymphs of *H. leporispalustris* during and after the parasitism with the aim to relating those with appearance of males or females. The male parasitism is also evaluated. We tried stipulated the period of minimum and maximum survival of males on the host and the influence of number or longevity of males in the reproductive capacity of females. The second experiment approached the biological acting of the tick front to the infection for *Rickettsia rickettsii*, causal agent of the Brazilian Spotted Fever. In the first experiment, the engorged nymphs that changed for males were lighter and presented shorter parasitic period ($p < 0,05$) that the ones that changed for females. The sexual ratio (SR) was established in agreement with the parasitic period. Engorged nymphs of shorter parasitic period (5 and 6 days) created a larger proportion of males (1:0 and 1,70: 1, respectively) that the nymphs of longer parasitic period (9 to 10 days, and SR of 1:3,07 and 1: 4,60, respectively). Already the nymphs that engorged in 7 to 8 days, created males and females in proportion of 1: 1,73 and 1:1,67, respectively. Only the larval hatching was influenced by the number of live males. The weight of the engorged females was more influenced by the host resistance than for the number of live males. In the second experiment, alterations in the biological parameters of *H. leporispalustris* exposed to the *R. rickettsii* infection were appraised during the parasitic and no parasitic phase of larvae, nymphs and females ticks. Experimental groups were generated by fed on *R. rickettsii* infected rabbits, during larvae, nymphs and adult phase. Other group was created through co-feeding of *R. rickettsii* positive males with larvae in healthy rabbits. The tick's group directly fed in inoculated animals suffered larger effect of the infection on the biological parameters, with increase of the parasitic period and mortality, and decrease of the weight and oviposition period. The group infected in the nymph phase generated lighter females, that produced less eggs than didn't developed appropriately (low hatching). The larvae infected by co-feeding with infected males group represents the closest model to the than it happens in the natural condition. This group presented heavier larvae and smaller mortality of larvae and engorged nymphs, in relation to the control group. The efficiency in the ecdysis of nymphs was greater, and even the engorged females presenting smaller weight, they obtained IER upper to the control group.

Key words: *Haemaphysalis leporispalustris*, *Rickettsia rickettsii*, *Oryctolagus cuniculus*.

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

BOD	Demanda Biológica de Oxigênio
DNA	ácido desoxirribonucléico
EDTA	Ácido etileno-diamino-tetracético
et al.	e colaboradores
FMB	Febre Maculosa Brasileira
IER	Índice de Eficiência Reprodutiva
M:F	Proporção Macho Fêmea
mg	miligrama
µg	micrograma
mL	mililitro
OPG	Número de ovos por grama de postura
PCR	Polymerase Chain Reaction
<i>Primer</i>	Oligonucleotídeo iniciador para a PCR
RIFI	Reação de Imunofluorescência Indireta
RS	Razão Sexual
TaqPol	Enzima Polimerase de <i>Thermus aquaticus</i>
UR	Umidade Relativa
χ^2	Teste estatístico de Qui-quadrado
%	Percentual
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO GERAL	1
2 CAPÍTULO I - ESTUDO SOBRE A FASE ADULTA DE <i>Haemaphysalis leporispalustris</i> (PACKARD, 1869) (ACARI: IXODIDAE): PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE NINFAS INGURGITADAS COM POTENCIAL PREDITIVO PARA O GÊNERO SEXUAL E ASPECTOS DO PARASITISMO DE MACHOS.....	2
2.1 RESUMO	3
2.2 ABSTRACT	4
2.3 INTRODUÇÃO.....	5
2.4 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.5 MATERIAL E MÉTODOS.....	9
2.5.1 Características Biológicas de Ninfas de <i>H. leporispalustris</i> com Potencial Preditivo para o Gênero Sexual e Razão Sexual	9
2.5.2 Longevidade e Capacidade Reprodutiva de Machos de <i>H. leporispalustris</i> em Parasitismo.	10
2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	12
2.6.1 Características Biológicas de Ninfas de <i>H. leporispalustris</i> com Potencial Preditivo para o Gênero Sexual e Razão Sexual	12
2.6.2 Longevidade e Capacidade Reprodutiva de Machos de <i>H. leporispalustris</i> em Parasitismo.	17
3.7 CONCLUSÕES.....	20
3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	21
3 CAPÍTULO II - EFEITO DE <i>Rickettsia rickettsii</i>, AGENTE DA FEBRE MACULOSA BRASILEIRA, SOBRE O CICLO DE VIDA DO CARRAPATO DO COELHO <i>Haemaphysalis leporispalustris</i> (PACKARD, 1869) (ACARI: IXODIDAE)...	23
3.1 RESUMO	24
3.2 ABSTRACT	25
3.3 INTRODUÇÃO.....	26
3.4 REVISÃO DA LITERATURA.....	27
3.5 MATERIAL E MÉTODOS.....	30
3.5.1 Local de Realização.....	30
3.5.2 Origem da Colônia de <i>H. leporispalustris</i>	30
3.5.3 Origem do Cultivo de <i>R. rickettsii</i>	30
3.5.4 Origem dos Exemplos de <i>Oryctolagus cuniculus</i> e de <i>Cavia porcellus</i>	30
3.5.5 Procedimentos	31
3.5.6 Detecção de <i>R. rickettsii</i> pela Técnica da PCR	34
3.5.7 Confirmação da Infecção dos Coelhos pela Técnica da Imunofluorescência Indireta.....	35

3.5.8	Parâmetros biológicos de <i>H. leporispalustris</i>	35
3.5.9	Estatística.....	35
3.6	RESULTADOS	37
3.6.1	Efeito da Infecção de <i>R. rickettsii</i> Sobre a Biologia de <i>H. leporispalustris</i> Transmitida Por Meio de Inoculações Maciças.....	37
3.6.2	Efeito da Infecção de <i>R. rickettsii</i> Sobre a Biologia de <i>H. leporispalustris</i> Transmitida Por Meio de Carrapatos Infectados	44
3.6.3	Parâmetros Biológicos da Progenie de <i>H. leporispalustris</i> (F ₂) Infectados na Geração Anterior com <i>R. rickettsii</i> Transmitida Por Meio de Inoculações Maciças. ...	49
3.6.4	Resultados PCR	55
3.6.5	Sorologia Coelhos RIFI.....	59
3.7	DISCUSSÃO	61
3.8	CONCLUSÕES	64
3.9	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
4	CONCLUSÕES GERAIS	68

ÍNDICE DAS TABELAS

CAPÍTULO I

Pág.

TABELA 1. Parâmetros biológicos das ninfas ingurgitadas de <i>H. leporispalustris</i> com prognóstico para o sexo dos adultos, sob condições controladas ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$, $\text{UR}>80\%$ e escotofase).	12
TABELA 2. Peso (mg) de ninfas ingurgitadas de <i>H. leporispalustris</i> de acordo com o sexo dos adultos, a cada dia de recuperação. (UFRRJ, 2003).....	13
TABELA 3. Razão sexual de <i>H. leporispalustris</i> proveniente do Município de Seropédica - RJ, de acordo com o período parasitário da ninfa ingurgitada.	16
TABELA 4. Parâmetros parasitários e reprodutivos de fêmeas de <i>H. leporispalustris</i> , provenientes de sucessivas infestações experimentais em coelhos domésticos, de acordo com o período de parasitismo de machos.....	18

CAPÍTULO II

TABELA 5. Dados sobre o desempenho biológico de larvas de <i>H. leporispalustris</i> infectadas com <i>R. rickettsii</i> durante a alimentação em coelhos artificialmente inoculados.	37
TABELA 6. Dados sobre o desempenho biológico de ninfas de <i>H. leporispalustris</i> infectadas com <i>R. rickettsii</i> durante a alimentação em coelhos artificialmente inoculados (G2), em contraste com o grupo controle e o grupo infectado na fase larval (G1).....	39
TABELA 7. Dados sobre o desempenho biológico de fêmeas de <i>H. leporispalustris</i> infectadas com <i>R. rickettsii</i> durante a alimentação em coelhos artificialmente inoculados (G3), em contraste com o grupo controle, o grupo infectado na fase larval (G1) e o grupo infectado na fase de ninfa (G2).....	41

TABELA 8. Desempenho biológico dos estágios imaturos de <i>H. leporispalustris</i> infectados com <i>R. rickettsii</i> na presente geração, por meio de co-alimentação de larvas não infectadas e machos infectados em coelhos sadios.	44
TABELA 9. Desempenho biológico de fêmeas de <i>H. leporispalustris</i> infectadas com <i>R. rickettsii</i> na presente geração, por meio de co-alimentação de larvas não infectadas e machos infectados em coelhos sadios.....	47
TABELA 10. Biologia das fases imaturas (F ₂) de <i>H. leporispalustris</i> infectados por <i>R. rickettsii</i> na geração anterior, em diferentes momentos do ciclo de vida.....	49
TABELA 11. Desempenho biológico de fêmeas (F ₂) de <i>H. leporispalustris</i> infectados por <i>R. rickettsii</i> na geração anterior, em diferentes momentos do ciclo de vida.....	52
TABELA 12. Resultados da PCR de 1.055 amostras testadas para <i>R. rickettsii</i> com <i>primers</i> do gene Citrato Sintase (<i>gltA</i>).....	55

ÍNDICE DAS FIGURAS

CAPÍTULO I

	Pág.
FIGURA 1. Distribuição das frequências de peso relativas às ninfas ingurgitadas de <i>H. leporispalustris</i> que originaram machos e fêmeas (classes de frequência com intervalos de 0,2 mg).	14
FIGURA 2. Período de ingurgitamento das ninfas de <i>H. leporispalustris</i> que originaram machos e fêmeas.	15
FIGURA 3. Período de ecdise de ninfas ingurgitadas de <i>H. leporispalustris</i> que originaram machos e fêmeas.	15
FIGURA 4. Modelos de equações para a sobrevivência de machos de <i>H. leporispalustris</i> em função do período de parasitismo.	17

CAPÍTULO II

FIGURA 5. Fluxograma das infestações com larvas de <i>H. leporispalustris</i> . GC= Grupo Controle; G1= grupo infectado por <i>R. rickettsii</i> na fase de larval.	32
FIGURA 6. Fluxograma das infestações com ninfas de <i>H. leporispalustris</i> . GC= Grupo Controle; G1= grupo infectado por <i>R. rickettsii</i> na fase de larval.e G2 = grupo infectado por <i>R. rickettsii</i> na fase ninfal.	33
FIGURA 7. Fluxograma das infestações com adultos de <i>H. leporispalustris</i> . GC= Grupo Controle; G1; G2= grupo infectado por <i>R. rickettsii</i> na fase ninfal e G3 = grupo infectado por <i>R. rickettsii</i> na fase de adultos.	33
FIGURA 8. Fluxograma das infestações com larvas de <i>H. leporispalustris</i> livres de <i>R. rickettsii</i> em conjunto com machos infectados. GC= controle e G4= grupo infectado na fase larval pelo co-parasitismo com machos infectados por <i>R. rickettsii</i>	34
FIGURA 9. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC) e do grupo infectado por inoculação peritoneal de <i>R. rickettsii</i> (G1), de acordo com o dia após a	

infecção/infestação (DAI).....	38
FIGURA 10. Curvas de temperatura retal de cobaios testemunhos do inóculo de <i>R. rickettsii</i> utilizados nos coelhos do G1, de acordo com o dia após a infecção (DAI).....	39
FIGURA 11. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC), do grupo parasitado por ninfas positivas infectadas quando larvas (G1) e do grupo infectado por inoculação peritoneal de <i>R. rickettsii</i> (G2), de acordo com o dia após a infecção/infestação (DAI).....	40
FIGURA 12. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com controles do inóculo de <i>R. rickettsii</i> utilizados nos coelhos do G2, de acordo com o dia após a infecção (DAI).	40
FIGURA 13. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2) e inoculados com sangue de coelhos do G1 (Cob. 3 a 6), de acordo com o dia após a infecção (DAI).	41
FIGURA 14. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC), do grupo parasitado por adultos positivos infectados quando larvas (G1), do grupo parasitado por adultos positivos infectados quando ninfas (G2) e do grupo infectado por inoculação peritoneal de <i>R. rickettsii</i> (G3), de acordo com o dia após a infecção/infestação (DAI).	42
FIGURA 15. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com controles do inóculo de <i>R. rickettsii</i> utilizados nos coelhos do G3, de acordo com o dia após a infecção (DAI).	43
FIGURA 16. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2), inoculados com fezes de <i>H. leporispalustris</i> em suspensão de BHI (Cob. 3 e 4), e inoculados com sangue de coelhos do G1 (Cob.5 a 8) e G2 (Cob.9 a 12), de acordo com o dia após a infecção (DAI).	43
FIGURA 17. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC) e do grupo parasitado por machos positivos para <i>R. rickettsii</i> em co-parasitismo com larvas livres da infecção (G4), de acordo com o dia após a infestação (DAI).....	45
FIGURA 18. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2) e inoculados com sangue de coelhos do G4 (Cob.3 a 6), na fase parasitária de larvas, de acordo com o dia após a infecção (DAI).	45
FIGURA 19. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC) e do G4, na fase parasitária de ninfas, de acordo com o dia após a infestação (DAI).	46
FIGURA 20. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2) e inoculados com sangue de coelhos do G4 (Cob.3 a 6), na fase parasitária de ninfas, de acordo com o dia após a infecção (DAI).....	46
FIGURA 21. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC) e do G4, na fase parasitária de adultos, de acordo com o dia após a infestação (DAI).....	48
FIGURA 22. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2) e inoculados com sangue de coelhos do G4 (Cob.3 a 6),	

na fase parasitária de adultos, de acordo com o dia após a infecção (DAI).....	48
FIGURA 23. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC), G1, G2 e G3, na fase parasitária de larvas, de acordo com o dia após a infestação (DAI).....	50
FIGURA 24. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2), G1 (Cob.3 a 6), G2 (Cob. 7 a 10) e G3 (Cob. 11 a 14), na fase parasitária de larvas, de acordo com o dia após a infecção (DAI).....	50
FIGURA 25. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC), G1, G2 e G3, na fase parasitária de ninfas, de acordo com o dia após a infestação (DAI).....	51
FIGURA 26. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2), G1 (Cob.3 a 6), G2 (Cob. 7 a 10) e G3 (Cob. 11 a 14), na fase parasitária de ninfas, de acordo com o dia após a infecção (DAI).....	51
FIGURA 27. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC), G1, G2 e G3, na fase parasitária de adultos, de acordo com o dia após a infestação (DAI).....	53
FIGURA 28. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2), G1 (Cob.3 a 6), G2 (Cob. 7 a 10) e G3 (Cob. 11 a 14), na fase parasitária de adultos, de acordo com o dia após a infecção (DAI).....	54
FIGURA 29. Amostras de sangue de coelho positivas pela PCR para <i>R. rickettsii</i> , de acordo com o estágio do carrapato em parasitismo (%).....	56
FIGURA 30. Amostras de sangue de coelho positivas pela PCR para <i>R. rickettsii</i> , de acordo com o grupo experimental (%).....	56
FIGURA 31. Amostras de baço de cobaios positivas pela PCR para <i>R. rickettsii</i> , de acordo com o estágio do carrapato em parasitismo nos coelhos (%).....	57
FIGURA 32. Amostras de baço de cobaios positivas pela PCR para <i>R. rickettsii</i> , de acordo com o grupo experimental em parasitismo nos coelhos (%).....	57
FIGURA 33. Amostras de carrapatos positivas pela PCR para <i>R. rickettsii</i> , de acordo com o grupo experimental (%).....	58
FIGURA 34. Amostras de carrapatos adultos positivas pela PCR para <i>R. rickettsii</i> , de acordo com o grupo experimental (%).....	58
FIGURA 35. Amostras de carrapatos imaturos positivas pela PCR para <i>R. rickettsii</i> , de acordo com o grupo experimental (%).....	59
FIGURA 36. Amostras de carrapatos positivas pela PCR para <i>R. rickettsii</i> , de acordo com o sexo da fase adulta (%).....	59

1 INTRODUÇÃO GERAL

O carrapato de três hospedeiros, *Haemaphysalis leporispalustris* (Packard, 1869) possui ampla distribuição no Continente Americano. Embora na fase adulta do ciclo de vida tenha como hospedeiro primário coelhos silvestres, os estágios imaturos são capazes de parasitar várias espécies de animais, como aves (Kollars e Oliver, 2003), roedores (Eddy e Joyce, 1943; Need et al., 1991), antílopes (Mertins et al., 1992; Evans et al., 2000) e raramente o homem (Harrison et al., 1997).

Na América do Sul, estudos sobre a bioecologia de *H. leporispalustris* são escassos. No Brasil, poucos trabalhos já foram conduzidos neste sentido e até onde se sabe, a espécie de coelho silvestre hospedeira natural da fase adulta de *H. leporispalustris* é *Sylvilagus brasiliensis* (Hoffmann, 1993), nada se conhecendo sobre hospedeiros das fases imaturas.

O presente estudo foi desenvolvido em duas etapas, assinaladas nos capítulos I e II, cujos objetivos foram acrescentar dados sobre a bioecologia de *H. leporispalustris* no Brasil e sua associação com *Rickettsia rickettsii*.

Na ausência de informações prévias, o primeiro capítulo relacionou algumas características biológicas de ninfas ingurgitadas de *H. leporispalustris* com o surgimento de machos ou fêmeas, procurou estabelecer a razão sexual e relacioná-la com o período de ingurgitamento de ninfas, e, finalmente, abordou o parasitismo de machos de *H. leporispalustris*, com observações sobre a longevidade dos machos e a influência da idade ou do número de machos sobre o desempenho reprodutivo de fêmeas do carrapato.

O segundo capítulo abordou o potencial de *H. leporispalustris* como transmissor de *R. rickettsii*, agente da Febre Maculosa Brasileira, avaliando a influência deste agente infeccioso sobre os parâmetros biológicos deste ixodídeo, utilizando-se coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) como modelo animal, em cinco grupos experimentais de carrapatos. Visto que no Brasil, nenhum registro foi encontrado sobre estudos que relacionem *R. rickettsii* com *H. leporispalustris*.

2 CAPÍTULO I

**ESTUDO SOBRE A FASE ADULTA DE *Haemaphysalis leporispalustris* (PACKARD, 1869)
(ACARI: IXODIDAE): PARÂMETROS BIOLÓGICOS DE NINFAS INGURGITADAS
COM POTENCIAL PREDITIVO PARA O GÊNERO SEXUAL E ASPECTOS DO
PARASITISMO DE MACHOS.**

2.1 RESUMO

Parâmetros biológicos de ninfas de *Haemaphysalis leporispalustris* foram avaliados durante e após o parasitismo com o objetivo de relacioná-los com o surgimento de machos ou fêmeas. Do total das 325 ninfas ingurgitadas selecionadas pra o estudo, 12 (3,7 %) morreram antes de completar a ecdise. Das 313 ninfas que chegaram a fase adulta, 129 (41 %) originaram machos e 184 (59 %) originaram fêmeas. As ninfas ingurgitadas que mudaram para machos foram mais leves e apresentaram período parasitário mais curto ($p < 0,05$) que as que mudaram para fêmeas. A razão sexual (RS) foi estabelecida de acordo com o período parasitário. Ninfas ingurgitadas de período parasitário mais curto (5 e 6 dias) deram origem a uma maior proporção de machos (1:0 e 1,70: 1, respectivamente) que as ninfas de período parasitário mais longo (9 a 10 dias, e RS de 1:3,07 e 1: 4,60, respectivamente). Já as ninfas que se ingurgitaram em 7 a 8 dias, deram origem a machos e fêmeas em proporção de 1: 1,73 e 1:1,67, respectivamente. O parasitismo do sexo masculino foi avaliado, procurando-se estipular qual o período de sobrevivência mínima e máxima de machos sobre o hospedeiro e a capacidade reprodutiva das fêmeas foi verificada. Somente a eclosão larval foi influenciada pelo número de machos vivos, sendo que o peso da fêmea ingurgitada foi influenciado mais pela resistência do hospedeiro do que pelo número de machos vivos.

2.2 ABSTRACT

Biological parameters of *Haemaphysalis leporispalustris* nymphs were evaluated during and after parasitism with purpose to establish a relationship between males or females emergence. Of the 325 engorged nymphs obtained for the study, 12 (3,7%) died before completing the ecdysis. Of the 313 nymphs that reached the adult phase, 129 (41%) originated males and 184 (59%) originated females. The engorged nymphs that molted to males were lighter and presented shorter parasitic period that the ones that molted to females. The sex ratio (SR) was established according to the parasitic period. Engorged nymphs that had shorter parasitic period (5 and 6 days) developed into a larger proportion of males (1:0 and 1,70: 1, respectively) that the nymphs that had longer parasitic period (9 to 10 days, and RS of 1:3,07 and 1: 4,60, respectively). At last, the nymphs that had engorged in 7 to 8 days developed into males and females in proportion of 1: 1,73 and 1:1,67, respectively. The male parasitism was evaluated, and the period of minimum and maximum male survival on the host was stipulated and the reproductive capacity of females was verified. Only the larval hatching was influenced by the number of live males. The weight of the engorged females was more influenced by the host resistance than for the number of live males.

2.3 INTRODUÇÃO

Os objetivos deste trabalho foram o de avaliar se o período parasitário de ninfas, peso da ninfa ingurgitada e o período ecdise, são parâmetros biológicos que possuem valor preditivo para o gênero sexual de adultos. Ou seja, se estes parâmetros podem diferenciar entre machos e fêmeas, as ninfas ingurgitadas antes de sua passagem para o estágio adulto. Embora Freitas et al. (2000) tenham observado a proporção sexual de grupos de 50 indivíduos de acordo com o período parasitário de ninfas de *H. leporispalustris*, a metodologia adotada não permitiu relacionar o peso individual e o período de ecdise com o sexo do adulto. Adicionalmente, a razão sexual (RS) de *H. leporispalustris* foi estabelecida.

Em etapa posterior, o parasitismo do sexo masculino foi estudado, procurou-se estipular qual o período de sobrevivência mínima e máxima de machos sobre o hospedeiro (*Oryctolagus cuniculus*) e verificou-se a capacidade reprodutiva dos mesmos, mensurada pelo ingurgitamento satisfatório de fêmeas, realização de postura e percentual de eclosão larval, empregando-se metodologia semelhante ao estudo realizado com *Amblyomma cajennense* por Pinter et al. (2002).

2.4 REVISÃO DA LITERATURA

Em ninfas ingurgitadas de *Amblyomma tuberculatum*, existe uma sólida relação entre o peso das ninfas ingurgitadas e o sexo dos adultos, como demonstraram Cooney e Hays (1972), ocorrendo distribuição bimodal na frequência de pesos destas ninfas, variando entre 56,95 e 105,85 mg para machos e 105,65 a 173,75 mg para fêmeas.

Gladney et al. (1977) encontraram grandes diferenças entre o peso, comprimento e largura de ninfas ingurgitadas que mudaram para machos e fêmeas de *Amblyomma inornatum*, ninfas que originaram machos pesaram em média 2,33 mg, com o comprimento médio de 2,16 mm e largura 1,54 mm e as que mudaram para fêmeas pesaram 5,7 mg e apresentaram comprimento médio de 2,94 mm e largura de 2,16 mm. Não houve superposição dos valores entre as ninfas que originaram ambos os sexos para estes parâmetros, sendo possível pré-determinar o sexo do adulto ainda no estágio de ninfa nesta espécie.

Knight et al. (1978), acompanhando o ciclo biológico em condições de laboratório de *Hyalomma marginatum rufipes*, observaram que machos emergiram de ninfas ingurgitadas pesando em média $23,1 \pm 0,748$ mg e que as ninfas que mudaram para fêmeas pesaram $26,8 \pm 1,19$ mg, com diferenças significativas entre estas médias ($P < 0,001$). O período de ingurgitamento também apresentou diferenças significativas entre as ninfas que originaram machos e fêmeas. O período de pré-ecdise que foi similar para ambos os sexos.

Rechav e Knight (1981), em estudo sobre o ciclo de vida do *Rhipicephalus glabroscutatum* em condições laboratoriais, observaram relações entre o peso, período de ingurgitamento e período de pré-ecdise de ninfas ingurgitadas e o sexo dos adultos emergentes. A diferença entre as médias do peso de ninfas que originaram machos e fêmeas, assim como também para o período de ingurgitamento foi significativa. Não houve diferença entre os períodos de pré-ecdise para ninfas ingurgitadas que originaram ambos os sexos.

Guglielmone e Moorhouse (1985) estudaram a relação de ninfas ingurgitadas de *A. triguttatum triguttatum* alimentadas em coelhos e ratos, que mudaram para machos e fêmeas. Em ambos os hospedeiros, ninfas ingurgitadas que mudaram para fêmeas foram significativamente mais pesadas do que aquelas que mudaram para machos, porém houve uma ampla faixa de superposição no peso destas ninfas, o que tornou difícil a previsão do sexo dos adultos utilizando-se desta variável. O período de pré-ecdise, para as ninfas alimentadas em coelhos, foi mais curto para as que mudaram para machos ($17,7 \pm 1,23$) do que para fêmeas ($19,7 \pm 1,59$) ($P < 0,01$). Não foram encontradas diferenças significativas para o período de ingurgitamento nas ninfas alimentadas nos dois hospedeiros.

Dados sobre a biologia da fase adulta de uma população de *H. leporispalustris* proveniente de Belo Horizonte, Estado de Minas Gerais, foram estudados por Labruna e Leite (1997). Duas infestações foram feitas em dois coelhos domésticos (*O. cuniculus*) utilizando-se tanto machos e fêmeas. Sendo uma infestação foi realizada com adultos provenientes da mesma seringa (I-1), e a outra infestação com adultos que eram acondicionados separadamente, por sexo, em seringas distintas (I-3). Mais duas infestações foram feitas em dois coelhos domésticos (*O. cuniculus*) utilizando-se somente fêmeas. Sendo que uma infestação foi realizada com fêmeas que eram mantidas juntamente com machos antes da infestação (I-2), e a outra infestação com fêmeas que eram mantidas antes da infestação, sem

contato prévio com machos (I-4). Quando somente fêmeas foram utilizadas nas infestações, elas apresentaram um período parasitário mais longo (20,6 a 24,0 dias) e ingurgitaram menos (177,2 a 204,0 mg) que nas infestações onde foram utilizados ambos os sexos (14,0 a 15,8 dias de período parasitário e 330,5 a 344,7 mg de peso). Embora quatro fêmeas da I-2 e duas fêmeas da I-4 tenham realizado postura, poucos ovos de uma fêmea da I-2 e de outra da I-4 incubaram, sendo obtidas poucas larvas. Foi registrada pela primeira vez a ocorrência de partenogênese nesta espécie, progênie de uma fêmea da I-4. O mesmo não pode ser afirmado para fêmea da I-2, pois ela teve contato com machos antes da alimentação, embora não se tenha conhecimento que nos carrapatos *Metastriatia* a cópula ocorra antes da alimentação.

Prata et al. (1998) estudando a relação entre o peso e número de larvas e ninfas ingurgitadas de *A. cajennense*, relacionaram o período parasitário de ninfas com a emergência de machos e fêmeas. Observaram que, das ninfas coletadas no terceiro dia após a infestação 75,03% e 24,47% mudaram para machos e fêmeas, no quarto dia 49,01% e 49,49%, e no quinto dia 29,98% e 65,04%, respectivamente.

Freitas et al. (2000) estabeleceram a relação entre o peso e o número de larvas e ninfas ingurgitadas de *H. leporispalustris* e entre o período de ingurgitamento ninfal e o sexo dos adultos. Houve diferenças entre os pesos médios dos grupos de 50 larvas ingurgitadas de acordo com o dia de parasitismo e o coelho utilizado, sendo que o peso médio de um grupo de 50 larvas ingurgitadas foi de 15,00 mg, com limites de 14,15 a 16,08 mg. Já o peso médio de 50 ninfas ingurgitadas não diferiu de acordo com o dia de parasitismo nem com o coelho utilizado, apresentando valor de 74,62 mg. Ninfas ingurgitadas que originaram machos realizaram o ingurgitamento em menor tempo que as ninfas que originaram fêmeas.

Barbieri et al (2001) avaliaram a relação do peso corporal, período de ingurgitamento e do período de pré-ecdise de 330 ninfas ingurgitadas de *A. cajennense*, alimentadas em coelhos domésticos com o surgimento de machos e fêmeas do carrapato. Diferenças foram encontradas entre as médias de peso e período de ingurgitamento de ninfas que originaram machos e fêmeas ($p < 0,01$). Contudo, não foi possível determinar com exatidão o prognóstico sexual dos adultos baseado no peso, devido a grande área de sobreposição dos valores que originaram ambos os sexos. Houve pequena sobreposição em relação ao período de ingurgitamento, sendo esta variável mais confiável para se obter maior número de indivíduos do mesmo sexo, principalmente no início e no final da recuperação, onde as ninfas ingurgitadas recuperadas originaram machos (85,18%) e fêmeas (88,8%), respectivamente. O período de pré-ecdise de ninfas ingurgitadas foi semelhante para ambos os sexos.

Pinter et al (2002) coletaram 5326 ninfas ingurgitadas de *A. cajennense* de cavalos naturalmente infestados provenientes de Pirassununga, Estado de São Paulo. Após a muda das mesmas no laboratório, a razão sexual de 1:1.83 (M:F) foi observada para avaliar a razão sexual de *A. cajennense* coletados a campo. Adicionalmente, fêmeas ingurgitadas de *A. cajennense* foram coletadas na mesma localidade e de antas no Município de Sorocaba, sua postura foi coletada e sua progênie foi mantida em laboratório até a subsequente fase adulta. Fêmeas ingurgitadas coletadas de Pirassununga geraram uma progênie de adultos com razão sexual de 1:1.57 (M:F) e a razão sexual de 1.14:1 (M:F) foi obtida para a progênie das fêmeas coletadas das antas em Sorocaba. Adicionalmente, larvas não alimentadas de *A. cajennense* foram coletadas no Município de Pedreira e mantidas no laboratório até a fase adulta. Estes adultos apresentaram uma razão sexual de 1.11:1 (M:F). As razões sexuais diferiram significativamente ($P < 0.05$) entre as diferentes populações do carrapato. O parasitismo do sexo masculino de *A. cajennense* foi avaliado por meio de infestações experimentais em coelhos domésticos. Os machos apresentaram períodos de alimentação que variaram entre 7 e 86 dias. Durante este período, os coelhos foram infestados regularmente com fêmeas de *A. cajennense*. Um total de 179 fêmeas ingurgitadas foram coletadas e seu peso, período parasitário, período de pré-postura, período de incubação dos ovos, peso da postura,

percentual de eclosão larval e eficiência na produção de ovos foram comparados com o período parasitário de machos e com o número de machos vivos presentes no hospedeiro. Nenhuma das variáveis acima foi afetada pelo período parasitário de macho, que permaneceram férteis durante todo o período de alimentação. O percentual de eclosão larval foi a única variável que diminuiu significativamente com a diminuição do número de machos vivos no hospedeiro. Estes resultados apontam para a existência de uma compensação que ocorre em algumas populações de *A. cajennense* que são compostas de maior número de fêmeas por um período de parasitismo maior dos machos, sem perda de seu desempenho reprodutivo.

2.5 MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi realizado na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz, do Departamento de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, situada no Município de Seropédica (lat.: 22° 45' S; long.: 43° 41' W; alt.: 33m), Rio de Janeiro.

A pesquisa compreendeu duas etapas, a primeira abordou características biológicas de ninfas de *H. leporispalustris* com potencial preditivo para o gênero sexual (machos ou fêmeas) e a razão sexual (RS) - frequência relativa entre machos e fêmeas. A segunda etapa compreendeu o estudo do parasitismo dos machos, incluindo longevidade e capacidade reprodutiva de machos de *H. leporispalustris* sobre o hospedeiro.

2.5.1 Características Biológicas de Ninfas de *H. leporispalustris* com Potencial Preditivo para o Gênero Sexual e Razão Sexual

Ninfas de *H. leporispalustris* de 9ª geração da colônia do Laboratório de Ixodologia da UFRRJ, foram mantidas em estufa incubadora regulada a 27 ± 1 ° C e UR ≥ 85 % até atingirem em média 25 dias de jejum, quando então foram utilizadas nas infestações que deram início ao presente estudo. Seis coelhos domésticos (*O. cuniculus*), mestiços Califórnia X Nova Zelândia, de ambos os sexos, com idade compreendida entre 60 a 90 dias, com peso inicial de 1,8 a 2,5 kg sem contato prévio com carrapatos e produtos acaricidas foram empregados como hospedeiros. Para as infestações experimentais, utilizou-se um dispositivo confeccionado em tecido de algodão cru, aderido com esparadrapo e “Pasta Una” à base das orelhas dos coelhos (NEITZ et al., 1971), para acondicionamento dos carrapatos. Cada coelho foi infestado com aproximadamente 1600 ninfas (FREITAS et al., 2000). Os animais foram mantidos em gaiolas individuais, recebendo diariamente ração e água à vontade.

Os dispositivos de infestação foram verificados diariamente e as ninfas ingurgitadas recuperadas de todos os coelhos foram agrupadas, em recipiente plástico. Sessenta ninfas ingurgitadas foram escolhidas aleatoriamente a cada dia de recuperação. Estes espécimes foram pesados individualmente em balança analítica e acondicionados também individualmente em frascos de vidro arrolhados com algodão hidrófilo, sendo mantidos nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente até o processo de muda completar-se. Este procedimento foi repetido para cada dia de recuperação de indivíduos ingurgitados. Os adultos emergidos foram sexados através da observação do escudo dorsal.

Os parâmetros biológicos de ninfas estudados como indicadores do tipo sexual foram: período parasitário de ninfas (tempo, em dias, transcorrido entre o dia da infestação e o dia da recuperação da ninfa ingurgitada); peso da ninfa ingurgitada (em mg); período de ecdise (tempo, em dias, transcorrido entre a coleta da primeira ninfa ingurgitada e o surgimento do último adulto).

A Razão Sexual (RS) pode ser definida como um índice que expressa a frequência relativa de um sexo em relação à população de adultos. No presente estudo, optamos por adotar a RS como o número de fêmeas dividido pelo total da população:

$$RS = \frac{\text{♀♀}}{\text{♀♀+♂♂}}$$

A partir deste índice, pode-se expressar em qual proporção os sexos se encontram distribuídos, sendo então utilizado a relação entre o número de machos e fêmeas (M:F).

A RS e relação entre machos e fêmeas (M:F) foi determinada para cada dia de recuperação de ninfas ingurgitadas e também de acordo com o número geral de indivíduos que haviam sido previamente selecionados.

A análise estatística dos dados relacionados ao gênero sexual foi feita através da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste t de Student. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi usado quando a distribuição dos dados amostrais não se adequou à curva normal. Para a avaliação da RS utilizou-se o teste de Qui-quadrado (χ^2). Em todos os testes estatísticos empregados o nível de significância foi de 5%.

2.5.2 Longevidade e Capacidade Reprodutiva de Machos de *H. leporispalustris* em Parasitismo.

Para o experimento de parasitismo de machos, três coelhos nas mesmas condições descritas anteriormente, foram infestados com 20 casais do carrapato para cada animal, conforme a etapa anterior do presente estudo.

Após o desprendimento da última fêmea ingurgitada de cada coelho, outras 20 fêmeas foram adicionadas no dispositivo de infestação. Este procedimento foi realizado sucessivamente até a morte do último dos 20 machos de cada coelho.

Os dispositivos foram verificados diariamente e os machos mortos foram contados e registrados. As fêmeas ingurgitadas ou semi-ingurgitadas desprendidas naturalmente foram pesadas e seu período parasitário devidamente anotado, sendo transferidas para estufa incubadora regulada a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e UR $\geq 85\%$ para o acompanhamento da fase não parasitária. Os seguintes parâmetros foram avaliados: peso da fêmea ingurgitada, período de pré-postura (compreendido entre o fim do parasitismo e o início da postura), período de postura, Índice de Eficiência Reprodutiva (IER) (BENNETT, 1974), período de incubação dos ovos e percentual de eclosão das larvas.

Para anular a possível interferência da idade da fêmea no momento da alimentação, duas infestações em coelhos domésticos, com ninfas de *H. leporispalustris* foram efetuadas, com um intervalo de 30 dias entre elas, dois meses antes do início do presente estudo.

Para verificar a associação entre o número de machos sobreviventes em relação ao período parasitário dos mesmos, foi realizada análise de regressão a 5%, onde temos sobrevivência (y) em função do tempo (x). Para a construção da equação do período parasitário de machos de *H. leporispalustris*, diferentes modelos foram testados (linear, logarítmico e quadrático) para a escolha daquele que apresentou melhor ajuste, ou seja, o melhor coeficiente de determinação (R^2).

Grupos de fêmeas ingurgitadas do presente estudo foram formados em lotes sucessivos de acordo com a data do início do parasitismo das mesmas, até a morte do último macho de cada coelho. A variável peso da fêmea ingurgitada, período de pré-postura, período de postura, IER, período de incubação dos ovos e percentual de eclosão das larvas, foram submetidas a ANOVA, seguida pelo teste t de Student. O teste não paramétrico de Mann-

Whitney foi utilizado para dados com distribuição não normal, com $\alpha = 5\%$.

2.6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.6.1 Características Biológicas de Ninfas de *H. leporispalustris* com Potencial Preditivo para o Gênero Sexual e Razão Sexual

Ninfas ingurgitadas de *H. leporispalustris* foram recuperadas entre o 5º e o 10º dia pós-infestação, sendo entre o 7º e o 8º dia o período de maior número de espécimes ingurgitados recuperados. Do total das 325 ninfas ingurgitadas obtidas aleatoriamente, 12 (3,7%) morreram antes de completar a ecdise. Das 313 ninfas que chegaram à fase adulta, 129 (41,2%) originaram machos e 184 (58,8%) originaram fêmeas, compreendendo uma RS de 0,59 e a relação M:F geral obtida foi 1:1,42.

O peso, período parasitário e período de ecdise das ninfas que originaram machos e fêmeas estão expressos na Tabela 1. As ninfas ingurgitadas que mudaram para machos foram mais leves ($p < 0,05$) e apresentaram período parasitário mais curto ($p < 0,05$) que as que mudaram para fêmeas. Embora estatisticamente diferente ($p < 0,05$), o período de ecdise não foi tão discrepante sob o ponto de vista biológico, podendo ser considerados sob esse aspecto semelhantes.

Tabela 1. Parâmetros biológicos das ninfas ingurgitadas de *H. leporispalustris* com prognóstico para o sexo dos adultos sob condições controladas ($27 \pm 1^\circ\text{C}$, UR > 80% e escotofase).

Parâmetros	Carrapatos após a ecdise (313)	
	Machos (129)	Fêmeas (184)
Peso (mg)	$1,09^{\text{B}*} \pm 0,17$ 0,7 – 1,8	$1,76^{\text{A}} \pm 0,23$ 1,0 – 2,5
Período Parasitário (dias)	$6,94^{\text{B}} \pm 1,54$ 5 – 10	$8,29^{\text{A}} \pm 1,36$ 6 – 10
Período de Ecdise (dias)	$13,12^{\text{B}} \pm 1,41$ 11 – 18	$13,84^{\text{A}} \pm 1,58$ 11 – 21

Na seqüência vertical: média aritmética \pm desvio padrão, amplitude.

*Médias seguidas de letras maiúsculas diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si ao nível de 5%. UFRRJ, 2003.

Estes resultados assemelham-se aos encontrados por Knight (1978) em estudo realizado com *Hyalomma marginatum rufipes*, Rechav e Knight (1981) para *Rhipicephalus glabroscutatum* e Prata et al. (1998) e Barbieri et al. (2001) para *Amblyomma cajennense*,

onde as ninfas que produziram machos eram significativamente mais leves e tinham o período parasitário mais curto do que as que originaram fêmeas e ainda, sendo o período de ecdise semelhante entre os sexos. Freitas et al. (2000), ao estabelecer uma relação entre o peso e o número de ninfas ingurgitadas de *H. leporispalustris*, observou um maior percentual de indivíduos que originaram machos nos primeiros dias de recuperação, e ainda que esta proporção se igualava por volta do dia modal de queda e se invertia nos últimos dias de recuperação.

Na Tabela 2 observa-se que o peso obtido para ninfas que originaram machos e fêmeas foi semelhante ($p>0,05$) de acordo com os dias de recuperação. No entanto, as ninfas ingurgitadas que originaram machos foram significativamente ($p<0,05$) mais leves que as que deram origem às fêmeas dentro de cada dia de recuperação, no decorrer do período de observação.

Tabela 2. Peso (mg) de ninfas ingurgitadas de *H. leporispalustris* de acordo com o sexo dos adultos, a cada dia de recuperação. (UFRRJ, 2003)

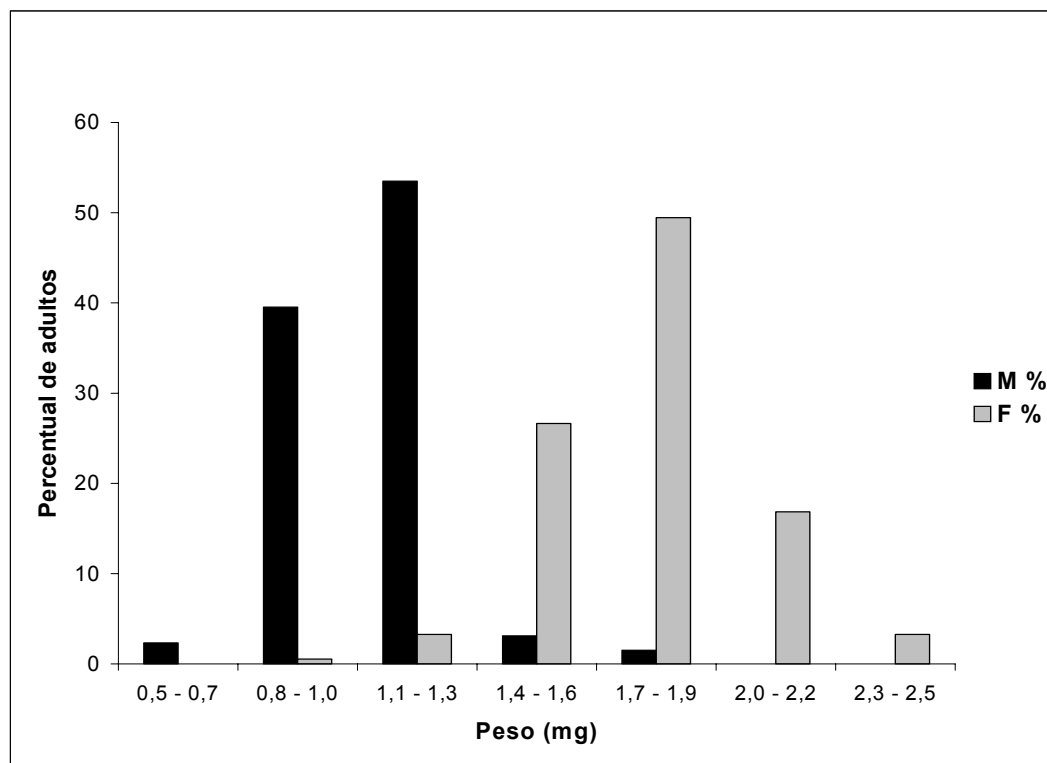
Sexo (Após Ecdise)	Dia de recuperação de ninfas ingurgitadas					
	1°	2°	3°	4°	5°	6°
Machos	²⁵ 1,12 ^{a*} ± 0,10 0,90 – 1,40	³⁷ 1,06 ^{a, B+} ± 0,19 0,70 – 1,40	²² 1,02 ^{a, B} ± 0,14 0,70 – 1,20	²¹ 1,09 ^{a, B} ± 0,13 0,90 – 1,40	¹⁴ 1,10 ^{a, B} ± 0,17 0,90 – 1,50	¹⁰ 1,26 ^{a, B} ± 0,27 1,00 – 1,80
Fêmeas	-	²² 1,84 ^{a, A} ± 0,21 1,30 – 2,20	³⁸ 1,70 ^{a, A} ± 0,19 1,40 – 2,40	³⁵ 1,78 ^{a, A} ± 0,20 1,30 – 2,10	⁴³ 1,83 ^{a, A} ± 0,25 1,20 – 2,50	⁴⁶ 1,71 ^{a, A} ± 0,26 1,00 – 2,40

Na seqüência vertical: N, média aritmética ± desvio padrão, amplitude.

*Médias seguidas de mesma letra minúscula na mesma linha não diferem significativamente entre si ao nível de 5%.

+Médias seguidas de mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5%.

A distribuição do peso das ninfas ingurgitadas que originaram machos e fêmeas, de acordo com classes de frequência, pode ser observado na Figura 1. Houve estreita faixa de sobreposição dos pesos das ninfas que deram origem a machos e fêmeas, sendo o maior percentual de machos (93%) e fêmeas (93%) obtidos nas classes de peso entre 0,8 e 1,3 mg e 1,4 e 2,2 mg, respectivamente. Das ninfas ingurgitadas de *H. leporispalustris* com peso abaixo de 0,7 mg foram obtidos exclusivamente machos e, acima de 2,0 mg apenas fêmeas.



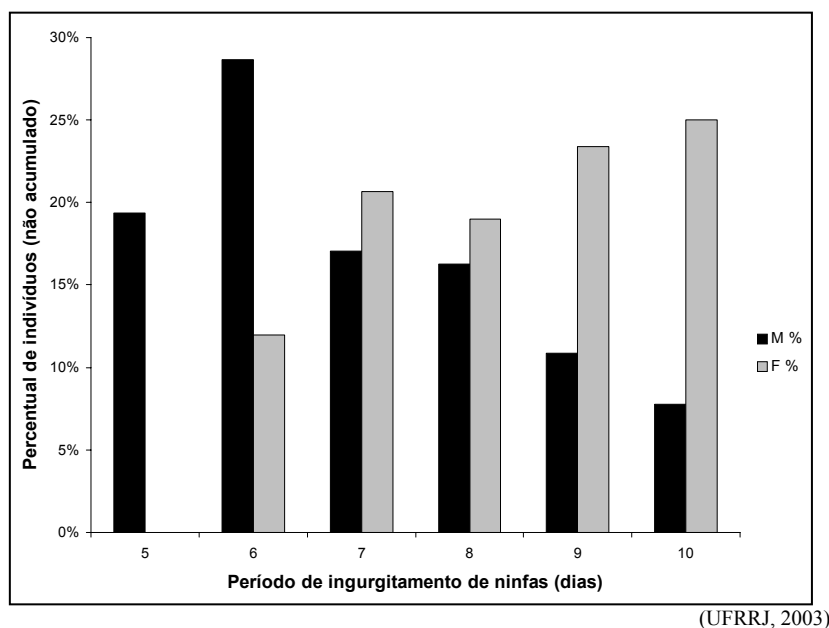
(UFRRJ, 2003)

Figura 1. Distribuição das freqüências de peso relativas às ninfas ingurgitadas de *H. leporispalustris* que originaram machos e fêmeas (classes de freqüência com intervalos de 0,2 mg).

No que concerne ao prognóstico sexual, *H. leporispalustris* parece apresentar classes de pesos mais definidas que as observadas no estudo realizado por Barbieri et al., 2001 com *A. cajennense*, onde ocorreu uma ampla faixa de sobreposição de pesos de ninfas ingurgitadas que deram origem tanto a machos como a fêmeas, sendo este parâmetro de pouca significação para a distinção sexual. Estes resultados também estão compatíveis com os de Guglielmone e Moorhouse (1985), que observaram a superposição das classes de peso para *Amblyomma triguttatum triguttatum*. No entanto, em estudos sobre outras espécies do gênero *Amblyomma*, Cooney e Hays (1972) para *A. tuberculatum* e Gladney et al. (1977) para *A. inornatum*, encontraram pesos bem definidos tanto para ninfas ingurgitadas que deram origem a machos como para as que deram origem a fêmeas.

De acordo com os resultados obtidos neste estudo com *H. leporispalustris*, a variável peso da ninfa ingurgitada pode ser empregada como um meio para pré-determinar o sexo do adulto, devido ao pequeno percentual de ambos os sexos que tiveram pesos sobrepostos na mesma classe de freqüência (Figura 1). Isto é, na área de sobreposição dos pesos das ninfas ingurgitadas (0,8-1,9 mg), o percentual de machos que pesou entre 1,4 e 1,9 mg foi de apenas 4,6%. O mesmo vale para as ninfas ingurgitadas que pesaram de 0,8 a 1,3 mg, ocorrendo apenas 3,8% de fêmeas nesta classe.

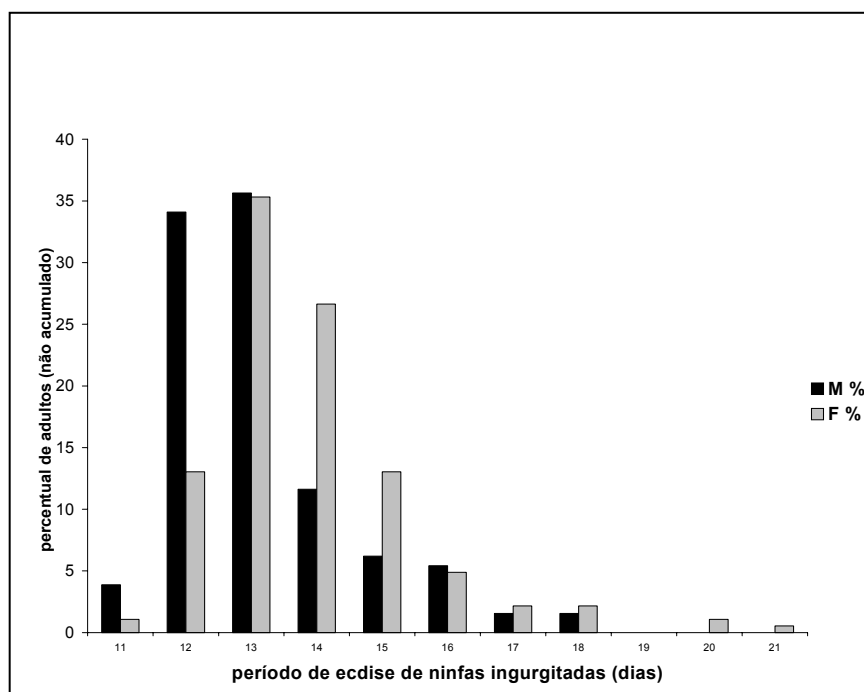
Na Figura 2 observa-se que 65% dos machos e 68% das fêmeas levaram de 5 a 7 dias e de 8 a 10 dias, respectivamente, no processo de ingurgitamento. Barbieri et al. (2001) observou que o período de ingurgitamento é mais longo para ninfas ingurgitadas de *A. cajennense* que originaram fêmeas, pois observou que 78% das fêmeas apresentaram o referido período acima de 5 dias e 61% dos machos se ingurgitaram em menos de 4 dias.



(UFRRJ, 2003)

Figura 2. Período de ingurgitamento das ninfas de *H. leporispalustris* que originaram machos e fêmeas.

A Figura 3 mostra que cerca de 81% e 75% das ninfas ingurgitadas que originaram machos e fêmeas, respectivamente, tiveram período de ecdise entre 12 a 14 dias, conseqüentemente, com grande sobreposição das áreas de distribuição das freqüências das ninfas que originaram ambos os sexos. Embora estatisticamente significativo ($p < 0,05$) (Tabela 1), este parâmetro se apresentou biologicamente semelhante (Figura 3).



(UFRRJ, 2003)

Figura 3. Período de ecdise de ninfas ingurgitadas de *H. leporispalustris* que originaram machos e fêmeas.

A RS pode ser observada na Tabela 3. Uma maior proporção de machos foi originada a partir de ninfas ingurgitadas que tiveram período parasitário menor (5 a 6 dias). Já as ninfas que se ingurgitaram em 7 a 8 dias, deram origem a machos e fêmeas em proporção próxima a encontrada para esta população de *H. leporispalustris* (1: 1,43). Ninfas que apresentaram os maiores períodos de parasitismo (9 a 10 dias) deram origem a um número extremamente elevado (1:3,07 e 1:4,60) de fêmeas. Este fato pode ser explicado em parte, devido à maior necessidade por nutrientes das ninfas que originarão fêmeas, uma vez que estas também sugam maior volume que as ninfas que originarão machos (Tabela 1), sendo possível ainda a participação de fatores genéticos que ditam este comportamento.

Tabela 3. Razão sexual de *H. leporispalustris* proveniente do Município de Seropédica - RJ, de acordo com o período parasitário da ninfa ingurgitada.

Período parasitário de ninfas (dias)	N° Machos	% Machos (diário)	N° Fêmeas	% Fêmeas (diário)	N° Total Adultos	Razão Sexual⁺ (RS)	Relação M:F⁺
5	25	100	0	0	25	0	1: 0
6	37	62,71	22	37,29	59	0,37	1,68: 1
7	22	36,67	38	63,33	60	0,63	1: 1,73
8	21	37,50	35	62,50	56	0,62	1: 1,67
9	14	24,56	43	75,44	57	0,75	1: 3,07
10	10	17,86	46	82,14	56	0,82	1: 4,60
Total	129	41,21	184	58,79	313	0,59**	1: 1,43**

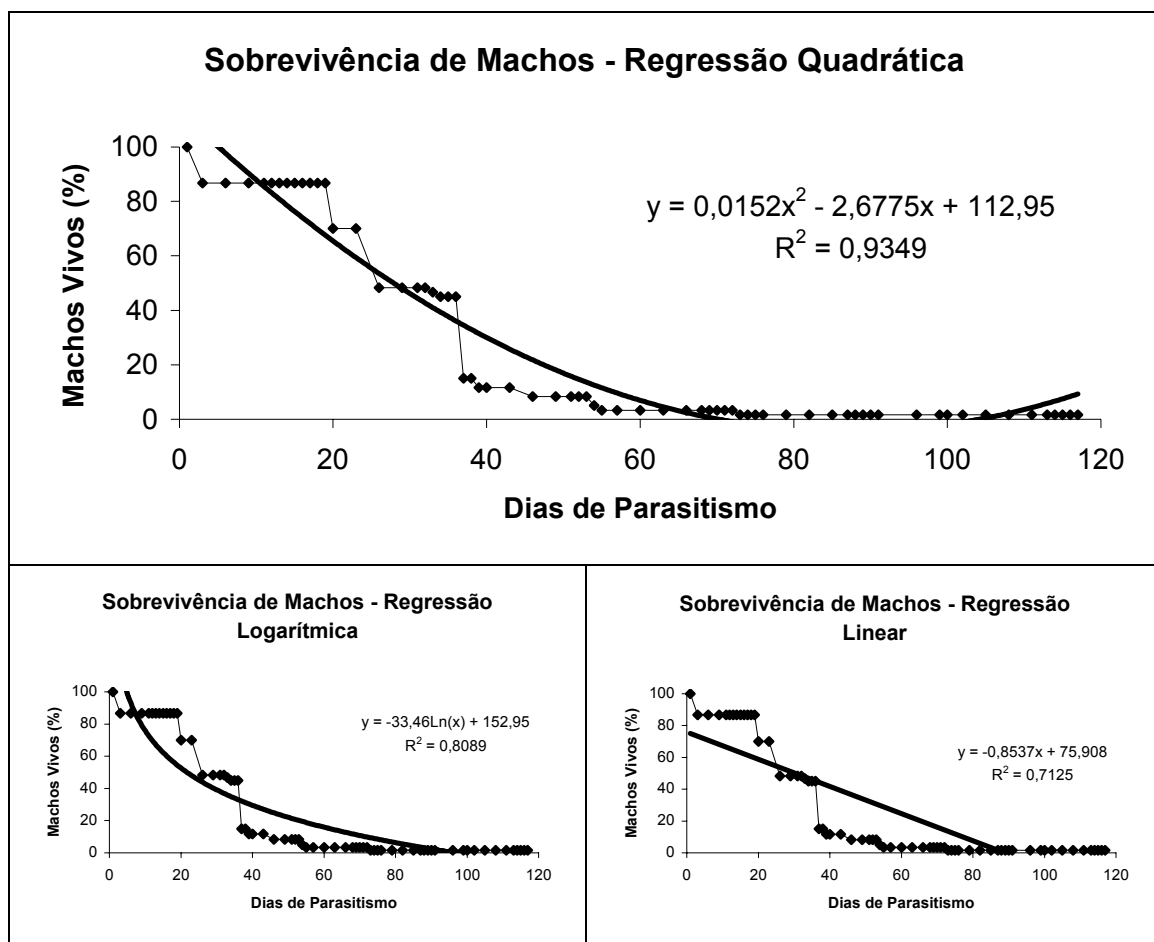
⁺ A RS variou significativamente ($p < 0,01$) de acordo com o dia de parasitismo de ninfas pelo teste de χ^2 ;

** Pelo teste de χ^2 , a RS variou significativamente ($p < 0,01$) da proporção 0,5 esperada na natureza. (UFRRJ, 2003).

Pinter et al. (2002), em estudo realizado com três populações de *A. cajennense* encontrou proporções M: F semelhantes entre os sexos nas amostras de Sorocaba (fêmeas coletadas de Anta – *Tapirus terrestris*) (1,14:1) e Pedreira (originada de larvas coletadas no campo) (1,11: 1). Já na população de Pirassununga (originada de fêmeas coletadas em cavalos) houve predominância de fêmeas (1: 1,57). Esta proporção foi semelhante à obtida para *H. leporispalustris* no presente trabalho (1: 1,43). Talvez a espécie de hospedeiro a partir da qual tenha obtido as populações possa ter exercido alguma influência. Quanto mais próxima a espécie for do hospedeiro natural usual melhor deve ser o desempenho reprodutivo do carrapato, possibilitando aos machos um período parasitário maior, sem perda da capacidade reprodutiva (PINTER et al., 2002), o que possibilitaria a fecundação de um número maior de fêmeas. Além disso, as espécies de carrapatos de três hospedeiros estão muito mais expostas às condições ambientais adversas e seu impacto deletério sobre a eliminação da progênie, necessitando também de um número extra de fêmeas para assegurar a dispersão de maior quantidade possível de descendentes, já que a maioria dos ovos, larvas e ninfas dificilmente chegará a fase reprodutiva (adultos).

2.6.2 Longevidade e Capacidade Reprodutiva de Machos de *H. leporispalustris* em Parasitismo.

Os gráficos de sobrevivência de machos em função do tempo de acordo com os modelos linear, logarítmico e polinomial podem ser conferidos na Figura 4. O modelo quadrático obteve melhor ajuste ($R^2 = 0,9349$). A equação para o período parasitário de machos de *H. leporispalustris* obtida foi $y = 0,0152x^2 - 2,6775x + 112,95$, como pode ser observado na Figura 4, em primeiro plano. Segundo este modelo, pôde-se estimar que 50% dos machos estavam vivos por volta do 29º dia após o início do parasitismo. Em nosso estudo, o primeiro macho de *H. leporispalustris* morreu ao 3º dia e o último ao 117º dia de parasitismo.



(UFRRJ, 2003)

Figura 4. Modelos de equações para a sobrevivência de machos de *H. leporispalustris* em função do período de parasitismo.

Pinter et al. (2002) no estudo sobre a longevidade de machos de *A. cajennense* em parasitismo, observaram que o modelo linear foi o que melhor representou a sobrevivência dos carrapatos em função do tempo ($R^2=0,9824$), sendo que o primeiro macho de *A. cajennense* morreu no 7º dia e o último ao 86º dia de parasitismo. Segundo o modelo proposto pelos autores, contar-se-ia com 50% dos machos vivos por volta do 43º dia após a infestação. Devido ao fato de que, no presente estudo, um único macho foi capaz de sobreviver, sozinho, do 73º ao 117º dias em um hospedeiro e em contrapartida o restante de machos dos outros

dois hospedeiros sobreviveram no máximo até o 43º dia, o modelo matemático melhor ajustado não poderia ser o linear. Observamos que muitos machos constantemente trocavam de sítio de fixação, sendo freqüentemente encontrados não fixados durante o exame dos dispositivos.

Estas observações possuem relevância sob o ponto de vista epidemiológico na manutenção e transmissão de patógenos, pois os machos infectados, além de ter a possibilidade de migrar de um hospedeiro a outro, carregando consigo agentes infecciosos podem permanecer considerável tempo sobre os hospedeiros, servindo como constante fonte de infecção de novos carrapatos quer pela co-alimentação (RANDOLPH et al., 1996) ou através da cópula (HAYES et al., 1980), infectando as fêmeas.

De todas as infestações realizadas, 89 fêmeas ingurgitadas ou semi-ingurgitadas foram coletadas dos hospedeiros (40,4% de recuperação). Os dados reprodutivos e parasitários das fêmeas de *H. leporispalustris* podem ser observados na Tabela 4.

Tabela 4. Parâmetros parasitários e reprodutivos de fêmeas de *H. leporispalustris*, provenientes de sucessivas infestações experimentais em coelhos domésticos, de acordo com o período de parasitismo de machos.

Infestação de fêmeas →	I	II	III	IV	V	VI
	0-20*	21-40	41 – 55	56 – 75	76 – 91	102 – 117
Parâmetros						
Peso da fêmea ingurgitada (mg)	41 101,0a ± 55,6 206,4 – 12,5	28 16,9b ± 12,4 57,3 – 7,1	2 28,4 ± 28,1 48,3 – 8,6	6 20,4 ± 8,9 37,5 – 12,4	1 16,5	12 100,6a ± 51,1 202,1 – 24,8
Período parasitário de fêmeas (dias)	41 15,2b ± 1,4 19 – 13	28 14,8b ± 2,4 19 – 11	2 15,0 ± 0,0 15 – 15	6 14,2 ± 1,0 16 – 13	1 13	12 21,5a ± 1,5 23 – 19
Recuperação (%)	68,3	46,7	5,0	30,0	5,0	60,0
Período de pré-oviposição (dias)	26 5,3a ± 1,0 8 – 4	4 7,2 ± 1,5 9 – 6	1 5,0	1 7,0	—	8 5,2a ± 1,0 7 – 4
Período de postura (dias)	26 20,8a ± 5,1 35 – 14	4 10,8 ± 1,2 12 – 9	1 14,0	1 11,0	—	8 21,8a ± 7,7 33 – 12
Peso postura (mg)	26 60,0a ± 22,1 106,9 – 21,1	4 10,6 ± 3,9 16,6 – 5,8	1 20,3	1 11,2	—	8 49,3a ± 23,0 93,2 – 23,5
IER (%)	26 45,8a ± 7,4 57,5 – 31,3	4 24,8 ± 4,7 31,8 – 21,7	1 42,0	1 29,9	—	8 43,1a ± 8,3 52,9 – 30,6
Período de incubação (dias)	26 29,1 ± 1,9 36 – 26	4 30,7 ± 2,0 33 – 26	1 32	—	—	1 38
Eclosão larval (%)	26 72,5a ± 20,8 99 – 20	4 69,4 ± 28,8 100 – 5	1 60,0	1 0	—	8 0,1b ± 0,4 1 – 0
Hospedeiro	C1+C2+C3	C1+C2+C3	C1+C3	C1	C1	C1novo

* Período parasitário de machos (dias). O último macho morreu ao 117º dia, porém fêmeas ingurgitadas foram recuperadas até o 125º dia. ** “n” mínimo para análise estatística = 8. Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem estatisticamente, a 5%. (UFRRJ, 2003).

Avaliando-se as infestações sucessivas nos hospedeiros (C1 = 5; C2 = 2; C3 = 3; C1 novo = 1), duas variáveis parecem ter influenciando nos resultados: a primeira delas foi a resistência do hospedeiro, pois os animais desenvolveram reações imunes como pústulas,

aumento de secreção de cerume e queda de pelos do pavilhão auricular. Outro fato que corrobora a ocorrência de resistência por parte dos animais foi o fato de que quando se utilizou um novo coelho (C1 novo) a recuperação e o peso das fêmeas ingurgitadas melhoraram (Tabela 4). A segunda variável que exerceu influência foi o número ou a idade do macho, pois o período parasitário se alongou e a eclosão foi praticamente nula na infestação VI (Tabela 4). Embora o macho tenha sido observado junto a diversas fêmeas em alimentação, pode não ter ocorrido a cópula ou pode ter copulado com espermátóforo infértil, devido à idade. Mesmo sem a presença do macho, pode ocorrer um pequeno percentual de eclosão larval, conforme reportado por Labruna e Leite (1997), que verificaram ocorrência de partenogênese na espécie *H. leporispalustris*.

Pinter et al. (2002) não registraram no estudo sobre a longevidade dos machos de *A. cajennense* o surgimento de resistência por parte dos hospedeiros. Embora o sítio de infestação de escolha para as duas espécies seja distinto (superfície dorsal para *A. cajennense* e pavilhão auricular para *H. leporispalustris*), registros do Laboratório de Ixodologia reportam o surgimento de resistência por parte de coelhos infestados no dorso com adultos de *A. cajennense* logo na primeira infestação, com formação de pústulas com mais de 3cm de diâmetro, seguidas pela formação de crostas. Para neutralizar este importante viés, sugerimos em estudos futuros que os machos sejam transferidos para um novo hospedeiro a cada novo grupo de fêmeas adicionado. Os autores observaram ainda que apenas o percentual de eclosão larval de *A. cajennense* foi influenciado pelo número de machos vivos ($p < 0,05$). Igualmente no presente estudo, a eclosão larval de *H. leporispalustris* foi influenciada pelo número de machos vivos ($p < 0,05$) e o peso da fêmea ingurgitada foi influenciado mais pela resistência do hospedeiro do que pelo número de machos vivos, pois o peso diferiu entre as infestações I e II ($p < 0,05$), e foi semelhante entre as infestações I e VI (novo hospedeiro) ($p > 0,05$).

3.7 CONCLUSÕES

Considerando-se os objetivos propostos pelo presente estudo, a metodologia empregada e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. As ninfas ingurgitadas de *H. leporispalustris* que mudaram para machos foram mais leves e apresentaram período parasitário mais curto que as que mudaram para fêmeas.
2. A variável peso da ninfa ingurgitada pode ser empregada como um meio para pré-determinar o sexo do adulto, devido ao pequeno percentual de ambos os sexos que tiveram pesos sobrepostos na mesma classe de frequência.
3. O modelo quadrático obteve melhor ajuste para representar o período parasitário de machos de *H. leporispalustris*.
4. O período parasitário de fêmeas de *H. leporispalustris* se alongou e a eclosão larval foi praticamente nula com o aumento do período parasitário de machos.
5. O período parasitário máximo alcançado pelos machos de *H. leporispalustris* foi de 117 dias, mas sua capacidade reprodutiva em coelhos domésticos é afetada pelo desenvolvimento de resistência pelo hospedeiro.

3.8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARBIERI, F.S.; CHACÓN, S.C.; FAMADAS, K.M.; DAEMON, E. Avaliação do peso e de parâmetros biológicos de ninfas ingurgitadas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) como prognóstico do sexo dos adultos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 10, n. 2, p. 83-86, 2001.
- BENNETT, G.F., Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acarina: Ixodidae). *Acarologia* v.16, p. 1652 -1661, 1974.
- COONEY, J.C.; HAYS, K.L. Bionomics of the gopher tortoise tick, *Amblyomma tuberculatum* Marx. *Journal of Medical Entomology*, v. 9, n. 3, p. 239-245, 1972.
- EDDY, G.W., JOYCE, C.R., Ticks collected on the Tama (Iowa) Indian Reservation with notes on other species. *Iowa St. Coll. J. Sci.* v.16, p. 539–543, 1942.
- EVANS, G.O. *Principles of Acarology*. CAB. Intern. Wallingford, Oxon. 1992, 563 p.
- FREITAS, L.H.T.; DAEMON, E.; PRATA, M.C.A.; FACCINI, J.L.H. Relação entre o peso e o número de larvas e ninfas ingurgitadas e entre o período de ingurgitamento ninfal e o sexo dos adultos de *Haemaphysalis leporispalustris* (Packard, 1869) (Acari: Ixodidae) em condições experimentais. *Revista Brasileira de Zoociências*, v. 2, n. 2, p. 21-32, 2000.
- GLADNEY, W.J.; DAWKINS, C.C.; PRICE, M.A. *Amblyomma inornatum* (Acarina: Ixodidae): natural hosts and laboratory biology. *Journal of Medical Entomology*, v.14, n. 1, p. 85-88, 1977.
- GUGLIELMONE, A.A.; MOORHOUSE, D.E. Differences in nymphs of *Amblyomma triguttatum triguttatum* Koch moulting to males and females. *Acarologia*, v. 26, n. 1, p. 7-11, 1985.
- HARRISON, B.A.; ENGBER, B.R.; APPERSON, C.S. Ticks (Acari: Ixodida) uncommonly found biting humans in North Carolina. *Journal of Vector Ecology*, v. 22, p. 6–12, 1997.
- HAYES, S.F.; BURGDORFER, W.; AESCHLIMANN, A. Sexual transmission of spotted fever group Rickettsiae by infected male ticks: detection of Rickettsiae in immature spermatozoa of *Ixodes ricinus*. *Infection and Immunity*. v. 27, n.2, p. 638-642, 1980.
- HOFFMAN, R.S. Ordem Lagomorpha. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. *Mammal species of the world. A taxonomic and geographical refernce*. 2. ed. Washington and London: Smithsonian Institution Press, 1993. p. 807-827.
- KNIGHT, M.M.; NORVAL, R.A.I.; REHAV, Y. The life cycle of the tick *Hyalomma marginatum rufipes* Koch (Acarina: Ixodidae) under laboratory conditions. *Journal of Parasitology*, v. 67, n. 1, p. 143-148, 1978.
- KOLLARS, T.M.; OLIVER, J.H. Host associations and seasonal occurrence of *Haemaphysalis leporispalustris*, *Ixodes brunneus*, *I. cookei*, *I. dentatus* and *I. texanus* (Acari: Ixodiade) in southeastern Missouri. *J. Med. Entomol.*, v.40, n.1, p.103-107, 2003.
- LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C. Reproductive aspects of *Haemaphysalis leporis-palustris*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, n. 3, p. 373-376, 1997.
- MERTINS, J.W.; SCHLATER, J.L.; CORN, J.L. Ectoparasites of the blackbuck antelope (*Antilope cervicapra*). *Journal of Wildlife Diseases*, v. 28, n. 3, p. 481-484, 1992.
- NEED, J.T.; DALE, W.E.; KEIRANS, J.M.; DASCH, G.A., Annotated list of ticks (Acari: Ixodidae: Argasidae) reported in Peru: distribution, hosts, and bibliography. *J. Med. Entomol.* v. 28, p. 590–597, 1991.

- NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F.; H.S. WALTERS. Laboratory investigations on the karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, v. 38, n. 3, p. 215-224, 1971.
- OLIVIERI, J.A.; DAEMON, E.; SERRA FREIRE, N.M. Correspondência entre o peso, período de pré-muda da metaninfa e o sexo do adulto em duas linhagens de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acarina: Ixodidae). *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro*, v. 26, p. 5-7, 1986.
- PINTER, A.; LABRUNA, M.B.; FACCINI, J.L.H. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. *Veterinary Parasitology*, n. 105, p. 79-88, 2002.
- PRATA, M.C.A.; FACCINI, J.L.H.; DAEMON, E. Relationship between weight and number of engorged *Amblyomma cajennense* larvae and nymphs (Fabricius, 1787)(Acari: Ixodidae) in experimental infestations on rabbits. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 7, n. 2, p. 107-111, 1998.
- RANDOLPH, S.E.; GERN, L.; NUTTALL, P.A. Co-feeding ticks: Epidemiological Significance for Tick-borne Pathogen Transmission. *Parasitology Today*, v. 12, p. 472-478, 1996.
- RECHAV, Y.; KNIGHT, M.M. Life cycle in the laboratory and seasonal activity of the tick *Rhipicephalus glabroscutatum* (Acarina: Ixodidae). *Journal of Parasitology*, v. 67, n. 1, p. 85-89, 1981.

3 CAPÍTULO II

**EFEITO DE *Rickettsia rickettsii*, AGENTE DA FEBRE MACULOSA BRASILEIRA,
SOBRE O CICLO DE VIDA DO CARRAPATO DO COELHO *Haemaphysalis
leporispalustris* (PACKARD, 1869) (ACARI: IXODIDAE).**

3.1 RESUMO

O carrapato do coelho *H. leporispalustris* possui importância como vetor e reservatório de *R. rickettsii* no meio silvestre. Neste estudo, procurou-se avaliar se a infecção por *R. rickettsii* pode exercer alterações no desempenho biológico de *H. leporispalustris*, utilizando-se de exemplares de coelhos domésticos como modelo animal. Avaliou-se a fase parasitária e não parasitária de larvas, ninfas e fêmeas do carrapato em cinco grupos experimentais estabelecidos. Três destes grupos foram gerados durante a alimentação de larvas, ninfas e adultos de *H. leporispalustris* não infectados a partir de inoculações em coelhos suscetíveis pela via peritoneal com 1 ml de células Vero infectadas com *R. rickettsii*. A biologia destes grupos foi acompanhada também na geração subsequente. O quarto grupo foi gerado através de co-parasitismo de machos de *H. leporispalustris* infectados com larvas não infectadas em coelhos sadios. O quinto grupo constituiu-se de carrapatos controle negativo. Os grupos diretamente alimentados em animais inoculados sofreram maior efeito da infecção sobre o desempenho biológico, com aumento do período parasitário, da mortalidade, diminuição do peso e do período de postura. O grupo infectado na fase de ninfa gerou fêmeas mais leves, que produziram menos ovos que não se desenvolveram adequadamente (baixa eclosão). O quarto grupo experimental representa o modelo mais próximo ao que ocorre na condição natural. Este grupo apresentou larvas mais pesadas e menor mortalidade de larvas e ninfas ingurgitadas em relação ao controle. A eficiência na ecdise de ninfas foi maior e mesmo as fêmeas ingurgitadas apresentando menor peso, obtiveram Índice de Eficiência Reprodutiva superior ao do grupo controle.

3.2 ABSTRACT

The rabbit tick *H. leporispalustris* is an important vector and reservoir of *R. rickettsii* in the wild way. In this study, the effect of infection of *R. rickettsii* in the biological data of *H. leporispalustris* was evaluated, using domestic rabbits as animal model. The parasitic and no parasitic phase of larvae, nymphs and females of the tick was evaluated in five experimental groups. Three of these groups were generated during the feeding of no infected larvae, nymphs and adults of *H. leporispalustris* in rabbits inoculated by peritoneum via with 1 cc of *R. rickettsii* infected Vero cells. The biology of these groups was also accompanied in the subsequent generation. The fourth group was generated through co-parasitism of infected males of *H. leporispalustris* with no infected larvae in healthy rabbits. The fifth group was constituted of negative control ticks. The groups that fed directly in inoculated animals suffered larger effect of the infection on the biological pattern, with increase of the parasitic period and mortality, and decrease of body weight and oviposition period. The group infected in the nymph phase generated lighter females, that produced less eggs than didn't developed appropriately (low hatching). The fourth experimental group reproduces the model that occurs in the natural condition. These group presented heavier larvae and smaller mortality of engorged larvae and nymphs, in relation to the control. The efficiency in the ecdysis of nymphs was higher and, even the engorged females presenting smaller weight, they obtained higher REI than ticks of the control group.

3.3 INTRODUÇÃO

Nos EUA e Canadá o papel de *H. leporispalustris* e seus hospedeiros como vetores e reservatórios para a Febre Maculosa das Montanhas Rochosas já foi investigado em alguns estudos (Jellison, 1945; Parker, 1923; Parker et al., 1951; Sonenshine e Clifford, 1973), apontando para a importância de *H. leporispalustris* na manutenção do ciclo silvestre da doença. No Brasil, nenhum estudo ainda foi conduzido no sentido de se conhecer o desempenho de *H. leporispalustris* frente à infecção por *R. rickettsii* e seu potencial como vetor e reservatório da Febre Maculosa Brasileira.

Estudos com outras espécies de carrapatos avaliaram os possíveis efeitos de agentes infecciosos, como protozoário ou bactérias, no organismo de seus carrapatos hospedeiros, contudo, nenhum registro foi encontrado sobre a avaliação de possíveis efeitos de *R. rickettsii* sobre biologia de *H. leporispalustris*. Tais estudos constataram a ocorrência de lesões atribuídas ao agente infeccioso em diversos tecidos dos ixodídeos (Watt e Walker, 2000; Santos et al., 2002), assim como alterações nos parâmetros biológicos destes artrópodes (Burgdorfer e Brinton, 1975; Hu et al, 1997; Nieblyski et al., 1999; Watt e Walker, 2000;). Outros ainda verificaram que existe competição entre diferentes espécies de *Rickettsia* pelo estabelecimento da infecção no organismo do artrópode (Burgdorfer et al., 1981; Macaluso et al., 2002). Ao que tudo indica, o ciclo de vida do carrapato é afetado pela presença de tais agentes patogênicos, mais do que se pressupõe.

Tendo em vista as lacunas apontadas, o presente trabalho objetivou verificar o comportamento do ixodídeo *H. leporispalustris* frente à infecção experimental por uma cepa brasileira de *R. rickettsii*, observando os possíveis efeitos deletérios desta bactéria sobre o desempenho parasitário e parâmetros biológicos do carrapato, utilizando coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) como modelo animal.

3.4 REVISÃO DA LITERATURA

A influência de patógenos sobre a biologia de carrapatos começou a ser observada por Burgdorfer e Brinton (1975) estudando carrapatos *Dermacentor andersoni* infectados. Segundo os autores, o efeito deletério de *R. rickettsii* sobre o ciclo de vida do carrapato seria detectado apenas à partir de gerações filiais mais afastadas daquela em que ocorreu a infecção. Estes autores observaram que à partir da quinta geração filial de *D. andersoni* infectada ocorreu um aumento na mortalidade de fêmeas ingurgitadas e as fêmeas sobreviventes tiveram sua postura reduzida em $\frac{1}{3}$ ou em até na metade. Adicionalmente, verificaram que a eficiência na transmissão transovariana depende primariamente do grau de desenvolvimento da riquétsia nos oócitos, o que por sua vez depende da fase de vida em que os carrapatos são infectados. Desta forma, carrapatos infectados na fase de larva e de ninfa sofrem infecção massiva do ovário quando na fase adulta e, se o carrapato for infectado durante o estágio adulto, a infecção ovariana é limitada.

Burgdorfer et al. (1981) reportaram a existência de uma espécie não patogênica de riquétsia a qual chamou de “eastside agent” (*R. peacockii*), com prevalência em 80% dos *D. andersoni* amostrados, que impede a propagação de *R. rickettsii* no tecido ovariano e sua conseqüente transmissão transovariana, por meio de competição interespecífica pela infecção no organismo do carrapato. O “eastside agent” tem sua propagação restrita ao intestino e ovário, sendo considerada de pouca patogenicidade tanto para carrapatos como para vertebrados. Esta observação explicaria em parte a razão da baixa prevalência de *R. rickettsii* na natureza, pois além desse fato, *R. rickettsii* é altamente patogênica tanto para o carrapato como para o hospedeiro vertebrado.

Outro fato relevante na epidemiologia da Febre Maculosa é o fato da infecção no organismo carrapato estar condicionada à quantidade de bactérias ingeridas pelo mesmo, modulando a intensidade dos efeitos deletérios do agente infeccioso sobre o organismo do carrapato, conforme relatou Burgdorfer (1988).

No Brasil, Barreira (1988) realizou estudos sobre a caracterização morfológica, aspectos biológicos e patogenia das formas evolutivas de *Babesia bovis* e *B. bigemina* em *Boophilus microplus*. Comprovou a interferência da infecção por *B. bigemina* e *B. bovis* em relação ao peso e postura das teleóginas após desprenderem-se naturalmente do hospedeiro. Do total de 100 teleóginas coletadas de bovinos com parasitemia de 1,5% para *B. bigemina* e 0,4% para *B. bovis*, 96% apresentaram-se infectadas. Para o segundo grupo de teleóginas ingurgitadas em bovinos com parasitemia de 1,8% para *B. bigemina* e 0,7% para *B. bovis*, a taxa de infecção observada foi de 88%. A taxa de mortalidade observada no primeiro e segundo grupo de teleóginas, durante o sétimo e o 12º dia, de incubação foi de 94,8% e 75,0%, respectivamente.

Hu et al. (1997) avaliaram os efeitos da infecção de *Babesia microti* no padrão alimentar, peso do espécime ingurgitado, e percentual de muda de *Ixodes scapularis* imaturos, utilizando-se de hamsters sírios (*Mesocricetus auratus*) como modelo animal. Os autores não encontraram diferenças significativas no padrão parasitário e no peso e na muda de larvas alimentadas em animais sadios e infectados. Contudo, o período parasitário de carrapatos que

se alimentavam nos animais infectados atrasou. Já as ninfas apresentaram peso significativamente mais elevado quando se alimentaram em animais infectados.

Avaliando o efeito letal de *R. rickettsii* em *D. andersoni*, Nieblyski et al. (1999) utilizaram como hospedeiros, cobaios saudáveis e inoculados via peritoneal, com 10^5 organismos para cada ml. *R. rickettsii* foi letal para a maioria dos carrapatos infectados transovarianamente. Aproximadamente 94% das ninfas infectadas quando larvas em cobaios positivos morreram durante a muda para adultos e 88% das fêmeas jovens infectadas na fase de ninfa, morreram antes de alimentar-se. *Rickettsiae* foi transmitida verticalmente para 39% da progênie.

Watt e Walker (2000) observaram efeitos patológicos e redução da sobrevivência em *Rhipicephalus appendiculatus* infectados com *Theileria parva*. Alimentaram ninfas livres de *T. parva* em um bezerro inoculado com suspensão de *R. appendiculatus* infectado macerado. Observaram à microscopia óptica e eletrônica lesões no intestino e atrofia da glândula salivar de carrapatos infectados. A mortalidade de ninfas ingurgitadas infectadas aumentou de 5% para 100%, em períodos de maior parasitemia e o processo de muda foi retardado também (período de muda aumentou). A capacidade reprodutiva (representada pela capacidade de ingurgitamento das fêmeas, produção de ovos e qualidade de ovos) revelou-se menor nos carrapatos infectados. O período parasitário das fêmeas, embora mais longo não se traduziu por um maior peso final e nem por uma maior produção de ovos. A eclosão larval caiu de 60% para 10% no grupo infectado.

Dando continuidade a seus estudos sobre os efeitos da infecção de *B. bigemina* e *B. bovis* sobre os parâmetros biológicos do carrapato *B. microplus*, Barreira (2001) avaliou o comportamento biológico das cepas de *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* modificadas por 11 passagens sucessivas em hospedeiros esplenectomizados, e não modificadas e seus efeitos sobre os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*. Utilizou para isso, bezerros da raça Holandês, não infectados com *B. bovis* e *B. bigemina*. O comportamento e infecção das cepas de *B. bovis* e *B. bigemina* foram avaliados em amostras de hemolinfa, conteúdo intestinal e ovário do carrapato vetor, corados pelo método de Giemsa. Na infecção das fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* com cepas de *B. bovis* e *B. bigemina* não modificadas, observou-se alterações significativas sobre os parâmetros biológicos na fase de vida livre do carrapato vetor. Neste grupo foi observado aumento no período de pré-postura, peso final das fêmeas, redução no período de postura, peso de postura, número de ovos, índice de produção de ovos, índice de eficiência reprodutiva e índice real de conversão. O período de incubação, período de eclosão e percentual de eclosão dos ovos foram iguais a zero. Já as cepas modificadas não determinaram alterações significativas nos parâmetros biológicos dos diferentes grupos de fêmeas de *B. microplus*.

A competição interespecífica entre distintas espécies de riquetsia na infecção de *Dermacentor variabilis* foi estudada por Macaluso et al. (2002). Este experimento testou a habilidade dos carrapatos em manter múltiplas espécies de riquetsias do grupo da Febre Maculosa através da transmissão transovariana, por duas gerações consecutivas. Carrapatos infectados com *R. montana* ou *R. rhipicephali* foram expostos, por meio de alimentação artificial em capilar, a células Vero contaminadas com a espécie de *Rickettsia* contrária ao qual estavam primariamente infectados. Após a alimentação artificial, as fêmeas foram colocadas a se alimentar novamente em coelhos juntamente com machos não infectados, para a realização da cópula até completo ingurgitamento. Com isto, estabeleceu-se grupos de fêmeas ingurgitadas de *Dermacentor variabilis* co-infectadas com *R. Montana* e *R. rhipicephali*. Não observaram diferenças de peso de fêmea ingurgitada, índice de Eficiência Reprodutiva (IER) e peso da massa de ovos em nenhum grupo. Massas de ovos dos dois grupos foram comparadas através da PCR. Cada grupo infectado inicialmente por uma

espécie de *Rickettsia* foi refratário a uma segunda infecção com outra espécie. O grupo infectado com *R. rhipicephali*, não apresentou nenhuma PCR positiva na geração de adultos seguinte. O trabalho relatou pela primeira vez a competição entre duas espécies de riquetsia não patogênicas, resultando na exclusão de uma delas.

3.5 MATERIAL E MÉTODOS

3.5.1 Local de Realização

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Doenças Parasitárias, do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal (VPS), da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia (FMVZ) da Universidade de São Paulo (USP), localizada no Município de São Paulo (Lat.: 23° 32' S; Long: 46° 38' W Grw; Alt.: 760m), Brasil, no período compreendido entre agosto de 2004 e outubro de 2005.

3.5.2 Origem da Colônia de *H. leporispalustris*

Os carrapatos para o presente estudo têm sua origem de colônia mantida no Laboratório de Ixodologia, situado na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz (EPPOWON), do Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ). Esta colônia foi mantida em laboratório por aproximadamente 13 gerações alimentada em coelhos domésticos (*O. cuniculus*) na fase de parasitismo e mantidos em câmara climatizada (BOD) regulada a 27°C, UR ≥ 85% e escotofase durante a fase de vida livre.

3.5.3 Origem do Cultivo de *R. rickettsii*

O cultivo de *R. rickettsii* utilizado para estabelecimento da infecção nos carrapatos foi de 4ª passagem em células Vero, no sistema Shell Vial. Foi inicialmente isolado de carrapatos *Amblyomma aureolatum*, provenientes do Município de Moji das Cruzes (Lat.: 23° 31' S; Long.: 46° 11' W Grw; Alt.: 742m), Estado de São Paulo, local onde ocorreram casos fatais de febre maculosa recentemente (Fontes et al., 2000).

3.5.4 Origem dos Exemplos de *Oryctolagus cuniculus* e de *Cavia porcellus*

Foram utilizados coelhos da raça Nova Zelândia Branco, do sexo masculino, com idade compreendida entre 60 a 90 dias, com peso inicial de 1,8 a 2,5 kg, sem contato prévio com carrapatos e produtos acaricidas, provenientes do Biotério Central do Instituto Butantan, São Paulo - SP. Os cobaios utilizados foram procedentes do Laboratório Biovet (Vargem Grande, SP), de idade adulta, do sexo masculino e sem contato prévio com nenhuma droga antimicrobiana e antiparasitária.

3.5.5 Procedimentos

A ausência da infecção de larvas de *H. leporispalustris* de 13^o geração para *R. rickettsii* foi comprovada através da PCR.

O experimento compreendeu duas etapas de realização, na primeira etapa, foram criadas sub-populações de *H. leporispalustris* infectados por *R. rickettsii* em diferentes momentos do ciclo de vida do carrapato, por meio de alimentação em coelhos inoculados por via peritoneal com 1 mL de cultivo de células Vero com aproximadamente 80% de infecção, contendo 10⁶ *R. rickettsii*, em solução de BHI.. Nesta etapa foram criados os grupos infectados na fase de alimentação de larva (G1), na fase de alimentação de ninfas (G2) e na fase de alimentação de adultos (G3). Para cada grupo, dois coelhos foram utilizados. Cobaios testemunhas da inoculação foram igualmente inoculados com a mesma alíquota destinada aos coelhos.

A segunda etapa compreendeu o estabelecimento de um quarto grupo experimental (G4), obtido através de co-parasitismo de larvas livres de *R. rickettsii* com machos infectados dos grupos G1, G2 e G3 em coelhos sadios. Foi feito acompanhamento de todos os grupos previamente estabelecidos durante uma geração completa, sendo os carrapatos alimentados em coelhos sadios da fase de larva até a fase adulta, reproduzindo um modelo mais aproximado ao que ocorre na situação natural.

A fase parasitaria dos carrapatos foi realizada sob condições não controladas de temperatura e umidade. A infestação dos coelhos foi feita utilizando-se a técnica do saco de pano aderido aos pavilhões auriculares empregada por Neitz et al. (1971). Os coelhos permaneceram alojados no Biotério do VPS, durante o período experimental, sendo mantidos em sala isolada dos demais animais e em gaiolas individuais, com dupla bandeja suporte de alumínio, sendo a mais externa, de maiores dimensões e seus bordos recobertos com fita dupla face. Os animais receberam diariamente ração comercial para coelhos e água a vontade.

Larvas e ninfas ingurgitadas e naturalmente desprendidas foram coletadas diariamente, formando-se grupos de 25 indivíduos que foram e pesados em balança analítica e posteriormente acondicionados em tubos plásticos, fechados com algodão e transferidos para as condições experimentais descritas para a fase não parasitária. As fêmeas ingurgitadas diariamente coletadas e naturalmente desprendidas foram pesadas individualmente, fixadas em placas de Petri por meio de fita dupla face, em decúbito dorsal e de acordo com o grupo experimental, e transferidas para estufas incubadoras reguladas nas mesmas condições descritas anteriormente.

Para cada coelho utilizado, dois cobaios foram inoculados com 1 mL de sangue de coelho obtido por punção da veia safena lateral, servindo estes animais como testemunhas da infecção, por serem mais suscetíveis à infecção por *R. rickettsii*.

Tanto na primeira como na segunda etapa do experimento e em todas as fases do ciclo de vida de *H. leporispalustris*, carrapatos livres da infecção foram alimentados em dois coelhos sadios e nunca antes infestados, formando o grupo controle (GC).

Cada grupo experimental, uma vez formado, seguiu com o ciclo de vida do carrapato isoladamente dos demais grupos, tomando-se o extremo cuidado em nunca se misturar os carrapatos de um grupo com os outros. Os carrapatos do GC sempre foram manipulados em primeiro lugar, sendo uma medida extra de segurança.

Em cada etapa do experimento e em cada fase do ciclo de vida do carrapato, alíquotas de carrapatos, sangue de coelho e baço de cobaio foram coletados, para a confirmação da infecção por *R. rickettsii* pela PCR. Amostras positivas da segunda etapa foram submetidas ao seqüenciamento. A progênie de todos os grupos experimentais obtidos ao final da segunda etapa foi acompanhada até o final da eclosão das larvas, sendo que a infecção das mesmas por *R. rickettsii* foi confirmada ou descartada pela PCR e seqüenciamento.

Os cobaios e coelhos da primeira e segunda etapa foram acompanhados diariamente até o aparecimento e recrudescimento da sintomatologia característica: febre alta (os valores

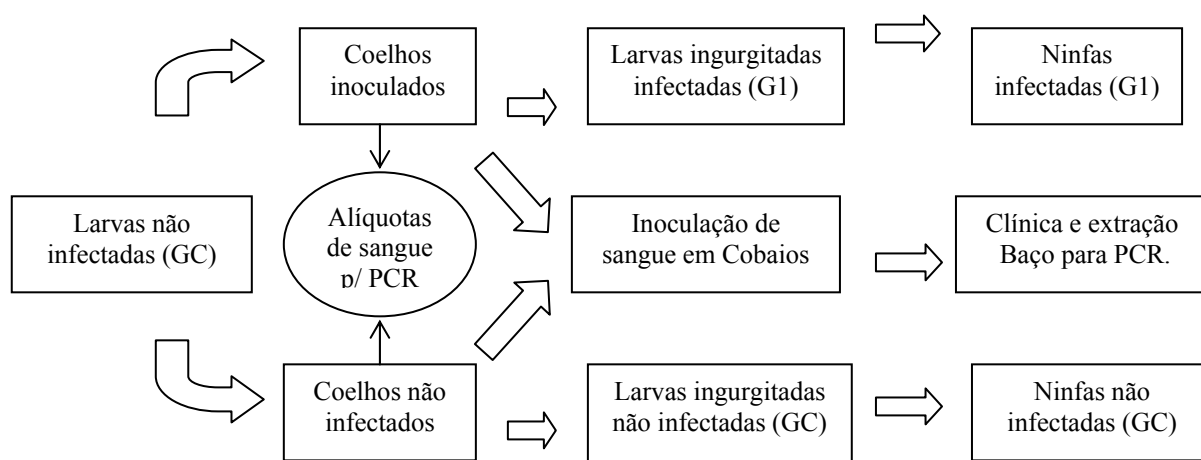
normais de temperatura retal em coelhos apresentam-se na faixa de 38,5°C a 40,0°C, com média 39,5°C, segundo Hillyer e Quesenberry (1997)), edema e necrose da pele da bolsa escrotal. Além da temperatura retal¹ e inspeção da bolsa escrotal, a inapetência, diarreia e comprometimento respiratório foram acompanhados diariamente. Alíquotas de soros dos coelhos foram obtidas no dia “zero” da infestação e novamente trinta dias após a mesma, para a pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii*.

Ao final de cada etapa do experimento os coelhos infectados foram eutanasiados de acordo com o Protocolo proposto pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea), seguindo os Princípios Éticos na Experimentação Animal (1991). Tal Protocolo preconiza a eutanásia em coelhos por meio de sobredosagem de Cetamina associada com Xilazina, por via intravenosa (veia safena lateral), seguindo-se de infusão intracardiaca de Cloreto de Potássio (KCl) quando se fez necessário, e em cobaios pelo uso de Cetamina associada com Xilazina (1ml/animal/IM), seguida de infusão intracardiaca de Cloreto de Potássio (KCl), quando se fez necessário.

As carcaças de todos os animais foram autoclavadas e descartadas em local próprio para este fim.

As alíquotas de carrapatos, sangue, soro e baço foram acondicionadas em criotubos com 1,5 mL de capacidade, rotulados e mantidos em freezer a -80 °C até o processamento dos mesmos.

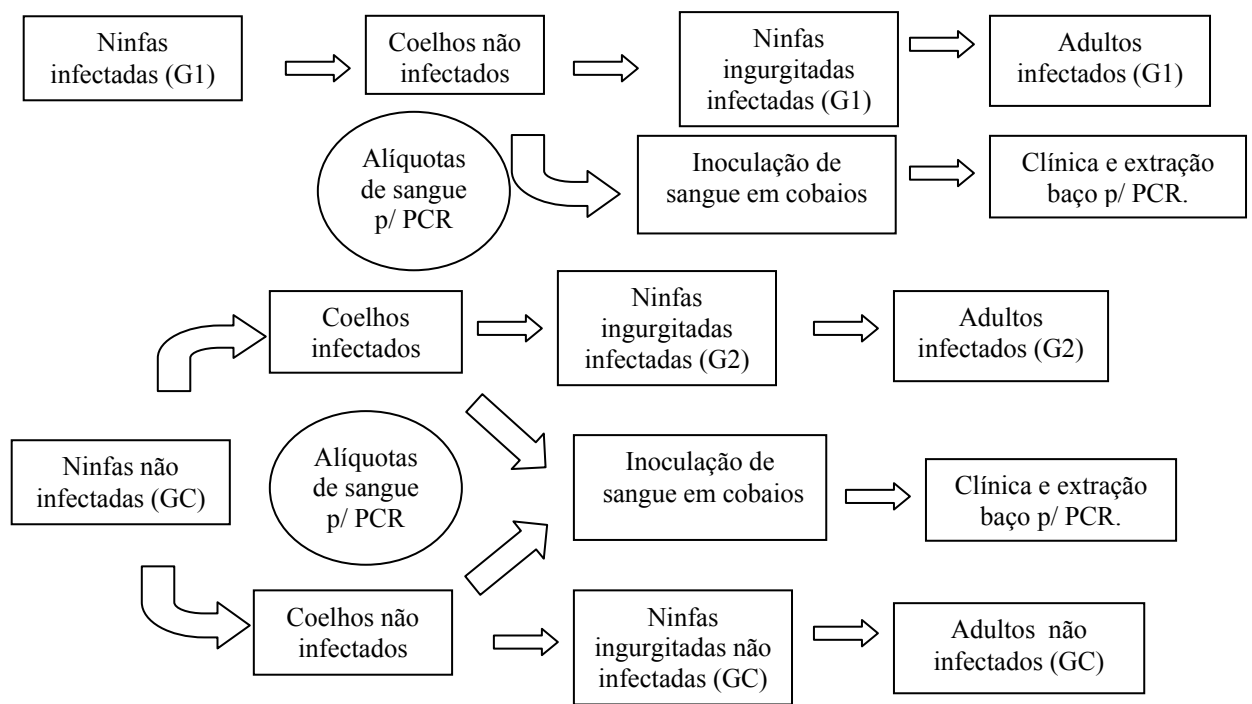
Os fluxogramas das infestações, presentes nas Figuras 5, 6, 7 e 8 esclarecerão a dinâmica das mesmas.



(USP, 2005)

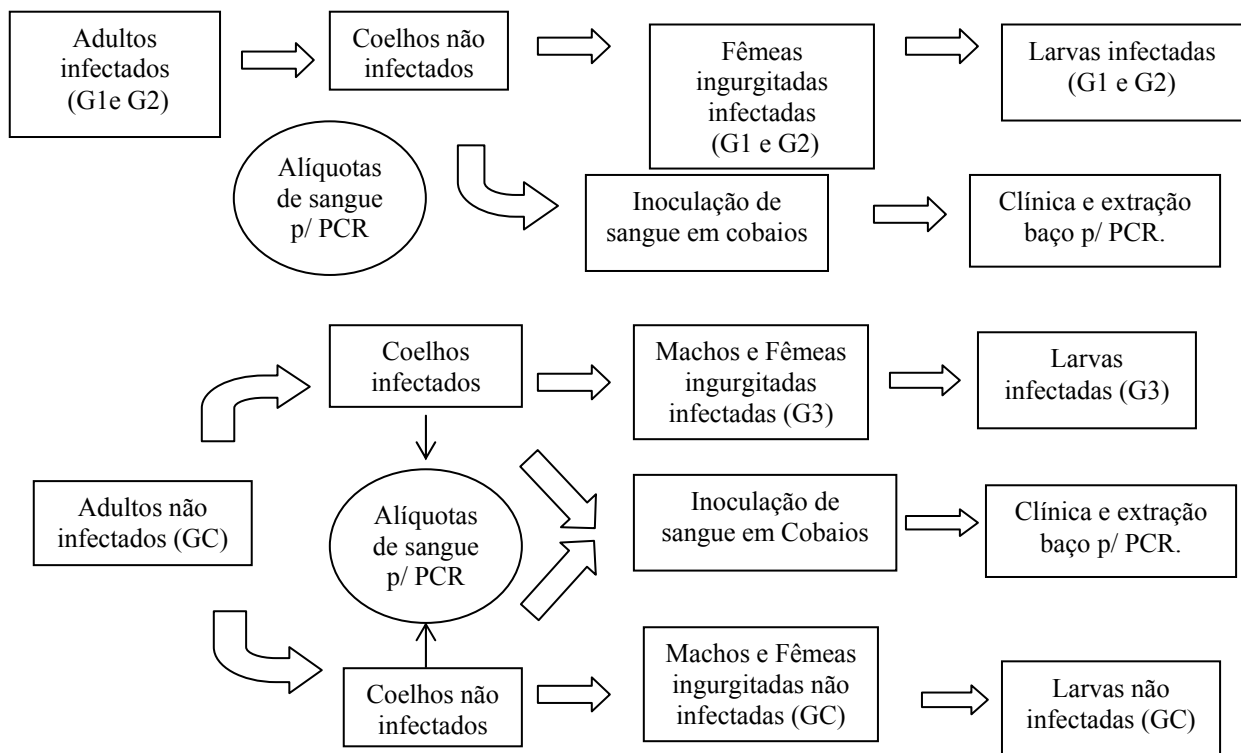
Figura 5. Fluxograma das infestações com larvas de *H. leporispalustris*. GC= Grupo Controle; G1= grupo infectado por *R. rickettsii* na fase de larval.

¹ Termômetro Oregon Scientific® (modelo nº THG312)



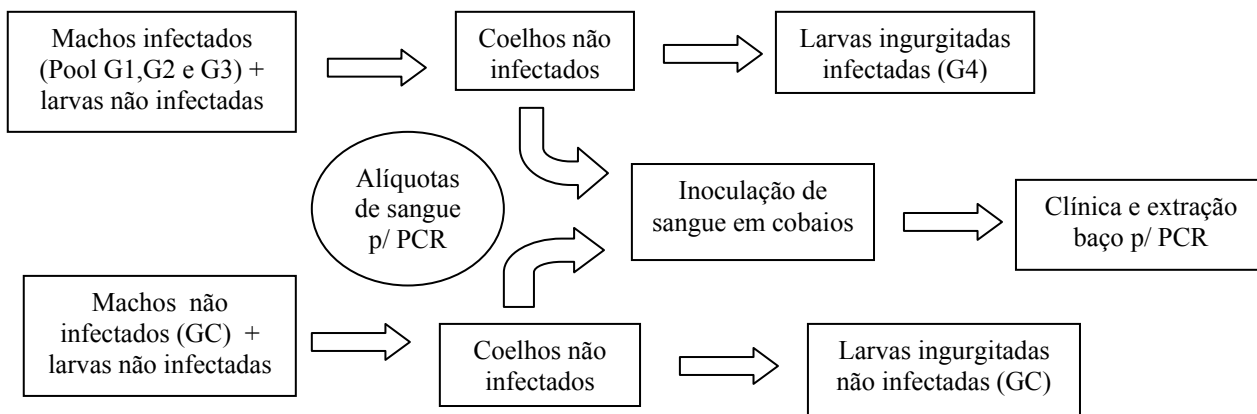
(USP, 2005)

Figura 6. Fluxograma das infestações com ninfas de *H. leporispalustris*. GC= Grupo Controle; G1= grupo infectado por *R. rickettsii* na fase de larval e G2 = grupo infectado por *R. rickettsii* na fase ninfal.



(USP, 2005)

Figura 7. Fluxograma das infestações com adultos de *H. leporispalustris*. GC= Grupo Controle; G1; G2= grupo infectado por *R. rickettsii* na fase ninfal e G3 = grupo infectado por *R. rickettsii* na fase de adultos.



(USP, 2005)

Figura 8. Fluxograma das infestações com larvas de *H. leporispalustris* livres de *R. rickettsii* em conjunto com machos infectados. GC= controle e G4= grupo infectado na fase larval pelo coparasitismo com machos infectados por *R. rickettsii*.

3.5.6 Detecção de *R. rickettsii* pela Técnica da PCR

A extração do DNA dos carrapatos foi realizada conforme adaptação do protocolo descrito por Chomkzynski (1993), método a base de fenol e Isotiocianato de Guanidina. Grupos de larvas (grupos de 5 indivíduos), larvas ingurgitadas (grupos de 3 indivíduos), ninfas (grupos de 3 indivíduos), ninfas ingurgitadas (grupos de 3 indivíduos), adultos jovens e machos (individual) após a alimentação foram triturados em um tubo plástico de 1,5 ml de capacidade, com o auxílio de um micropistilo. O material extraído final foi armazenado em congelador comum (-20° C).

As amostras de DNA foram processadas individualmente pela PCR com *primers* do gene Citrato Sintase (*gltA*) CS-78 (GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT) e CS-323 (GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT) específicos para o gênero *Rickettsia*, de acordo com o estudo previamente conduzido por Labruna et al. (2004). A PCR foi realizada empregando-se metodologia adaptada de Eremeeva et al. (1994), segundo a qual cinco microlitros do DNA teste são colocados em um tubo, juntamente com os demais reagentes em concentrações específicas para cada oligonucleotídeo iniciador (*primer*).

Para confirmação do DNA amplificado, 10 µl do material final foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 2%² sob 100 V e 40 mA, por 30 min aproximadamente e posteriormente corado por brometo de etídio durante 25 min aproximadamente, e observado em luz de ultra violeta para visualização das bandas correspondentes.

Alíquotas de sangue dos coelhos e fragmentos de baço dos cobaias foram submetidos a extração de DNA utilizando-se kit comercial³, e submetida ao PCR, utilizando-se primers para o gene Citrato Sintase.

² Sigma®

³ Dneasy Tissue Kit (250) (Quiagen® catalogo nº 69506)

As amostras de DNA positivas foram purificadas pela adição de Isopropanol, centrifugação, etanol, centrifugação, dessecação do DNA em termobloco e ressuspender em TE. O DNA purificado foi quantificado utilizando-se padrão de peso molecular “low mass”, segundo as recomendações do fabricante⁴.

Para a reação de seqüenciamento automático, foi utilizado “kit” comercial⁵. O seqüenciador de DNA⁶ foi utilizado segundo seu manual de instruções (“Automated DNA Sequencing”, 1998). As seqüências obtidas foram alinhadas pelo pacote de programas Bioedit® e comparadas com as seqüências descritas para outras espécies de riquetsias, disponíveis no “GenBank”, determinando-se a porcentagem de identidade entre as diferentes amostras.

3.5.7 Confirmação da Infecção dos Coelhos pela Técnica da Imunofluorescência Indireta

A sorologia foi realizada pela técnica da Imunofluorescência Indireta (RIFI), com titulação seriada de 1:64 a 1:1024. Foram investigados os soros dos coelhos antes do parasitismo pelos carrapatos (dia zero) e ao dia +30 após a infestação. Os soros analisados foram os dos animais utilizados nas infestações com larvas, ninfas e adultos da geração filial dos grupos GC, G1, G2 e G3 e os dos coelhos infestados em todas as fases do G4 com respectivo controle. Utilizou-se conjugado Anti-IgG de Coelho⁷ com titulação 1:400, lâminas teste padrão fixadas com células Vero infectadas com *R. rickettsii* produzidas no Laboratório de Doenças Parasitárias, e microscópio UV para a visualização da fluorescência.

3.5.8 Parâmetros biológicos de *H. leporispalustris*

Nos cinco grupos experimentais estabelecidos (GC, G1, G2, G3 e G4) e nas duas etapas do experimento, avaliou-se: o poder infestante dos carrapatos, pela observação do período parasitário e recuperação de indivíduos ingurgitados; o peso dos carrapatos ingurgitados; período de ecdise de larvas e de ninfas ingurgitadas; mortalidade de larvas e ninfas ingurgitadas; percentual de ecdise de larvas e de ninfas ingurgitadas; em relação as fêmeas, avaliou-se também o período pré-postura, período de postura, Índice de Eficiência Reprodutiva (IER) (Drummond e Whetstone, 1970); e, em relação à massa de ovos, avaliou-se o peso da massa de ovos e o número de ovos por grama de postura (OPG), pela pesagem de 10 alíquotas de 50 ovos cada, para cada tratamento, além do período de incubação dos ovos e percentual de eclosão das larvas.

3.5.9 Estatística

A análise dos parâmetros biológicos dos grupos experimentais de *H. leporispalustris* foi realizada utilizando-se o programa estatístico Graphpad InStat®. Os dados foram submetidos à

⁴ Invitrogen/Life Technologies

⁵ Big Dye TM Terminator – Cycle Sequencing Ready Reaction – Applied Biosystems

⁶ modelo ABI Prism 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems/Perkin Elmer)

⁷ SIGMA® (Catálogo nº F0382, produzido em caprino)

Análise de Variância (ANOVA), seguida do teste de Dunnett e teste de Tuckey-Kramer ou ao teste “t” não pareado, quando houveram apenas dois tratamentos. Quando os valores não obedeceram a uma distribuição normal (teste de Bartlett), o teste não paramétrico de Dunn ou de Mann-Whitney (dois tratamentos apenas) foram empregados. O nível de significância adotado em todos os casos foi de 5%.

3.6 RESULTADOS

3.6.1 Efeito da Infecção de *R. rickettsii* Sobre a Biologia de *H. leporispalustris* Transmitida Por Meio de Inoculações Maciças

O desempenho biológico dos *H. leporispalustris* que foram infectados durante o repasto sanguíneo em coelhos inoculados com doses maciças de *R. rickettsii* (aproximadamente 10^6 células Vero, com 80% de infecção) por via intraperitoneal pode ser verificado nas Tabelas 5, 6 e 7.

O período parasitário de larvas e ninfas (Tabelas 5 e 6) dos grupos imediatamente expostos a coelhos inoculados (G1, na Tabela 5 e G2, na Tabela 6) se estendeu em relação aos demais grupos, culminando com um menor ganho de peso final dos indivíduos ingurgitados e um aumento na mortalidade de larvas e ninfas ingurgitadas, evidenciando que a eficiência no parasitismo foi comprometida. As larvas ingurgitadas alimentadas nos coelhos inoculados (Tabela 5, G1) apresentaram maior êxito na ecdise que as do grupo controle, atuando de forma compensatória frente ao pior desempenho no parasitismo. A recuperação das ninfas ingurgitadas foi maior no grupo exposto aos coelhos infectados (Tabela 6, G2), no entanto, as mesmas apresentaram menor êxito na ecdise.

Tabela 5. Dados sobre o desempenho biológico de larvas de *H. leporispalustris* infectadas com *R. rickettsii* durante a alimentação em coelhos artificialmente inoculados.

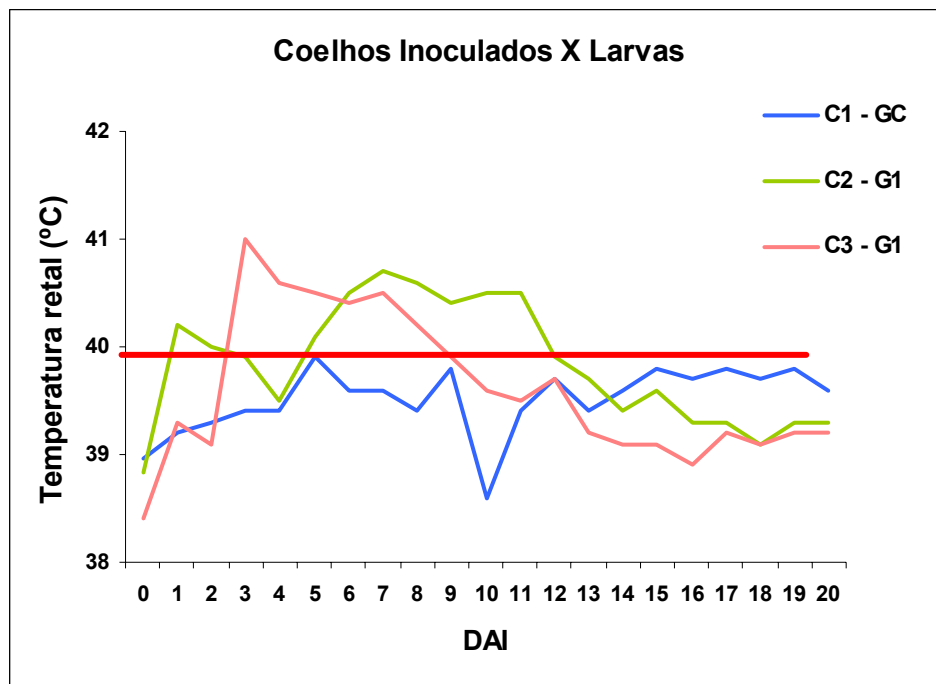
Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	G1
Período parasitário larvas (dias)	* 1527 (6 – 10) 8,27B ± 1,16	2903 (6 – 13) 9,62A ± 1,79
Peso 25 larvas ingurgitadas (mg)	24 (7 – 8,2) 7,60A ± 0,31	54 (5,6 – 7,8) 6,70B ± 0,47
Recuperação (%)	3000 50,09A ± 0,00	6000 48,35A ± 0,35
Mortalidade larvas ingurgitadas (%)	1527 18,00B ± 2,52	2903 (21,0 – 27,3) 24,00A ± 3,75
Período ecdise (dias)	1246 (14 – 19) 16,89A ± 1,20	2201(12 – 22) 16,98A ± 1,70
Ecdise (%)	1246 (10 – 70) 32,63B ± 20,23	2201(10 – 100) 56,25A ± 24,07

Médias aritméticas seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%.
*Número de carrapatos (Limites); Média ± desvio padrão. (USP, 2004).

Todos os inóculos de *R. rickettsii* utilizados para a criação dos grupos experimentais desta fase foram efetivos em cobaias suscetíveis, conforme pode ser observado nas Figuras 10, 12 e 15, para a criação dos Grupos 1, 2 e 3 de carrapatos infectados, respectivamente.

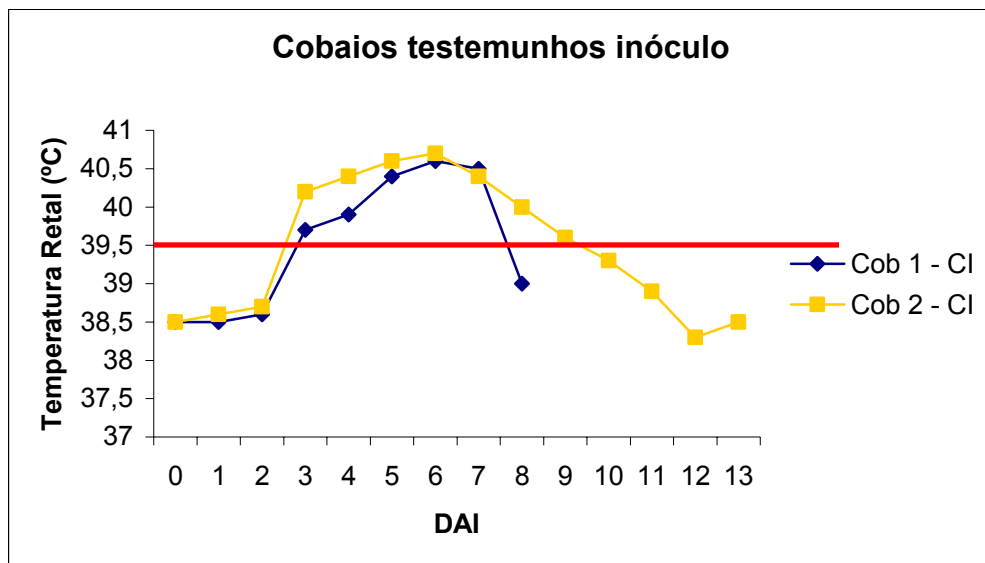
Em relação à curva de temperatura dos coelhos utilizados para as fases de parasitismo

de larvas, ninfas e adultos (figuras 9, 11 e 14, respectivamente) notamos que os animais inoculados apresentaram elevação da temperatura mais precocemente (dia +2) que os animais que foram infestados por carrapatos infectados (dia +6 em diante), tal fato deve-se provavelmente a ocorrência da reativação da riquetsia no organismo do carrapato a partir da fixação do mesmo no hospedeiro (Burgdorfer, 1988). Na inoculação isto não ocorre, uma vez que a riquetsia já se encontra na forma ativa.



(USP, 2004)

Figura 9. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC) e do grupo infectado por inoculação peritoneal de *R. rickettsii* (G1), de acordo com o dia após a infecção/infestação (DAI).



(USP, 2004)

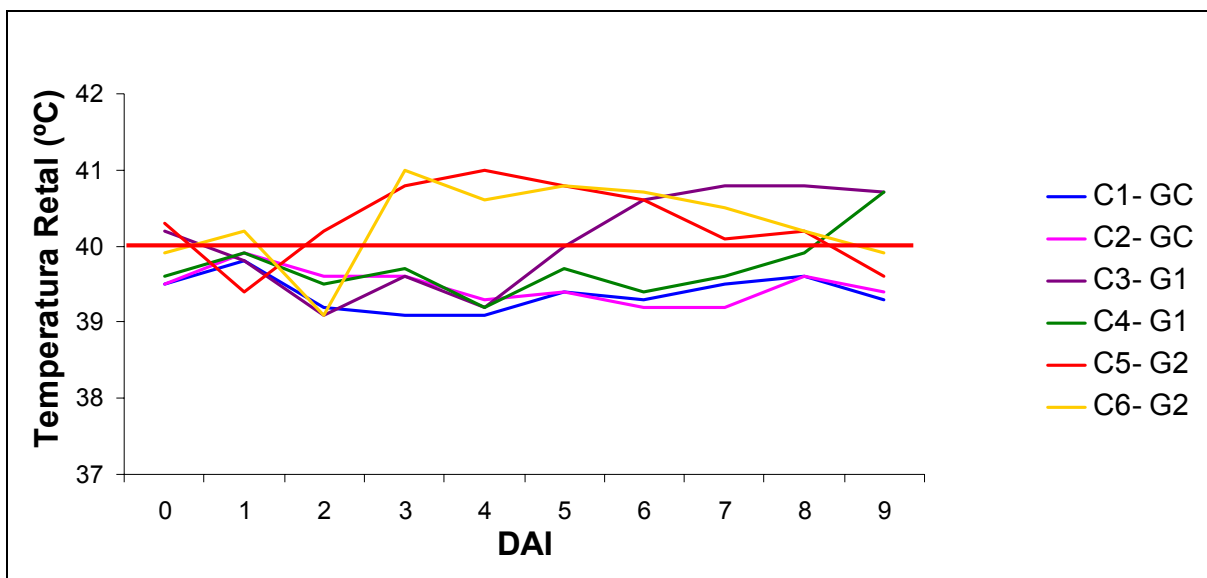
Figura 10. Curvas de temperatura retal de cobaios testemunhos do inóculo de *R. rickettsii* utilizados nos coelhos do G1, de acordo com o dia após a infecção (DAI).

Tabela 6. Dados sobre o desempenho biológico de ninfas de *H. leporispalustris* infectadas com *R. rickettsii* durante a alimentação em coelhos artificialmente inoculados (G2), em contraste com o grupo controle e o grupo infectado na fase larval (G1).

Parâmetros	Grupos Experimentais		
	Controle	G1	G2
Período parasitário ninfas (dias)	* 329 (6 – 9) 8,54B ± 0,73	278 (6 – 9) 8,52B ± 0,82	586 (7 – 9) 8,85A ± 0,41
Peso 25 ninfas Ingurgitadas (mg)	10 (35,1 – 42,0) 37,67A ± 2,40	10 (31,0 – 38,3) 34,24B ± 2,94	10 (31,0 – 37,9) 34,70B ± 2,91
Recuperação (%)	800 41,25B ± 5,66	800 34,75C ± 5,30	800 73,25A ± 2,48
Mortalidade ninfas ingurgitadas (%)	329 38,78B ± 2,49	278 38,92B ± 3,72	586 48,54A ± 5,74
Ecdise (%)	202 61,02A ± 2,77	169 61,08A ± 3,72	300 51,46B ± 5,73

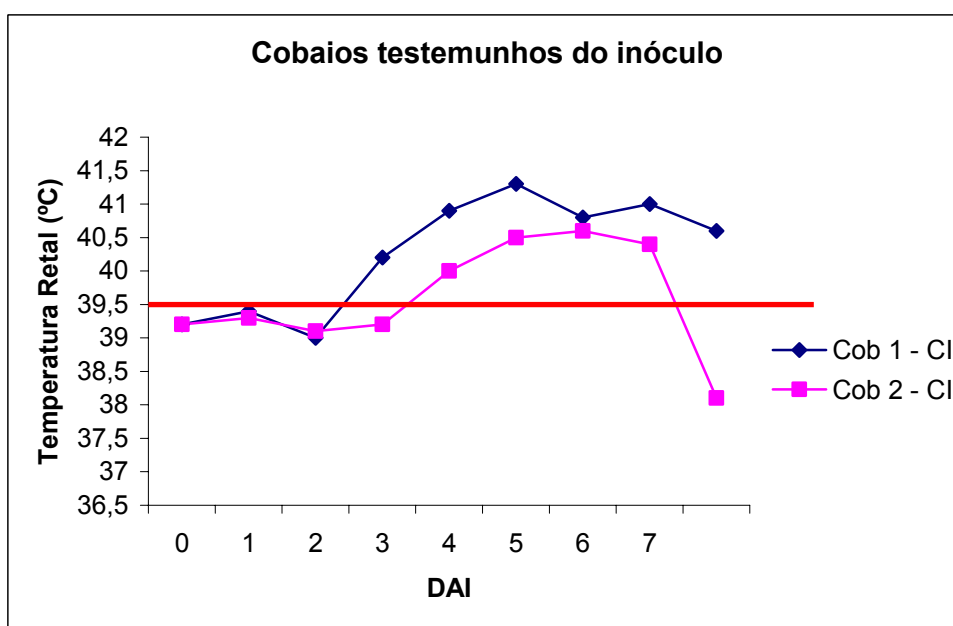
Médias aritméticas seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%.

*Número de carrapatos (Limites); Média ± desvio padrão. (USP, 2004).



(USP, 2004)

Figura 11. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC), do grupo parasitado por ninfas positivas infectadas quando larvas (G1) e do grupo infectado por inoculação peritoneal de *R. rickettsii* (G2), de acordo com o dia após a infecção/infestação (DAI).

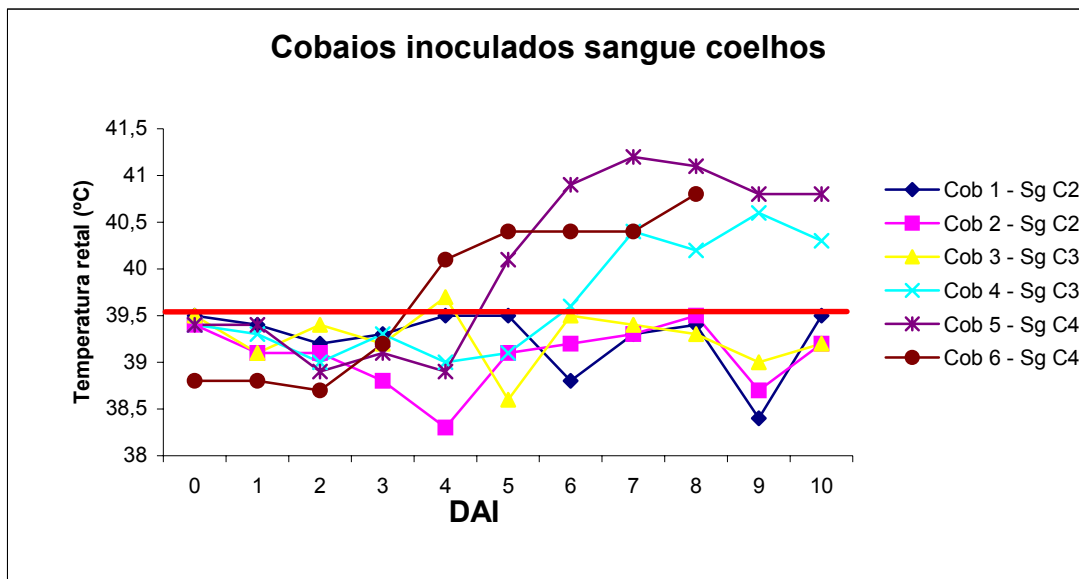


(USP, 2004)

Figura 12. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com controles do inóculo de *R. rickettsii* utilizados nos coelhos do G2, de acordo com o dia após a infecção (DAI).

As curvas de temperatura dos cobaios inoculados com sangue de coelho para esta fase podem ser observadas nas Figuras 13 e 16. Uma vez que os coelhos podem desenvolver infecção silenciosa, alíquotas de sangue dos coelhos parasitados por carrapatos positivos foram inoculadas em cobaios suscetíveis, que desempenham papel de sinalizadores, uma vez

que são mais sensíveis a infecção, e também como amplificadores, uma vez que ocorre intensa multiplicação da bactéria em todos os tecidos do animal, principalmente no baço e fígado.



(USP, 2004)

Figura 13. Curvas de temperatura retal de cobaias inoculadas com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2) e inoculadas com sangue de coelhos do G1 (Cob. 3 a 6), de acordo com o dia após a infecção (DAI).

No que concerne ao desenvolvimento da fase adulta (Tabela 7), as diferenças encontradas foram mais evidentes no grupo que adquiriu a infecção na fase de ninfa (G2) sendo que o grupo exposto aos coelhos infectados (G3) aparentemente pouco foi influenciado, ao contrário do que vinha ocorrendo nas etapas anteriores. Isto pode ser reforçado pela observação da equivalência entre os Índices de Eficiência Reprodutiva (IER) (Tabela 7).

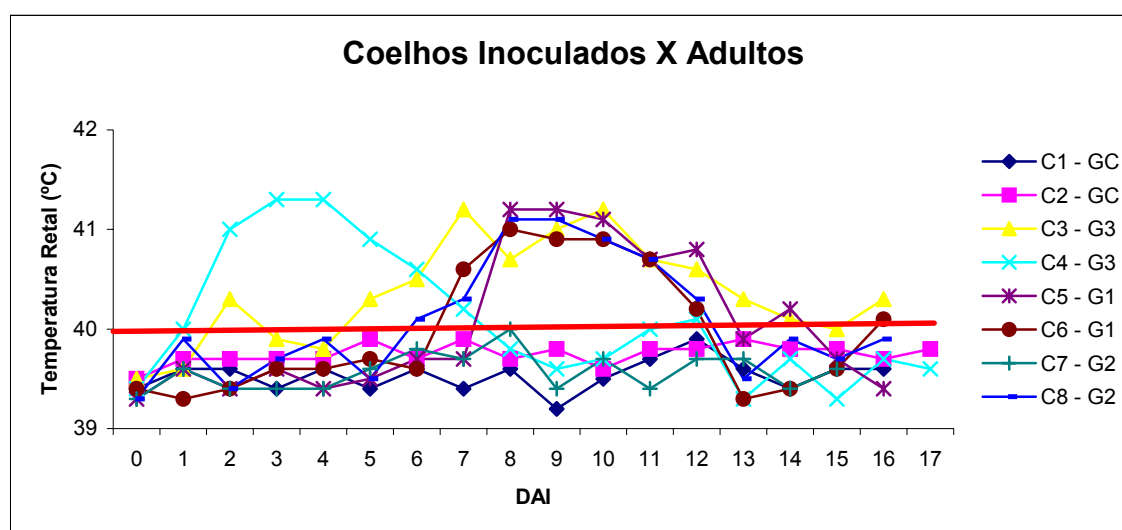
Tabela 7. Dados sobre o desempenho biológico de fêmeas de *H. leporispalustris* infectadas com *R. rickettsii* durante a alimentação em coelhos artificialmente inoculados (G3), em contraste com o grupo controle, o grupo infectado na fase larval (G1) e o grupo infectado na fase de ninfa (G2).

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	G1	G2	G3
Período parasitário fêmeas (dias)	* 22 (13 – 20) 15,15A ± 1,48	21 (13 – 18) 15,15A ± 1,50	25 (13 – 19) 15,18A ± 1,69	21 (13 – 19) 15,07A ± 1,52
Recuperação (%)	40 55,00B ± 0,00	40 53,00B ± 11,00	40 63,00A ± 9,00	40 53,00B ± 4,00
Peso fêmeas ingurgitadas (mg)	22 (69,1 – 415,3) 241,29A ± 94,09	21 (33,8 – 350,0) 197,79 A ± 106,13	25 (18,5 – 259,4) 142,91B ± 69,55	21 (20,0 – 347,4) 214,53A ± 113,27
Período pré-postura (dias)	19 (3 – 9) 5,21A ± 1,32	20 (3 – 7) 4,95A ± 1,10	18 (3 – 9) 5,72A ± 1,34	17 (4 – 13) 5,47A ± 2,50

Tabela 7. Continuação.

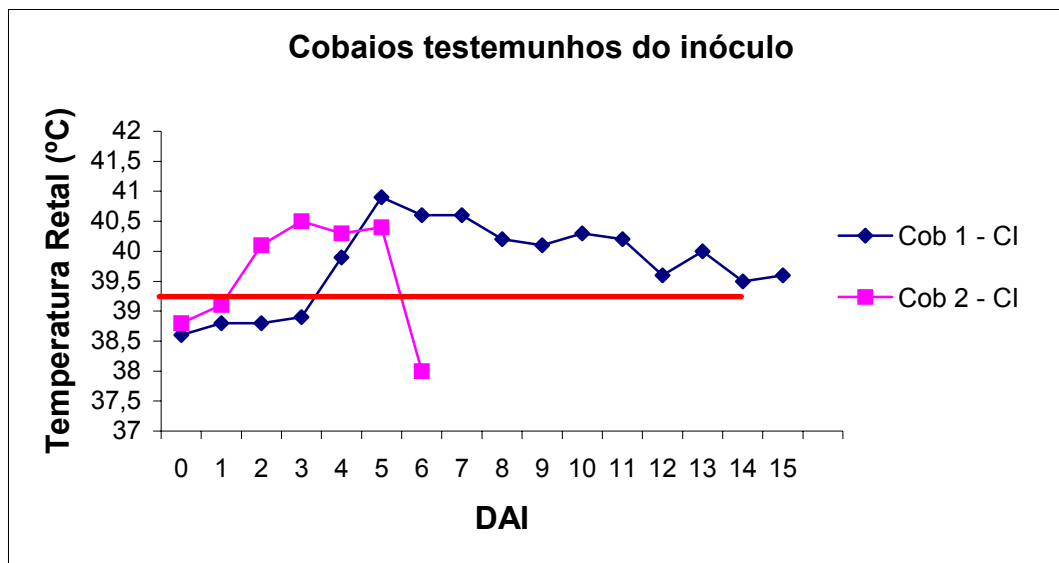
Período postura (dias)	19 (8 – 21) 16,42A ± 3,82	20 (7 – 19) 13,25B ± 3,65	18 (3 – 18) 13,06B ± 4,75	17 (1 – 17) 12,71B ± 4,15
Peso postura (mg)	19 (13,0 – 224,3) 113,16A ± 61,64	20 (5,3 – 209,7) 97,46A ± 67,88	18 (4,2 – 153,8) 67,91B ± 45,04	17 (4,3 – 199,5) 124,58A ± 62,22
IER (%)	19 (14,5 – 67,7) 44,41A ± 14,88	20 (13,9 – 62,3) 45,48A ± 16,34	18 (12,6 – 60,4) 40,00A ± 15,87	17 (7,5 – 63,7) 46,22A ± 16,64
OPG (50 ovos) (mg)	10 (3,0 – 3,3) 3,21A ± 0,09	10 (2,9 – 3,7) 3,32A ± 0,29	10 (2,8 – 3,5) 3,18A ± 0,25	10 (2,9 – 3,7) 3,31A ± 0,27
Período incubação (dias)	19 (30 – 34) 32,21A ± 1,23	19 (30 – 34) 32,68A ± 1,38	15 (29 – 35) 32,60A ± 1,45	15 (25 – 34) 31,50A ± 2,23
Eclusão (%)	19 (10 – 98) 85,90A ± 24,14	20 (0 – 98) 75,50B ± 29,63	18 (0 – 95) 52,83B ± 41,02	17 (0 – 98) 78,94A ± 25,34

Médias aritméticas seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%.
*Número de carrapatos (Limites); Média ± desvio padrão. (USP, 2005).



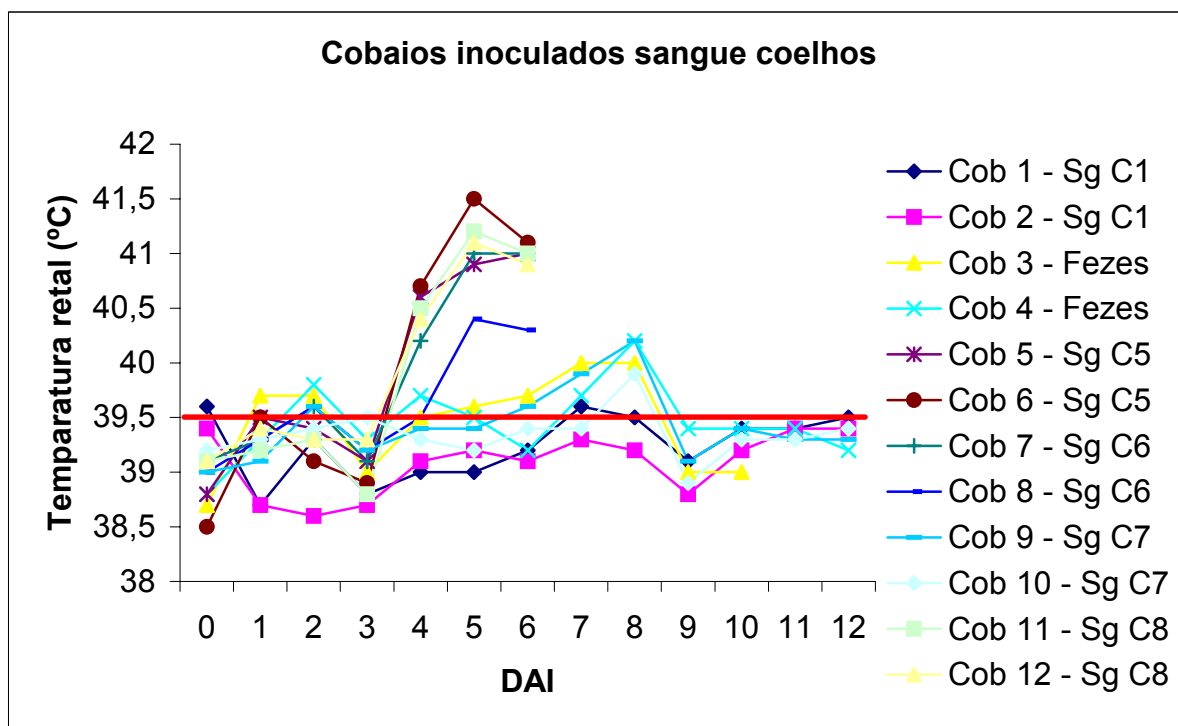
(USP, 2005)

Figura 14. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC), do grupo parasitado por adultos positivos infectados quando larvas (G1), do grupo parasitado por adultos positivos infectados quando ninfas (G2) e do grupo infectado por inoculação peritoneal de *R. rickettsii* (G3), de acordo com o dia após a infecção/infestação (DAI).



(USP, 2005)

Figura 15. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com controles do inóculo de *R. rickettsii* utilizados nos coelhos do G3, de acordo com o dia após a infecção (DAI).



(USP, 2005)

Figura 16. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2), inoculados com fezes de *H. leporispalustris* em suspensão de BHI (Cob. 3 e 4), e inoculados com sangue de coelhos do G1 (Cob.5 a 8) e G2 (Cob.9 a 12), de acordo com o dia após a infecção (DAI).

3.6.2 Efeito da Infecção de *R. rickettsii* Sobre a Biologia de *H. leporispalustris* Transmitida Por Meio de Carrapatos Infectados

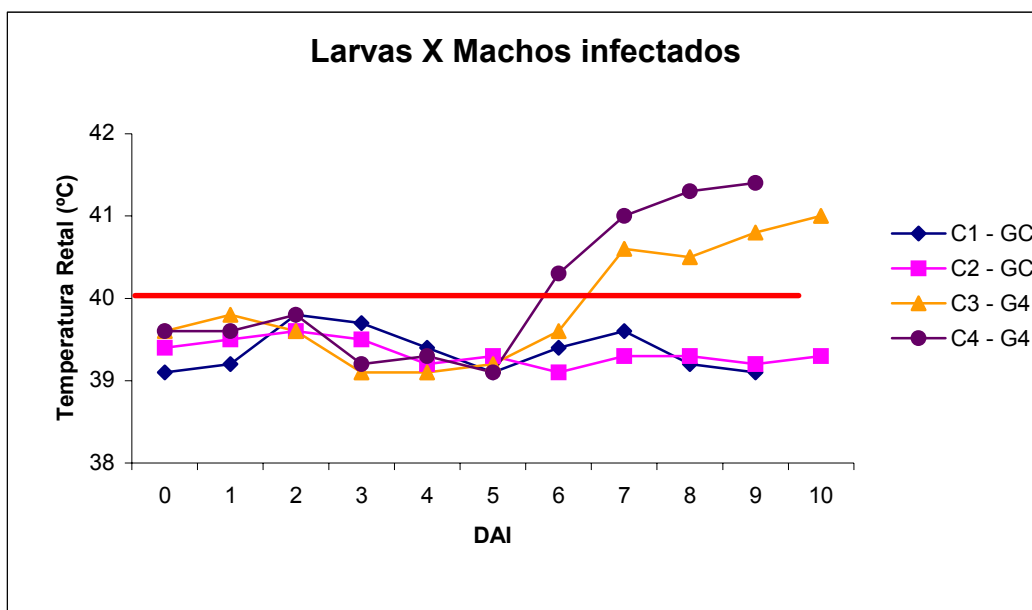
Todos os machos vivos provenientes da etapa anterior (Tabela 7) foram recolhidos e utilizados na formação de grupos de machos infectados e machos livres de *R. rickettsii*, que foram reutilizados na infestação de novos coelhos saudáveis juntamente com larvas recém eclodidas dos estoques controle, dando origem assim ao quarto grupo experimental (Tabelas 8 e 9, G4). O peso das larvas ingurgitadas e o percentual de ecdise foi superior no grupo infectado e a mortalidade de ninfas ingurgitadas foi menor no grupo infectado (Tabela 8, G4) que no grupo controle, espelhando um melhor desempenho dos indivíduos infectados sob a forma de ocorrência mais aproximada à situação natural. Corroborando com esta afirmativa, na Tabela 9 pode-se observar que embora as fêmeas do grupo infectado tenham atingido um menor peso e levado tempo ligeiramente superior para a repleção, o IER foi superior, revelando uma melhor eficiência na transformação do repasto sanguíneo em ovos.

Tabela 8. Desempenho biológico dos estágios imaturos de *H. leporispalustris* infectados com *R. rickettsii* na presente geração, por meio de co-alimentação de larvas não infectadas e machos infectados em coelhos saudáveis.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	G4
Período parasitário larvas (dias)	* 4235 (5 – 10) 6,97A ± 1,06	4107 (5 – 10) 7,22A ± 1,09
Peso 25 larvas ingurgitadas (mg)	13 (7,2 – 8,2) 7,65B ± 0,34	13 (7,9 – 8,5) 8,27A ± 0,20
Recuperação larvas ingurgitadas (%)	8000 59,22A ± 2,33	8000 57,40A ± 2,08
Mortalidade larvas ingurgitadas (%)	4235 30,56A ± 4,94	4107 19,12B ± 5,86
Ecdise (%)	4235 69,44B ± 4,94	4107 80,88A ± 5,86
Período parasitário ninfas (dias)	874 (6 – 10) 8,09A ± 1,12	847 (6 – 10) 8,00A ± 1,23
Peso 25 ninfas ingurgitadas (mg)	15 (28,5 – 41,8) 35,85A ± 4,52	19 (31,3 – 42,0) 36,77A ± 2,96
Recuperação ninfas ingurgitadas (%)	2091 41,78A ± 8,86	2097 40,39A ± 3,36
Mortalidade ninfas ingurgitadas (%)	874 44,63A ± 7,31	847 25,60B ± 3,16
Ecdise (%)	477 79,89A ± 4,40	629 81,65A ± 3,26

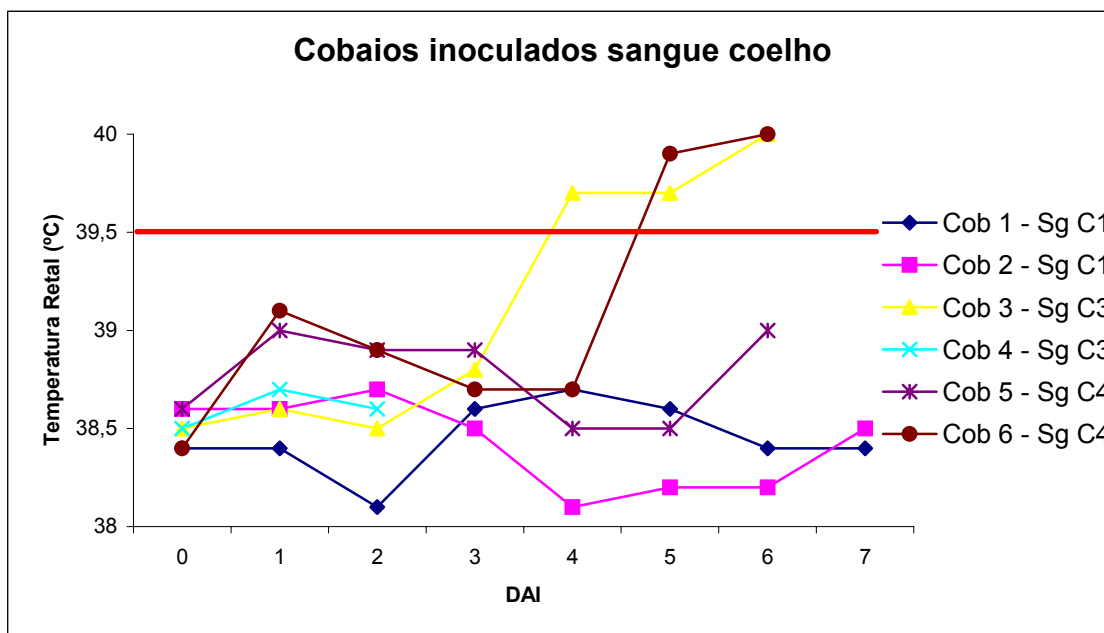
Médias aritméticas seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%. *Número de carrapatos (Limites); Média ± desvio padrão. (USP, 2005).

As curvas de temperatura retal dos coelhos alimentados com larvas negativas e machos positivos para *R. rickettsii* encontram-se na Figura 17. Os dois coelhos expostos aos carrapatos infectados apresentaram quadro febril que se iniciou no dia seis após a infestação, entretanto apenas um cobaio de cada dupla inoculada com o sangue destes coelhos adoeceu (Figura 18), provavelmente devido a baixa riquetsemia propiciada por este tipo de infecção, quando comparada a infecção estabelecida por agulha.



(USP, 2005)

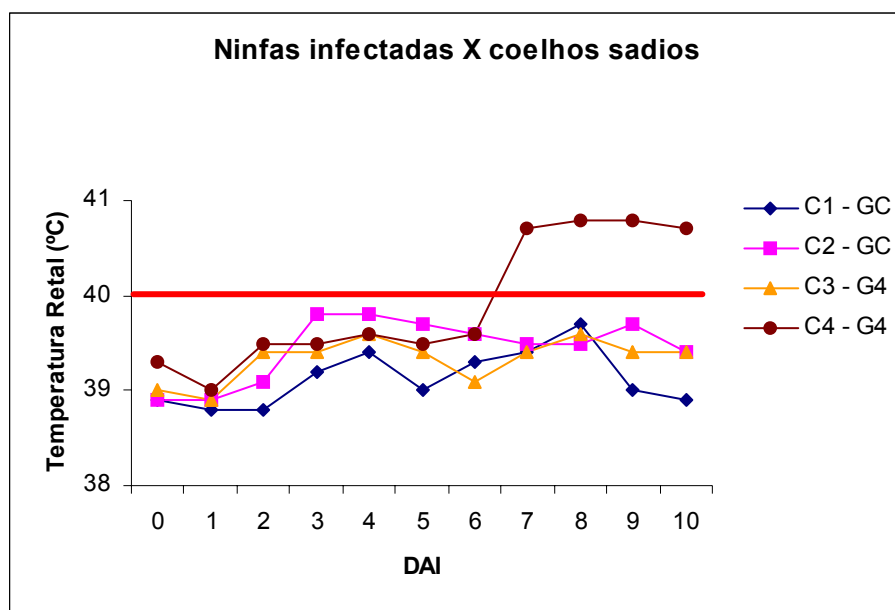
Figura 17. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC) e do grupo parasitado por machos positivos para *R. rickettsii* em co-parasitismo com larvas livres da infecção (G4), de acordo com o dia após a infestação (DAI).



(USP, 2005)

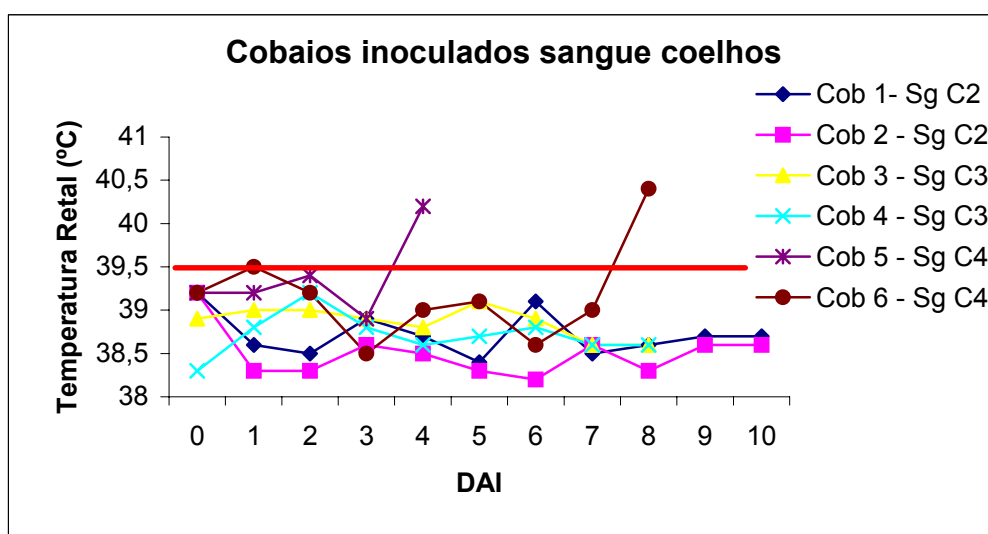
Figura 18. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2) e inoculados com sangue de coelhos do G4 (Cob.3 a 6), na fase parasitária de larvas, de acordo com o dia após a infecção (DAI).

Já para a fase de ninfas infectadas geradas anteriormente, somente um coelho apresentou quadro febril (Figura 19, C4) e os cobaios inoculados com o sangue deste animal também adoeceram (Figura 20, cobaios 5 e 6), entretanto, amostras de ninfas ingurgitadas e de sangue do coelho 3 (Figura 19) foram positivadas para *R. rickettsii* pela PCR, sendo que nestes animais níveis muito baixos de riquetsias circulantes não possibilitaram o desenvolvimento da sintomatologia característica. Neste grupo experimental a reação escrotal em coelhos foi praticamente nula, sendo observada apenas levemente durante o co-parasitismo de larvas negativas com machos positivos.



(USP, 2005)

Figura 19. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC) e do G4, na fase parasitária de ninfas, de acordo com o dia após a infestação (DAI).



(USP, 2005)

Figura 20. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2) e inoculados com sangue de coelhos do G4 (Cob.3 a 6), na fase parasitária de ninfas, de acordo com o dia após a infestação (DAI).

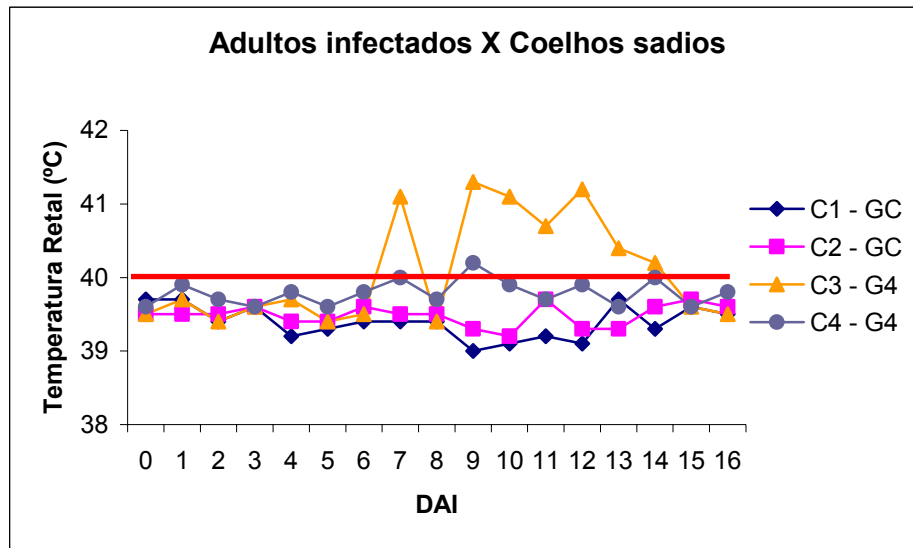
parasitária de ninfas, de acordo com o dia após a infecção (DAI).

Tabela 9. Desempenho biológico de fêmeas de *H. leporispalustris* infectadas com *R. rickettsii* na presente geração, por meio de co-alimentação de larvas não infectadas e machos infectados em coelhos saudáveis.

Parâmetros	Grupos Experimentais	
	Controle	G4
Período parasitário fêmeas (dias)	* 38 (13 – 17) 14,68B ± 1,21	39 (14 – 18) 15,62A ± 1,25
Recuperação fêmea ingurgitada (%)	40 95,0A ± 0,00	40 98,0A ± 3,54
Peso fêmea ingurgitada (mg)	38 (55,4 – 318,0) 204,04A ± 64,37	39 (23,6 – 306,9) 168,62B ± 82,87
Período pré-postura fêmea (dias)	34 (4 – 8) 5,41A ± 0,96	28 (4 – 10) 5,32A ± 1,34
Período postura fêmea (dias)	34 (8 – 17) 13,59A ± 1,99	28 (9 – 17) 14,07A ± 1,65
Peso postura (mg)	34 (18,9 – 168,7) 92,12A ± 33,71	28 (20,5 – 180,1) 105,04A ± 51,46
IER (%)	34 (23,9 – 74,1) 45,98B ± 10,40	28 (22,1 – 66,5) 51,37A ± 11,99
OPG (50 ovos) (mg)	10 (3,2 – 3,6) 3,29A ± 0,13	10 (2,9 – 3,7) 3,36A ± 0,27
Período incubação ovos (dias)	33 (36 – 39) 37,44B ± 1,08	28 (37 – 41) 38,96A ± 1,14
Eclosão (%)	34 (0 – 98) 83,43A ± 18,53	28 (1 – 98) 76,07A ± 29,90

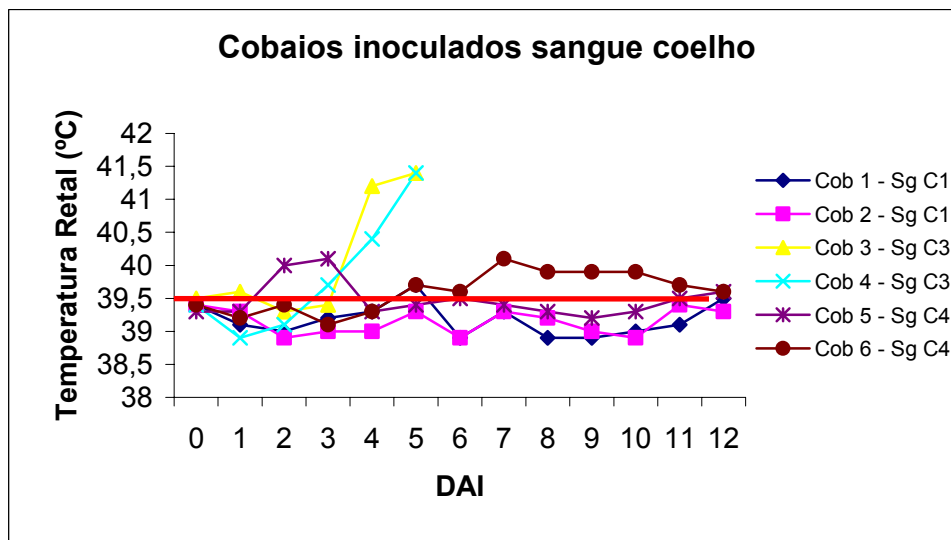
Médias aritméticas seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%. *Número de carrapatos (Limites); Média ± desvio padrão. (USP, 2005).

Durante a fase parasitária de adultos de *H. leporispalustris* do G4, conforme pode-se observar na Figura 21, o coelho 3 apresentou quadro febril atípico, com oscilação da temperatura entre o sétimo e o décimo segundo dias após a infestação e o coelho 4 apresentou elevação da temperatura muito discreta. Na Figura 22 observa-se, entretanto, que os cobaios inoculados com o sangue destes animais apresentaram quadro febril, que foi mais intenso nos animais inoculados com o sangue do coelho 3, mais brando nos cobaios 6 e precoce no coelho 5.



(USP, 2005)

Figura 21. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC) e do G4, na fase parasitária de adultos, de acordo com o dia após a infestação (DAI).



(USP, 2005)

Figura 22. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2) e inoculados com sangue de coelhos do G4 (Cob.3 a 6), na fase parasitária de adultos, de acordo com o dia após a infecção (DAI).

Estes dados nos sinalizam que em condições naturais, a infecção por *R. rickettsii* pode ocorrer em coelhos silvestres de forma inócua para estes animais, e que o desempenho biológico do carrapato não é prejudicado pela infecção, servindo tanto coelho como carrapato de mantenedores da bactéria no meio silvestre.

3.6.3 Parâmetros Biológicos da Progênie de *H. leporispalustris* (F₂) Infectados na Geração Anterior com *R. rickettsii* Transmitida Por Meio de Inoculações Maciças.

Os dados referentes ao desempenho biológico da progênie dos grupos experimentais G1, G2 e G3 anteriormente criados (Tabelas 5, 6 e 7, respectivamente) podem ser verificados nas Tabelas 10 e 11.

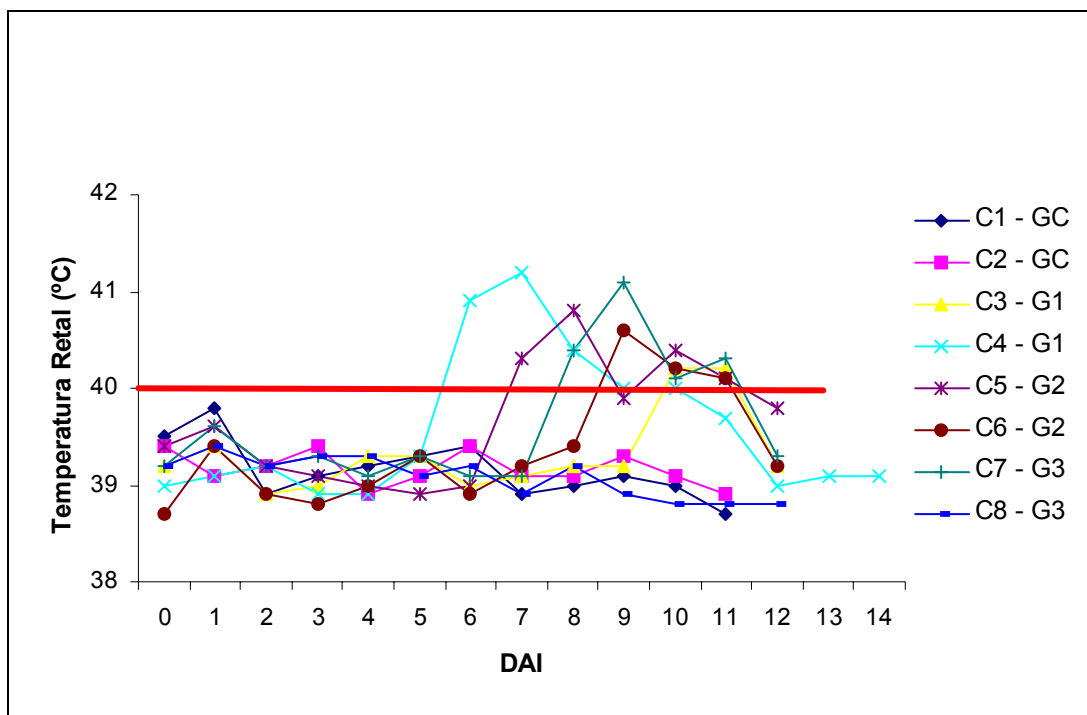
O desempenho dos estágios imaturos do grupo controle em relação aos grupos infectados pode ser observado na Tabela 6. O peso de larvas ingurgitadas foi inferior nos grupos infectados, semelhante ao que ocorreu na etapa inicial (Tabela 1), mas o oposto do que ocorreu com a situação de transmissão de carrapato a carrapato (Tabela 4). Embora o percentual de recuperação de larvas e de ninfas ingurgitadas tenha sido superior nos grupos infectados (Tabela 6) em relação ao grupo controle, a mortalidade das mesmas antes de efetuar a ecdise foi elevada, evidenciando um possível efeito deletério sobre o organismo do carrapato.

Tabela 10. Biologia das fases imaturas (F₂) de *H. leporispalustris* infectados por *R. rickettsii* na geração anterior, em diferentes momentos do ciclo de vida.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	G1	G2	G3
Período parasitário larvas (dias)	* 2699 (5 – 12) 7,46A ± 1,76	4742 (5 – 15) 7,26A ± 2,84	4066 (5 – 13) 7,35A ± 2,38	4078 (5 – 12) 7,62A ± 2,52
Peso 25 larvas ingurgitadas (mg)	20 (6,2 – 7,5) 6,60A ± 0,28	11 (5,0 – 7,0) 6,04B ± 0,67	20 (4,7 – 7,0) 6,07B ± 0,54	20 (1,9 – 6,7) 4,11C ± 1,70
Recuperação (%)	5417 49,86D ± 6,28	5609 84,46A ± 10,45	5753 70,77C ± 9,34	5482 74,60B ± 16,27
Mortalidade larvas ingurgitadas (%)	2699 29,89D ± 2,70	4742 74,08A ± 33,68	4066 58,19B ± 0,43	4078 44,06C ± 5,79
Período ecdise (dias)	16 (10 – 13) 11,38B ± 0,96	16 (10 – 13) 11,62B ± 0,81	16 (12 – 14) 13,06A ± 0,68	16 (10 – 17) 13,50A ± 1,71
Ecdise (%)	1888 58,63C ± 5,63	1340 60,06B ± 6,36	1699 63,52A ± 6,56	2304 53,02D ± 3,10
Período parasitário ninfas (dias)	621 (6 – 10) 7,38A ± 1,13	518 (6 – 11) 7,29A ± 1,24	632 (6 – 11) 7,57A ± 1,25	749 (6 – 11) 7,25A ± 1,23
Peso 25 ninfas ingurgitadas (mg)	12 (28,0 – 42,0) 33,72B ± 4,38	9 (33,5 – 39,6) 36,57A ± 1,69	10 (31,0 – 40,6) 36,56A ± 2,92	11 (31,6 – 41,3) 36,19A ± 3,14
Recuperação (%)	871 71,20C ± 13,41	704 74,30B ± 13,79	795 79,74A ± 9,45	942 78,77A ± 25,98
Mortalidade ninfas ingurgitada (%)	621 27,71C ± 12,60	518 40,08B ± 30,02	632 39,99B ± 1,12	749 47,31A ± 0,95
Período ecdise (dias)	12 (9 – 12) 10,50A ± 1,00	12 (10 – 13) 11,42A ± 0,90	12 (10 – 13) 11,00A ± 0,80	12 (10 – 13) 11,50A ± 1,00
Ecdise (%)	441 73,54A ± 11,03	304 69,20B ± 12,87	379 72,80A ± 11,77	396 68,39B ± 9,07

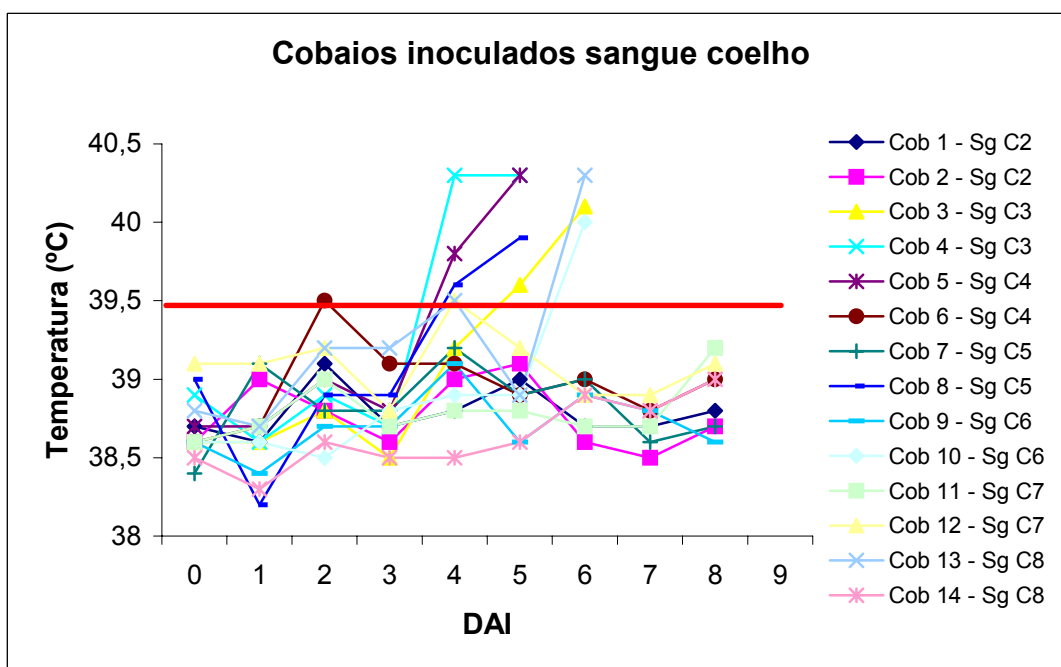
Médias aritméticas seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%. *Número de carrapatos (Limites); Média ± desvio padrão. (USP, 2005).

Em relação à temperatura retal dos coelhos durante a fase de larvas (Figura 23), apenas o coelho 8 não apresentou alteração da temperatura, porém o cobaio 13, inoculado com o sangue deste animal (Figura 24) apresentou febre e teve seu baço positivado para *R. rickettsii* pela PCR.



(USP, 2005)

Figura 23. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC), G1, G2 e G3, na fase parasitária de larvas, de acordo com o dia após a infestação (DAI).

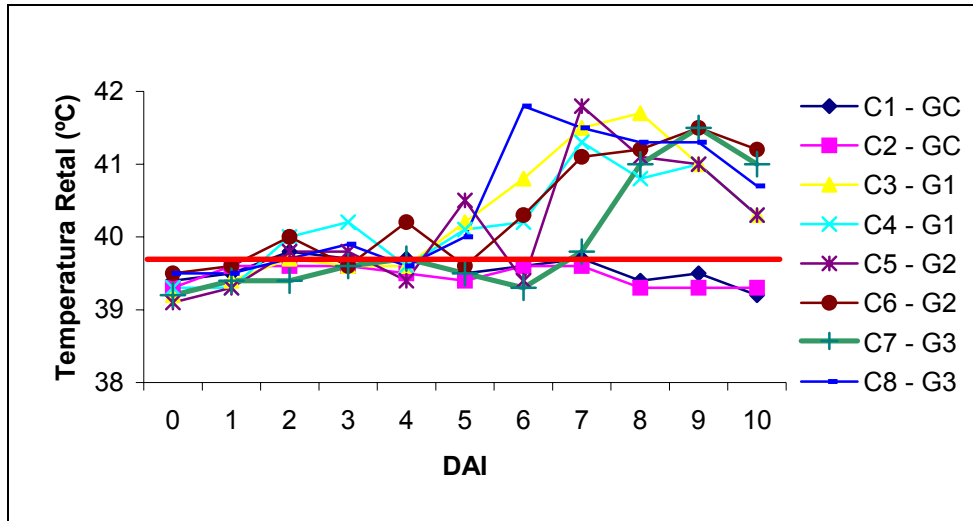


(USP, 2005)

Figura 24. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2), G1 (Cob.3 a 6), G2 (Cob. 7 a 10) e G3 (Cob. 11 a 14), na fase parasitária de larvas, de acordo com o dia após a infecção (DAI).

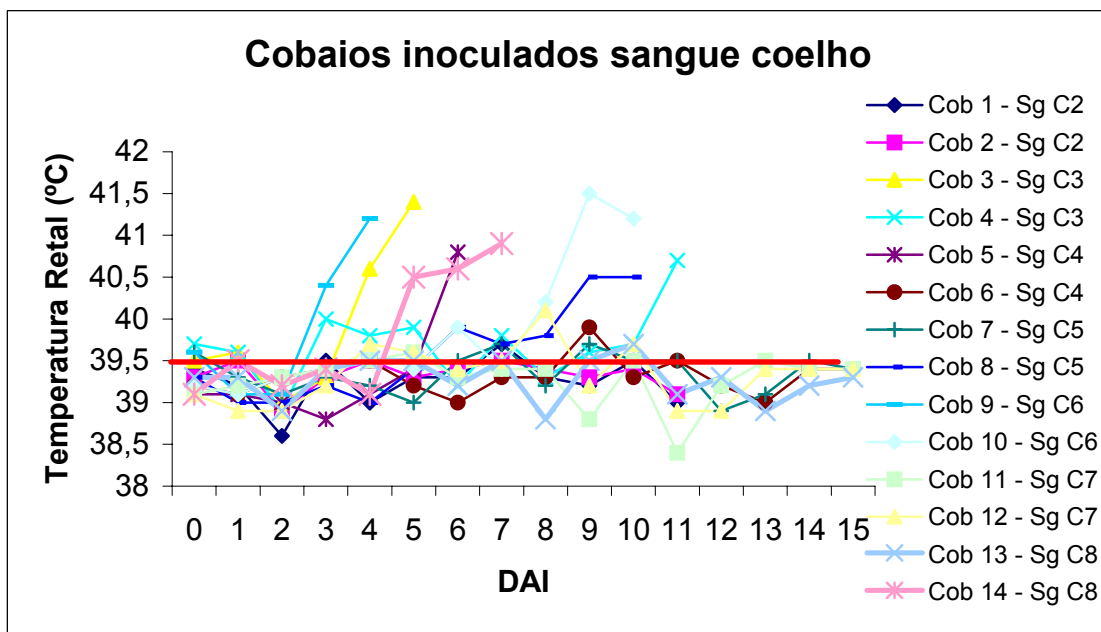
As curvas de temperatura dos coelhos utilizados para a alimentação de ninfas podem ser verificadas na Figura 25. Observamos que todos os animais infestados com ninfas

positivas para *R. rickettsii* desenvolveram pico febril elevado, chegando a maioria dos animais perto dos 42 °C. No entanto, nem todos os cobaios inoculados com o sangue destes animais adoeceram (Figura 26), talvez devido ao fato do coelho 7 ter atingido o pico febril mais tardiamente que os outros animais, no nono dia, e a inoculação dos cobaios 11 e 12 ter ocorrido anteriormente, no sétimo dia, não tendo nesta data, riquetsias circulantes em número relevante.



(USP, 2005)

Figura 25. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC), G1, G2 e G3, na fase parasitária de ninfas, de acordo com o dia após a infestação (DAI).



(USP, 2005)

Figura 26. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2), G1 (Cob.3 a 6), G2 (Cob. 7 a 10) e G3 (Cob. 11 a 14), na fase parasitária de ninfas, de acordo com o dia após a infecção (DAI).

Em relação aos parâmetros da fase adulta (Tabela 11), o grupo G3 se destacou pelos elevados valores de peso atingido pelas fêmeas repletas e pela excelente recuperação das mesmas. Em relação à eficiência reprodutiva (IER) todos os grupos infectados obtiveram valores superiores ao grupo controle.

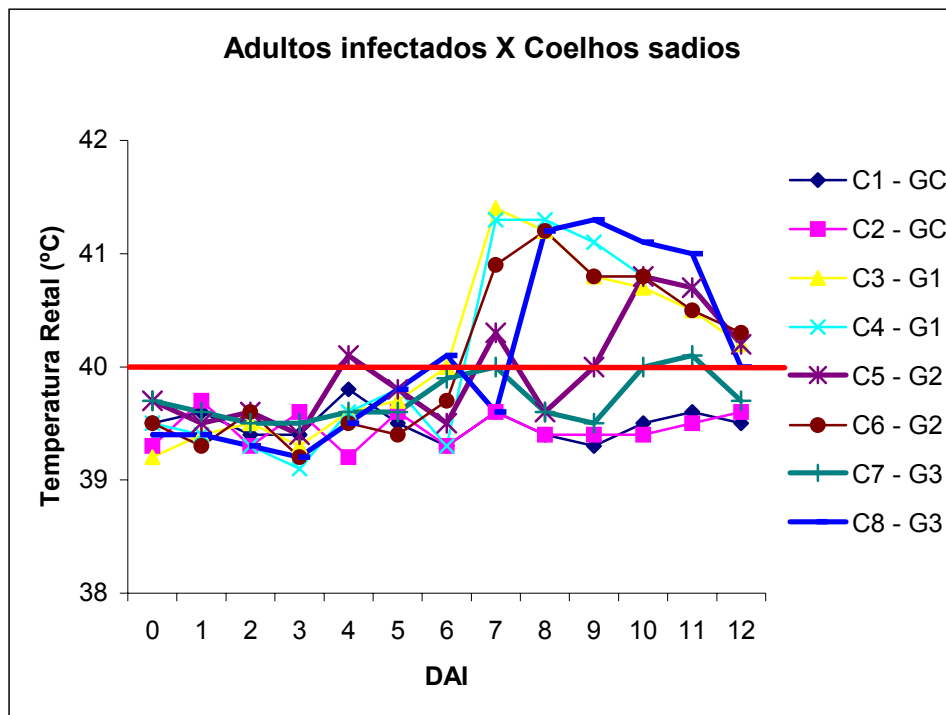
Tabela 11. Desempenho biológico de fêmeas (F₂) de *H. leporispalustris* infectados por *R. rickettsii* na geração anterior, em diferentes momentos do ciclo de vida.

Parâmetros	Grupos Experimentais			
	Controle	G1	G2	G3
Período parasitário fêmeas (dias)	* 34 (15 – 21) 17,31A ± 1,89	39 (14 – 19) 15,80C ± 1,34	38 (14 – 21) 16,48B ± 1,68	40 (13 – 21) 16,58B ± 1,52
Recuperação (%)	40 85,0B ± 7,07	40 97,5A ± 3,54	40 95,0A ± 7,07	40 100,0A ± 0,00
Peso fêmea ingurgitada (mg)	34 (78,7 – 307,3) 170,90B ± 55,23	39 (8,6 – 292,5) 166,87B ± 67,14	38 (5,7 – 337,0) 148,83B ± 80,64	40 (33,5 – 359,6) 213,45A ± 75,34
Período pré-postura (dias)	30 (4 – 9) 5,87A ± 1,14	28 (3 – 18) 6,25A ± 2,77	29 (4 – 10) 5,66A ± 1,70	36 (2 – 9) 5,25A ± 1,34
Período postura (dias)	30 (13 – 31) 21,47A ± 4,94	28 (11 – 29) 21,00A ± 4,36	29 (3 – 29) 21,03A ± 5,61	36 (10 – 30) 22,39A ± 4,61
Peso postura (mg)	30 (15,3 – 143,2) 51,81C ± 26,00	28 (16,5 – 164,8) 78,67B ± 34,30	29 (0,9 – 208,0) 84,04B ± 54,51	36 (12,8 – 217,7) 104,56A ± 46,13
IER (%)	30 (6,3 – 56,2) 30,92B ± 12,39	28 (8,8 – 65,9) 43,05A ± 15,29	29 (0,5 – 62,6) 44,96A ± 16,60	36 (6,4 – 62,5) 43,62A ± 12,25
OPG (50 ovos) (mg)	20 (3,2 – 3,8) 3,48A ± 0,21	20 (3,0 – 3,8) 3,51A ± 0,21	20 (3,1 – 3,7) 3,43A ± 0,20	20 (3,1 – 3,9) 3,56A ± 0,20
Período incubação (dias)	30 (32 – 37) 35,30B ± 1,42	26 (32 – 37) 34,46C ± 1,10	27 (33 – 37) 35,26B ± 1,06	35 (33 – 40) 37,37A ± 1,44
Eclosão (%)	30 (10 – 98) 70,27A ± 23,22	28 (0 – 98) 75,25A ± 31,92	29 (0 – 98) 66,03A ± 33,25	36 (0 – 98) 61,47A ± 33,39

Médias aritméticas seguidas de letras maiúsculas distintas na mesma linha diferem estatisticamente entre si ao nível de 5%.

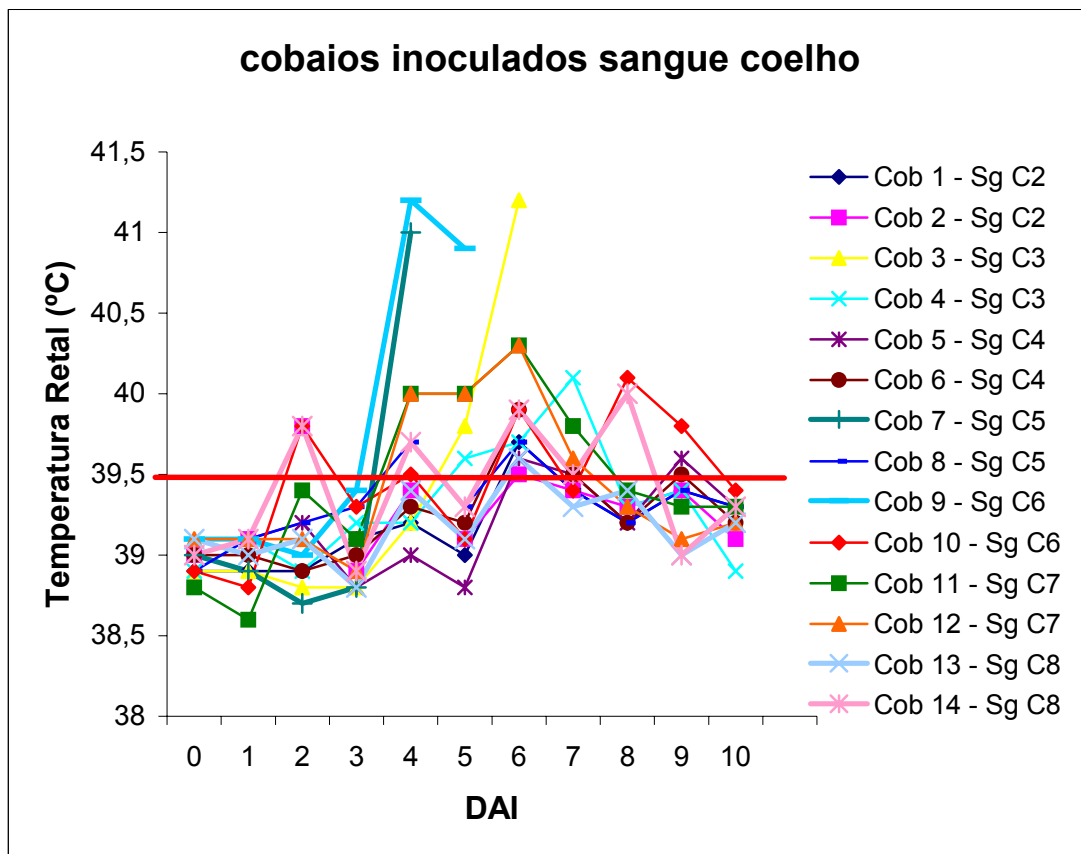
*Número de carrapatos (Limites); Média ± desvio padrão. (USP, 2005).

As curvas de temperatura retal dos coelhos e cobaios podem ser observadas nas Figuras 27 e 28. Embora o coelho 7 (C7, Figura 27) não tenha apresentado reação febril relevante, os cobaios 11 e 12 fizeram quadro febril após inoculados com o sangue deste animal, evidenciando a infecção.



(USP, 2005)

Figura 27. Curvas de temperatura retal de coelhos do grupo controle (GC), G1, G2 e G3, na fase parasitária de adultos, de acordo com o dia após a infestação (DAI).



(USP, 2005)

Figura 28. Curvas de temperatura retal de cobaios inoculados com sangue de coelho do grupo controle (GC) (Cob. 1 e 2), G1 (Cob.3 a 6), G2 (Cob. 7 a 10) e G3 (Cob. 11 a 14), na fase parasitária de adultos, de acordo com o dia após a infecção (DAI).

A Razão Sexual (RS) dos adultos de *H. leporispalustris* nos diferentes grupos experimentais pode ser observada na Tabela 12. Os grupos GC, G1, G2 e G3 tiveram sua RS avaliada na geração subsequente às inoculações dos coelhos com cultivo de *R. rickettsii* (F₂).

Tabela 12. Razão sexual de *H. leporispalustris* de acordo com o grupo experimental de carrapatos infectados por *R. rickettsii*.

Grupo Experimental	Machos (n)	Machos (%)	Fêmeas (n)	Fêmeas (%)	Adultos (n)	Razão Sexual (RS)*	Relação M:F
GC	130	40,41	195	59,59	325	0,60	1:1,50*
G1	99	48,34	103	51,66	202	0,52	1:1,04
G2	114	40,98	163	59,02	277	0,59	1:1,43*
G3	128	44,97	150	55,03	278	0,55	1:1,17
GC do G4	181	48,03	191	51,97	372	0,52	1:1,06
G4	232	44,95	282	55,05	514	0,55	1:1,22

GC = grupo controle; G1, G2, G3 e G4 = infectados na fase larval, ninfal, adultos e na fase de larvas por meio de co-parasitismo com machos infectados. RS = n° de fêmeas/ n° de adultos. *RS variou significativamente pelo teste de χ^2 a 5%, da proporção de 50% esperada pela segregação genética. (USP, 2005).

Em relação à reação escrotal nos coelhos, esta variou de necrose intensa da pele (principalmente na etapa inicial de inoculações) a ausente (principalmente na fase de transmissão por carrapatos infectados). Não ocorreu óbito de nenhum coelho devido à infecção por *R. rickettsii* e após o pico febril, todos os animais se recuperaram, inclusive das lesões de pele.

3.6.4 Resultados PCR

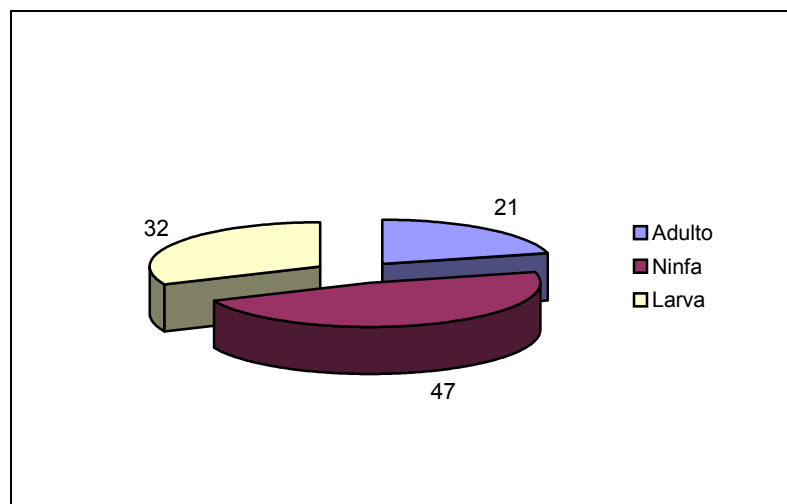
A confirmação da infecção por *R. rickettsii* foi feita pela PCR para amostras de sangue dos coelhos parasitados, baço dos cobaios inoculados com o sangue de coelhos e todas as etapas do ciclo de vida dos carrapatos (Tabela 8). Os estágios de larvas em jejum e ingurgitadas, ninfas em jejum e ingurgitadas, adultos em jejum e machos após a alimentação foram testados. As amostras de baço dos cobaios foi o material que mais positivou a PCR (33%) seguindo-se pelas amostras de ninfas (28%) (Tabela 8). A reação de seqüenciamento foi feita com 21 amostras positivas pela PCR, sendo cinco (5) amostras de sangue, cinco (5) de baço e onze (11) de carrapato (estas últimas da etapa final do experimento), obtendo 99,9% de identidade com *R. rickettsii* (GenBank número de acesso DQ150692). Nenhuma amostra proveniente do grupo controle foi positivada pela PCR.

Tabela 13. Resultados da PCR de 1.055 amostras testadas para *R. rickettsii* com *primers* do gene Citrato Sintase (*gltA*).

Grupo Fonte	n (+)	Positivos (%)	Baço + (%)	Sangue + (%)	G1 + (%)	G2 + (%)	G3 + (%)	G4 + (%)
Baço	63 (21)	33,33	-----	-----	7 (35)	8 (40)	1 (5)	5 (25)
Sangue	116 (19)	16,38	-----	-----	7 (37)	4 (21)	4 (21)	4 (21)
Carrapato	876 (174)	19,86	-----	-----	65 (37)	51 (29)	24 (14)	34 (20)
Adulto	307 (59)	19,22	13 (62)	4 (21)	16 (27)	23 (39)	7 (12)	13 (22)
Ninfa	140 (39)	27,86	5 (24)	9 (47)	10 (26)	16 (41)	7 (18)	6 (15)
Larva	429 (76)	17,72	3 (14)	6 (32)	34 (45)	17 (22)	10 (13)	15 (20)

n= total de amostras; + = amostras positivas; % = percentual de positivos em relação ao n. (USP, 2005).

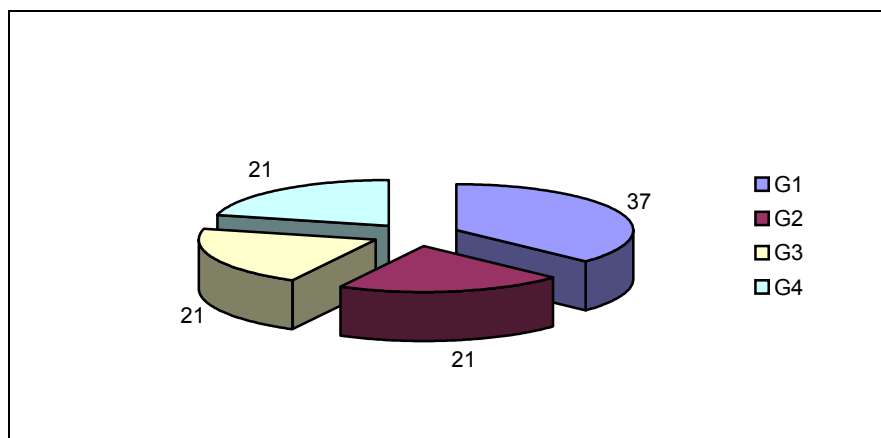
Levando-se em consideração somente as amostras positivas pela PCR, pode-se observar que um maior número de amostras positivas provenientes de sangue de coelho ocorreu durante o parasitismo de ninfas (Figura 29), com 47% de positivos em relação às larvas e adultos, sugerindo que as ninfas são capazes de maiores taxas de inoculação e, conseqüentemente maior oferta de riquetsias no sangue dos coelhos.



(USP, 2005)

Figura 29. Amostras de sangue de coelho positivas pela PCR para *R. rickettsii*, de acordo com o estágio do carrapato em parasitismo (%).

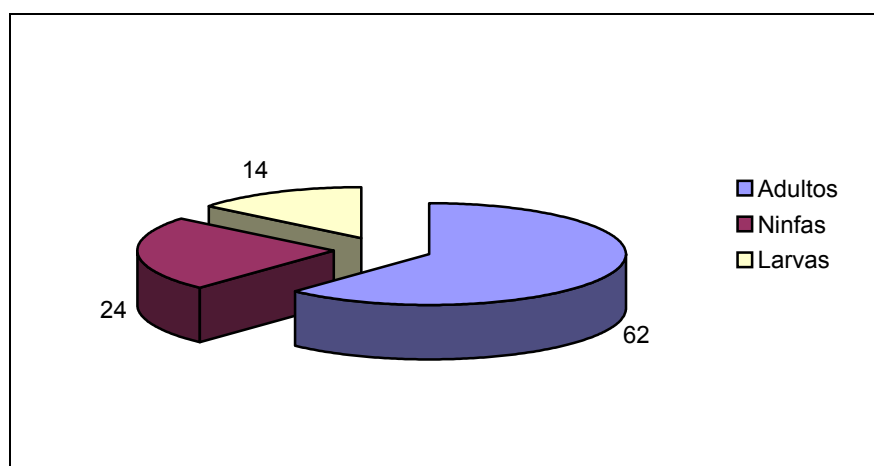
Já de acordo com o grupo experimental, o grupo infectado na fase de larva (G1), foi o que produziu maior número de amostras de sangue de coelho positivas (37%) (Figura 30), sugerindo que a inoculação maciça por meio de infecção por agulha na fase de larva, produziu carrapatos com concentração de *R. rickettsii* superior aos demais grupos, levando a um conseqüente aumento na taxa de inoculação da bactéria pelos carrapatos deste grupo nos coelhos.



(USP, 2005)

Figura 30. Amostras de sangue de coelho positivas pela PCR para *R. rickettsii*, de acordo com o grupo experimental (%).

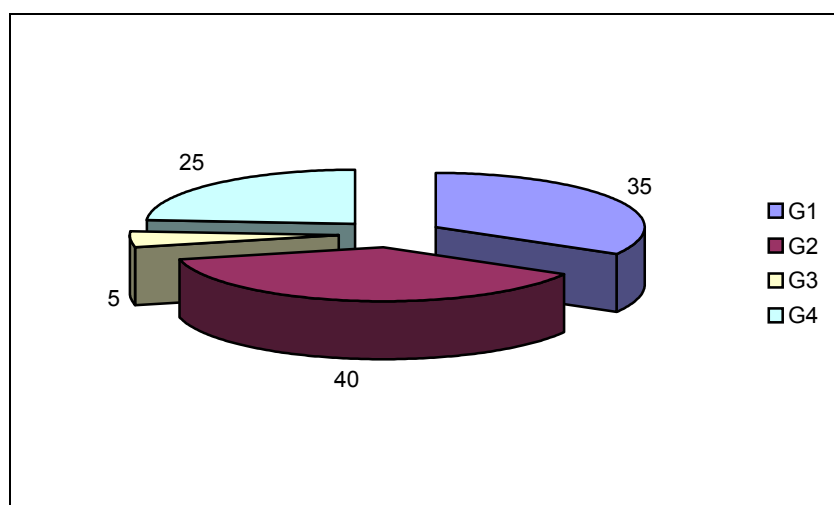
Em relação às amostras positivas de baço de cobaias de acordo com o estágio do carrapato em parasitismo nos coelhos, o maior número de amostras positivas para o estágio adulto (62%) (Figura 31) deveu-se provavelmente a um maior número de amostras de baço processadas para esta fase (28), em relação a fase de ninfas (11) e larvas (16). Mesmo com o menor número de amostras processadas, os cobaias inoculados com sangue de coelhos parasitados por ninfas tiveram grande proporção de positivos, se comparados com os cobaias inoculados com sangue de coelhos parasitados por larvas.



(USP, 2005)

Figura 31. Amostras de baço de cobaias positivas pela PCR para *R. rickettsii*, de acordo com o estágio do carrapato em parasitismo nos coelhos (%).

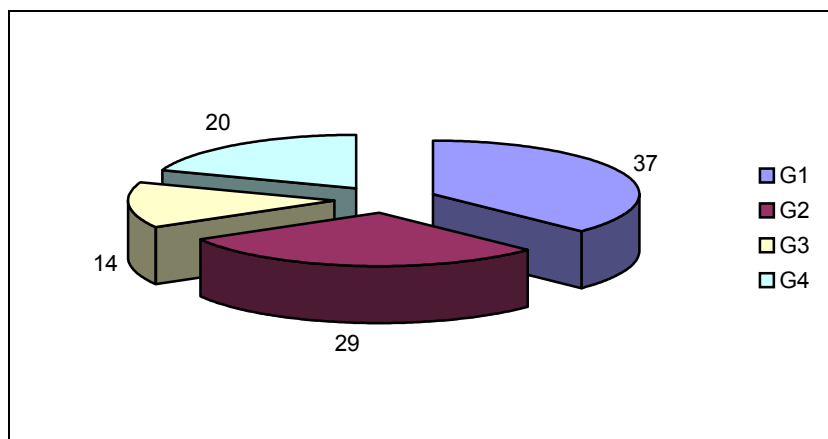
Na figura 32, observamos que em relação ao momento e ao método de infecção do carrapato, o grupo infectado durante a fase de ninfas (G2) foi o que proporcionou mais cobaias positivas, seguindo-se do grupo 1.



(USP, 2005)

Figura 32. Amostras de baço de cobaias positivas pela PCR para *R. rickettsii*, de acordo com o grupo experimental em parasitismo nos coelhos (%).

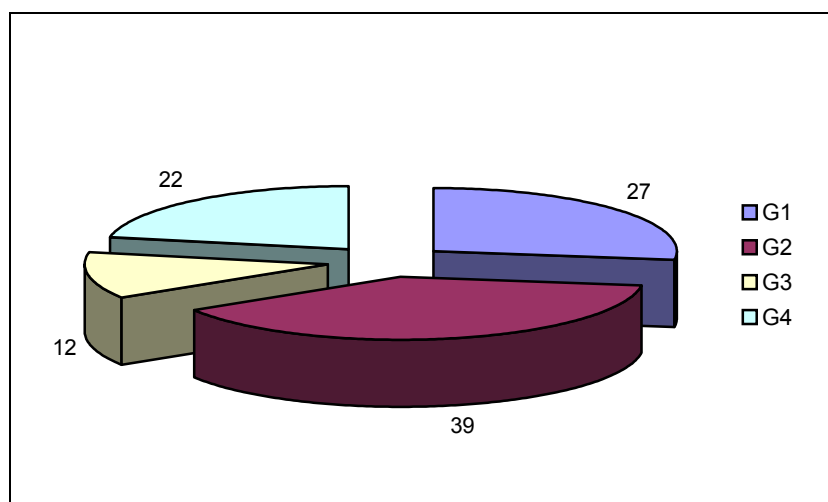
Em relação às amostras de carrapatos positivas (Figuras 33, 34, 35 e 36), O grupo experimental infectado na fase de larva (Figura 33, G1) foi o que apresentou maior proporção de positivos, seguido do grupo infectado na fase de ninfa (G2). O grupo infectado na fase de adulto (G3) foi o que menos foi positivado pela PCR.



(USP, 2005)

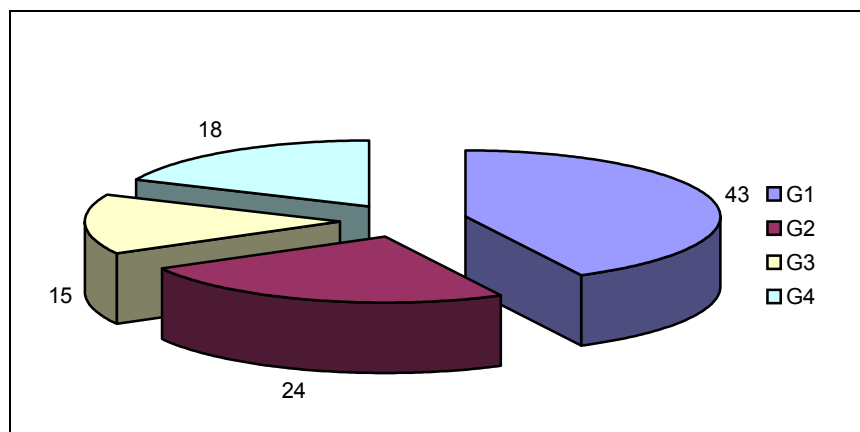
Figura 33. Amostras de carrapatos positivas pela PCR para *R. rickettsii*, de acordo com o grupo experimental (%).

Levando-se em consideração apenas os carrapatos na fase adulta (Figura 34), maior proporção foi obtida no grupo experimental gerado na fase de ninfas (G2), seguindo-se do grupo criado durante a fase de larvas (G1) esta proporção foi inversa, se levarmos em consideração apenas os estágios imaturos (Figura 35), com maior número de positivos do G1, seguido pelo G2.



(USP, 2005)

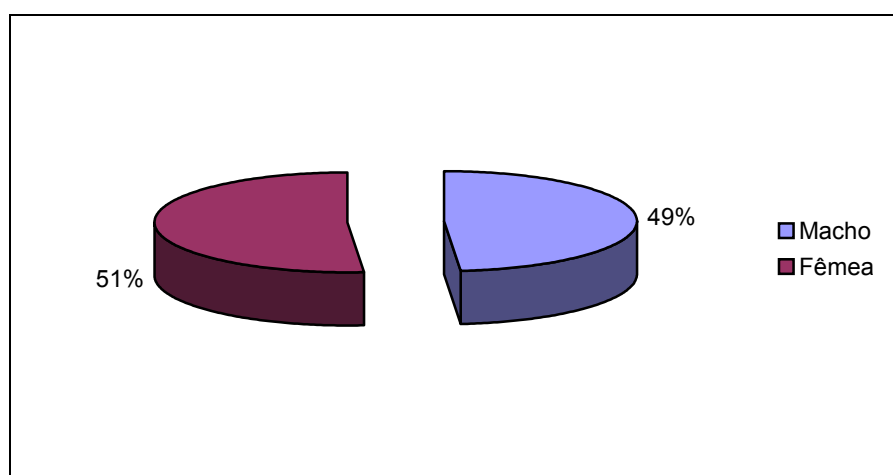
Figura 34. Amostras de carrapatos adultos positivas pela PCR para *R. rickettsii*, de acordo com o grupo experimental (%).



(USP, 2005)

Figura 35. Amostras de carrapatos imaturos positivas pela PCR para *R. rickettsii*, de acordo com o grupo experimental (%).

A mesma proporção de carrapatos positivos para *R. rickettsii* foi observada tanto em machos como em fêmeas de *H. leporispalustris* (Figura 36)



(USP, 2005)

Figura 36. Amostras de carrapatos positivas pela PCR para *R. rickettsii*, de acordo com o sexo da fase adulta (%).

3.6.5 Sorologia Coelhos RIFI

Um total de trinta e seis (36) coelhos foi testado pela técnica da imunofluorescência indireta para a pesquisa de anticorpos anti-*R. rickettsii*. Estes animais foram utilizados nas infestações experimentais realizadas na etapa posterior do estudo com carrapatos infectados (G1, G2, G3, da geração filial F₂ e do G4, e respectivos controles. Todas as amostra de soro de coelho obtiveram sorologia negativa para *R. rickettsii* no dia zero (0) da infestação e apresentaram títulos de anticorpos anti-*R.rickettsii* de pelo menos 1:1024 no trigésimo dia (dia +30) após a infestação, caracterizando elevada reatividade contra o agente *R. rickettsii*. Além do grupo controle, exceções foram encontradas em dois animais do Grupo 4, um utilizado na infestação por ninfas e o outro na infestação por adultos, que não apresentaram soroconversão, sendo que o primeiro não apresentou febre (39,6 °C), mas teve amostra de sangue

positiva pela PCR e o outro apresentou febre (40,2 °C), e teve seu sangue positivado pela PCR também.

No que se refere aos picos e temperatura retal nos coelhos, entre os animais dos grupos infectados, este valor oscilou entre 40,1°C a 41,8°C, contudo um animal, que teve sorologia positiva, não apresentou febre (39,4°C). Entre os animais controle, a temperatura máxima oscilou entre 39,4 °C a 39,8 °C. Os picos febris ocorreram com maior frequência entre os dias +6 e +11 após as inoculações ou infestações experimentais, dependendo da etapa do experimento.

3.7 DISCUSSÃO

No que concerne ao estudo do efeito deletério de patógenos sobre o desempenho biológico de carrapatos, os estudos realizados utilizaram inoculações por seringa como forma de infecção dos carrapatos. A quantidade de inóculo fornecido através deste tipo de inoculação é muito maior do que ocorre em condições naturais. Sabe-se que a infecção no organismo do carrapato está condicionada a uma concentração de *R. rickettsii* e que esta concentração mínima pode variar de acordo com a espécie do carrapato e com o estágio de desenvolvimento em uma mesma espécie (Burgdorfer, 1988). Logo, é de se esperar que aumentando a quantidade de riquetsias no organismo do carrapato, os efeitos desta sobre a biologia do ixodídeo serão tão mais intensos quanto maior for a concentração da bactéria. É o que observamos no presente estudo. Os resultados obtidos indicaram que apenas os grupos experimentais de *H. leporispalustris* originados a partir de inoculações artificiais com *R. rickettsii* tiveram seu desempenho prejudicado em relação ao grupo controle, uma vez que no quarto grupo experimental, que reproduziu a condição de infecção mais próxima da natural, os parâmetros biológicos avaliados permaneceram inalterados em relação ao grupo controle, ou obtiveram melhor desempenho (Tabelas 4 e 5), como foi o caso do IER superior alcançado pelas fêmeas ingurgitadas infectadas do G4, sugerindo que os efeitos deletérios verificados podem ser devido as inoculações artificiais.

Contudo, os efeitos deletérios da riquetsia sobre o organismo do carrapato podem ocorrer apenas após sucessivas passagens por via transovariana e a partir da quinta geração do ixodídeo, segundo observaram Burgdorfer e Brinton, 1975. O atual trabalho não objetivou este tipo de avaliação, para tal, estudos futuros devem ser conduzidos.

Nos estudos de Nieblyski et al. (1999), os autores observaram que a infecção por *R. rickettsii* foi letal para a maioria dos carrapatos *D. andersoni* infectados transovarianamente. Aproximadamente 94% das ninfas infectadas quando larvas em cobaios positivos morreram durante a muda para adultos e 88% das fêmeas jovens infectadas na fase de ninfa, morreram antes de se alimentar. No presente estudo com *H. leporispalustris*, efeitos tão significativos como estes não foram observados. Ocorreu uma maior mortalidade de larvas e ninfas ingurgitadas de *H. leporispalustris* somente nos grupos expostos aos animais inoculados e na segunda geração de carrapatos infectados (F₂), nos grupos 1, 2 e 3. Já para o grupo 4, a mortalidade de larvas e ninfas ingurgitadas foi significativamente menor em relação ao grupo controle, o que sugere um equilíbrio entre agente infeccioso e carrapato. Ainda de acordo com Nieblyski et al. (1999), *R. rickettsii* foi transmitida verticalmente para 39% da progênie dos *D. andersoni* infectados. Este percentual não pode ser avaliado no presente estudo devido a metodologia aplicada, pois um número maior de amostras de larvas da segunda (F₂, para o Grupo 4) e terceira (F₃, para os grupos 1, 2 e 3) gerações seria necessário. O contraste destes resultados com os encontrados no trabalho de Nieblyski et al. (1999) podem ser justificados não apenas pelo tipo de infecção a que foram submetidos os carrapatos, mas podem representar também uma maior suscetibilidade de *D. andersoni* à infecção por *R. rickettsii*, ou diferenças na virulência das cepas utilizadas e ainda pode ter ocorrido a potencialização dos efeitos da riquetsia devido ao tipo de hospedeiro utilizado, uma vez que os cobaios são altamente suscetíveis à bactéria, desenvolvendo picos febris e riquetsêmicos elevados, possibilitando a ingestão de doses elevadíssimas de riquetsias pelos carrapatos, uma vez que a

infecção no organismo carrapato é condicionada à quantidade de bactérias ingeridas pelo mesmo (Burgdorfer, 1988).

Estudos sobre os efeitos que outros agentes infecciosos exercem sobre o desempenho biológico de carrapatos foram conduzidos por Hu et al. (1997), Watt e Walker (2000) e Barreira (1988 e 2001), que trabalharam com *I. scapularis* associado a *B. microti*, *R. appendiculatus* associado a *T. parva*, e *B. microplus* associado a *B. bigemina* e *B. bovis*, respectivamente. Levando-se em consideração o período parasitário, os *H. leporispalustris* provenientes dos animais inoculados com *R. rickettsii* (Tabelas 1, 2 e 3) tiveram este parâmetro retardado em relação ao grupo controle, o que coincidiu com as observações de Hu et al. (1997) para o período parasitário de larvas e ninfas de *I. scapularis* infectadas com *B. microti*. Porém, para as larvas e ninfas de *H. leporispalustris* pertencentes ao grupo 4 (Tabela 4), o período parasitário permaneceu equivalente ao do grupo controle e a mortalidade foi menor nos carrapatos infectados. Na segunda geração (F₂) de *H. leporispalustris* infectados (Tabela 6), o período parasitário de larvas e ninfas foi semelhante ao do grupo controle, mas a mortalidade foi ainda superior nos grupos infectados. Em relação ao peso de larvas e ninfas ingurgitadas, os autores não encontraram diferenças significativas nestes parâmetros para as larvas ingurgitadas, mas observaram que as ninfas apresentaram peso significativamente mais elevado quando se alimentaram em animais infectados. Já a taxa de muda de larvas e ninfas de *I. scapularis* foi superior no grupo infectado, o que condiz com os resultados obtidos no presente trabalho, onde larvas e ninfas de *H. leporispalustris* apresentaram taxa de muda melhor nos grupos que se alimentaram em coelhos inoculados (grupos 1, 2 e 3), apesar do menor peso destes carrapatos nestes grupos. No grupo 4, as larvas foram mais pesadas e as ninfas obtiveram peso equivalente ao grupo controle, a mortalidade de larvas foi menor e a muda foi superior, indicando que houve melhora do desempenho parasitário no grupo infectado.

Watt e Walker (2000) também observaram que a mortalidade de ninfas ingurgitadas de *R. appendiculatus* infectadas com *T. parva* aumentou, esta variando de 5% até 100% no período de maior parasitemia. O processo de muda foi igualmente retardado (período de muda aumentou). A capacidade reprodutiva das fêmeas revelou-se menor nos carrapatos infectados e o período parasitário das fêmeas embora mais longo não se traduziu por um maior peso final e nem por uma maior produção de ovos. A eclosão larval caiu de 61% para 12%, no grupo infectado. O mesmo não foi observado no presente estudo com *H. leporispalustris*, a eficiência reprodutiva (IER) foi superior nos grupos infectados (G4 e na F₂ de G1 ao G3) e a eclosão larval foi afetada apenas na primeira passagem da rickettsia nos grupos 1 e 2 (Tabela 3), porém o grupo 3 nesta primeira passagem não foi afetado, tal fato deve-se provavelmente ao desenvolvimento lento da riquetsia nos tecidos das fêmeas primariamente expostas à bactéria, levando a uma infecção menor dos ovos e a um efeito prejudicial menor na eclosão. Todos os outros grupos não tiveram alteração da eclosão larval.

B. bigemina e *B. bovis* também foram capazes de ocasionar interferência sobre a biologia de fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, conforme os estudos de Barreira (1988). O peso das fêmeas ingurgitadas foi maior no grupo infectado, o período de pré-postura e postura não foi alterado. Houve redução na massa de ovos das teleóginas de *B. microplus* infectadas com *B. bigemina* e *B. bovis*. A taxa de mortalidade de fêmeas ingurgitadas foi de 95%. Não houve alterações no período de incubação dos ovos e no percentual de eclosão larval. No estudo sobre o comportamento biológico das cepas de *B. bovis* e *B. bigemina* modificadas e não modificadas e seus efeitos sobre os parâmetros biológicos das fêmeas ingurgitadas de *B. microplus*, Barreira (2001) observou alterações significativas sobre os parâmetros biológicos na fase de vida livre das fêmeas ingurgitadas de *B. microplus* com cepas de *B. bovis* e *B. bigemina* não modificadas, com aumento do período de pré-postura e peso das fêmeas, e com redução no período de postura, peso da postura, índice de eficiência reprodutiva. No presente

estudo com *H. leporispalustris*, o peso da fêmea ingurgitada foi reduzido e o peso da massa de ovos praticamente não foi alterado (apenas no grupo 2, Tabela 3) e em alguns casos até aumentou, como pode ser observado na Tabela 7. O período de pré-postura não foi alterado e o período de postura foi reduzido somente na etapa inicial do experimento, nos grupos de carrapatos gerados por inoculações (Tabela 3, G1 a G3). Não houve mortalidade de fêmeas ingurgitadas. A eficiência reprodutiva aumentou nos carrapatos do grupo 4 e nas fêmeas de segunda geração (F₂) dos grupos 1 ao 3. Concordando com as observações de Barreira (1988), também não houve alterações no período de incubação dos ovos e o percentual de eclosão larval foi reduzido apenas na etapa inicial do experimento, nos grupos de carrapatos gerados por inoculações (Tabela 3, G1 a G3).

Destes dados, pôde-se notar que a metodologia empregada no estabelecimento da infecção no carrapato influenciou diretamente o desempenho biológico dos ixodídeos. Se realmente ocorrem efeitos deletérios para os *H. leporispalustris* naturalmente infectados, estes devem ocorrer somente em gerações filiais mais distantes.

Em relação ao número de ovos encontrados em um grama de postura (OPG) observando as tabelas 3, 5 e 7, os valores encontrados permaneceram inalterados em todos os grupos, com média geral de $3,36 \pm 0,13$ mg para 50 ovos, o que equivale a dizer que em um grama de postura têm-se aproximadamente 14.880 ovos. Este fato é sugestivo de que este parâmetro é intrínseco a população de *H. leporispalustris* em estudo, pois para Labruna et al. (1997), que trabalharam com população de *H. leporispalustris* proveniente do Estado de Minas Gerais, este valor foi de 16.667 ovos para cada grama de postura, evidenciando assim a peculiaridade regional deste parâmetro.

Observamos que o coelhos utilizados no experimento foram pouco afetados pela infecção, principalmente os animais pertencentes ao grupo 4, o que nos leva a repensar a importância do coelho silvestre na manutenção do ciclo silvestre da doença. Embora os animais tenham desenvolvido reação imune consistente para *R. rickettsii*, evidenciada pelos elevados títulos obtidos pela RIFI, existem relatos que algumas espécies de coelhos desenvolvem maior imunidade frente a outras (Lundgren et al., 1968), o que os tornaria conseqüentemente pouco importantes na participação do ciclo silvestre da doença. A recente constatação por Randolph e Nuttall (1996) de uma forma de transmissão de patógenos ocasionada pela co-alimentação de carrapatos sadios e infectados em um mesmo hospedeiro pode dar novo rumo ao entendimento da ecologia de *R. rickettsii* e reabilitar o coelho silvestre e outras espécies como mantenedores de populações de carrapatos infectadas na natureza. Segundo os autores, a transmissão ocorre pela passagem direta do patógeno do carrapato infectado para o sadio sem, contudo, haver a necessidade do hospedeiro desenvolver a doença ou parasitemia para transmitir o patógeno. Este fato pode ter importantes significados sob o ponto de vista epidemiológico, pois voltaria a habilitar hospedeiros refratários ou imunes a doença como ponte na transferência de patógenos, pois segundo estudos de Burgdorfer (1988), embora a espécie de coelho *Sylvilagus nuttallii*, natural das Montanhas Rochosas, seja suscetível a infecção por *R. rickettsii*, tem concentração sanguínea de riquetsias suficiente apenas para infectar um número relativamente pequeno de carrapatos. O mesmo não se sabe se ocorre no Brasil, com a espécie *S. brasiliensis*, pois nenhum estudo foi conduzido no sentido de verificar a importância desta espécie na manutenção da Febre Maculosa Brasileira no meio rural.

3.8 CONCLUSÕES

Considerando-se os objetivos propostos pelo presente estudo, a metodologia empregada e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Foi observado efeito deletério de *R. rickettsii* nos grupos experimentais formados à partir de inoculações peritoneais em coelhos, com influência sobre parâmetros biológicos da fase parasitária e não parasitária da primeira geração (F₁) de larvas, ninfas e fêmeas de *H. leporispalustris* infectadas
2. Foi observado efeito positivo sobre parâmetros biológicos da fase parasitária e não parasitária de larvas, ninfas e fêmeas de *H. leporispalustris* provenientes do grupo experimental formado pelo co-parasitismo de machos infectados com *R. rickettsii*, e larvas negativas.
3. Os coelhos apresentaram sintomatologia diretamente relacionada com a forma de infecção a que foram submetidos, sendo mais evidentes os sinais clínicos nos animais que sofreram inoculações artificiais e, praticamente inexistentes, nos animais submetidos à infecção através do parasitismo de carrapatos infectados.
4. *R. rickettsii* pode interferir negativamente no desenvolvimento de carrapatos *H. leporispalustris* apenas em bacteremias mais intensas e assim mesmo em níveis reduzidos.

3.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- BARREIRA, J.D. Caracterização morfológica, aspectos biológicos e patogenia das formas evolutivas de *Babesia bovis* (Babés, 1888) e *Babesia bigemina* (Smith & Kilborne, 1893) (Protozoa: Babesiidae) em *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). 1988 - 103f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 1988.
- BARREIRA, J.D. Efeitos da infecção de *Babesia bigemina* (Smith e Kilborne, 1893) e *Babesia bovis* (Babés, 1888) sobre os parâmetros biológicos do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). 2001 - 138f. Tese (Doutorado em Medicina Veterinária – Parasitologia Veterinária) – Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2001.
- BURGDORFER, W.; BRINTON, L.P. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* v. 266, p.61–72, 1975.
- BURGDORFER, W.; HAYES, S.F.; MAVROS, A.J. Nonpathogenic rickettsiae in *Dermacentor andersoni*: a limiting factor for the distribution of *Rickettsia rickettsii*. In: Burgdorfer W, Anacker RL, editors. *Rickettsiae and rickettsial diseases*. New York: Academic Press; p. 585–594, 1981.
- BURGDORFER, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. In: Walker D.H. *Biology of rickettsial diseases*, v. 1. CRC Inc, Boca Raton, p. 33-50. 1988.
- CHOMKZYNSKI, P.A.A. A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, v. 15, p. 532-537, 1993.
- DRUMMOND R.O., WHETSTONE T.M. Oviposition of the Gulf Coast Tick. *J Econ Entomol.*, v. 66, p. 130-133, 1970.
- EDDY, G.W.; JOYCE, C.R., Ticks collected on the Tama (Iowa) Indian Reservation with notes on other species. *Iowa St. Coll. J. Sci.* v.16, p. 539–543, 1942.
- EREMEEVA, M.; YU, X.; RAOULT, D. Differentiation among spotted fever group Rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. *J. Clin. Microbiol.*, v. 32, p. 803-810, 1994.
- EVANS, G.O. *Principles of Acarology*. CAB. Intern. Wallingford, Oxon. 1992, 563 p.
- FONTES, L. R.; GOMES, S. M. A.; ANJOS, E. D.; ANDRADE, J. C. R. Brazilian Spotted Fever Transmitted by *Amblyomma aureolatum* (Acari) in Mogi da Cruzes, Brazil: Reported of four human cases and environmental control measures. In: *International Congress of Entomology, Brazil, Abstract Book I-XXI*. p. 749, 2000.
- FREITAS, L.H.T.; DAEMON, E.; PRATA, M.C.A.; FACCINI, J.L.H. Relação entre o peso e o número de larvas e ninfas ingurgitadas e entre o período de ingurgitamento ninfal e o sexo dos adultos de *Haemaphysalis leporispalustris* (Packard, 1869) (Acari: Ixodidae) em condições experimentais. *Rev. Bras. Zooc.* v. 2, p. 21-32, 2000.
- FREITAS, L.H.T.; CARDOSO, A.C.B.; PRATA, M.C.A.; FACCINI, J.L.H. Influência da temperatura de manutenção da fase não parasitária sobre a fase parasitária de *Haemaphysalis leporispalustris* (Packard, 1869) (Acari: Ixodidae). *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* v. 13, p. 115-123, 2004.

- JELLISON, W.L. The geographical distribution of Rocky Mountain spotted fever and Nuttall's cottontail in the western United States. *Pub. Health Rep.* v. 60, p. 958-961, 1945.
- HARRISON, B.A.; ENGBER, B.R.; APPERSON, C.S. Ticks (Acari: Ixodida) uncommonly found biting humans in North Carolina. *Journal of Vector Ecology*, v. 22, p. 6–12, 1997.
- HILLYER, E.V., QUESENBERRY K.E. *Ferrets, rabbits and rodents. Clinical medicine and surgery*. 1^a ed. Saunders, 432 p., 1997.
- HOFFMAN, R.S. Ordem Lagomorpha. In: WILSON, D.E.; REEDER, D.M. *Mammal species of the world. A taxonomic and geographical reference*. 2. ed. Washington and London: Smithsonian Institution Press, 1993. p. 807-827.
- HU, R.; HYLAND, K.E.; MARKOWSKI, D. Effects of *Babesia microti* infection on feeding pattern, engorged body weight, and molting rate of immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* v. 34, p. 559-564, 1997.
- HUGHES, V.L.; RANDOLPH S.E. Testosterone increases the transmission potential of tick-borne parasites. *Parasitology*. v. 123, p. 365-371, 2001.
- KELLY, P.J.; MASON, P.R. Transmission of a spotted fever group rickettsia by *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* v. 28, p. 598-600, 1991.
- KOLLARS, T.M.; OLIVER, J.H. Host associations and seasonal occurrence of *Haemaphysalis leporispalustris*, *Ixodes brunneus*, *I. cookei*, *I. dentatus* and *I. texanus* (Acari: Ixodidae) in southeastern Missouri. *J. Med. Entomol.*, v.40, n.1, p.103-107, 2003.
- LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C. Reproductive aspects of *Haemaphysalis leporis-palustris*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v. 92, p. 373-376, 1997.
- LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C.; OLIVEIRA, P.R. Study of the weight of eggs from six ixodid species from Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 92, p. 205-207, 1997.
- LABRUNA, M.B.; LEITE, R.C.; FACCINI, J.L.H.; FERREIRA, F. Life-cycle of the tick *Haemaphysalis leporis-palustris* (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. *Exp. Appl. Acarol.* v. 24, p. 683-694, 2000.
- LABRUNA, M.B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; MACBRIDGE, J.; 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. *J. Clin. Microbiol.*, v. 42, p. 90-98, 2004.
- LIMA, V. L. C.; FIGUEIREDO, A. C.; PIGNATTI, M. G.; MODOLO, M. Febre maculosa no município de Pedreira – Estado de São Paulo – Brasil. – Relação entre ocorrência de casos e parasitismo humano por Ixodídeos. *Revista da Soc. Brasileira de Medicina Tropical*, v. 28, n. 2, p. 135-137, 1995.
- LUNDGREN, D.L.; NICHOLS, P.S.; THORPE, B.D. Experimental infection of lagomorphs with *Rickettsia rickettsii*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 17, p. 213-218, 1968.
- MACALUSO, K.B.; SONENSHINE, D.E.; CERAUL, S.M.; AZAD, A.F. Rickettsial infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) inhibits transovarial transmission of a second *Rickettsia*. *J. Med. Entomol.* v. 39, p. 809-813, 2002.
- MCDADE, J.E.; NEWHOUSE, V.F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. *Ann. Rev. Microbiol.*, v. 40, p. 287-309, 1986.
- MERTINS, J.W.; SCHLATER, J.L.; CORN, J.L. Ectoparasites of the blackbuck antelope (*Antelope cervicapra*). *Journal of Wildlife Diseases*, v. 28, n. 3, p. 481-484, 1992.
- NEED, J.T.; DALE, W.E.; KEIRANS, J.M.; DASCH, G.A., Annotated list of ticks (Acari: Ixodidae: Argasidae) reported in Peru: distribution, hosts, and bibliography. *J. Med. Entomol.* v. 28, p. 590–597, 1991.
- NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H.S. Laboratory investigations on the karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). *Onderst. J. vet. Res.*, v. 38, p. 215-224, 1971.
- NIEBLYSKI, M.L.; PEACOCK, M.G.; SCHWAN, T.G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii*

- on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). *Appl. Environ. Microbiol.*, v. 65, p. 773-778, 1999.
- PARKER, R.R. Transmission of Rocky Mountain spotted fever by the rabbit tick *Haemaphysalis leporispalustris* Packard. *Am. J. Trop. Med.*, v. 3, p. 39-45, 1923.
- PARKER, R.R.; PICKENS, E.G.; LACKMAN, D.B.; BELL, E.J.; THRAIKILL, F.B. Isolation and characterization of Rocky Mountain Spotted Fever Rickettsiae from the rabbit tick *Haemaphysalis leporis-palustris* Packard. *Pub. Health Rep.*, v. 66, p. 455-463, 1951.
- RANDOLPH, S.E.; GERN, L.; NUTTALL, P.A. Co-feeding ticks: Epidemiological Significance for Tick-borne Pathogen Transmission. *Parasitol. Today*, v. 12, p. 472-478, 1996.
- WATT, D.M.; WALKER, A.R. Pathological effects and reduced survival in *Rhipicephalus appendiculatus* ticks infected with *Theileria parva* protozoa. *Parasitol. Res.* v. 86, p. 207-214, 2000.

4 CONCLUSÕES GERAIS

Considerando-se os objetivos propostos pelo presente estudo, a metodologia empregada e os resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. Foi observado efeito deletério de *R. rickettsii* nos grupos experimentais 1, 2 e 3, formados à partir de inoculações peritoneais em coelhos, com influência sobre parâmetros biológicos da fase parasitária e não parasitária da primeira geração (F₁) de larvas, ninfas e fêmeas de *H. leporispalustris* infectadas.
2. Foi observado efeito positivo sobre parâmetros biológicos da fase parasitária e não parasitária de larvas, ninfas e fêmeas de *H. leporispalustris* provenientes do grupo 4, formado à partir do parasitismo de carrapatos infectados com *R. rickettsii*, reproduzindo a condição natural.
3. Os coelhos apresentaram sintomatologia diretamente relacionada com a forma de infecção a que foram submetidos, sendo mais evidentes os sinais clínicos nos animais que sofreram inoculações artificiais e, praticamente inexistentes, nos animais submetidos à infecção através do parasitismo de carrapatos infectados.
4. As ninfas ingurgitadas que mudaram para machos foram mais leves e apresentaram período parasitário mais curto que as que mudaram para fêmeas.
5. A variável peso da ninfa ingurgitada pode ser empregada como um meio para pré-determinar o sexo do adulto, devido ao pequeno percentual de ambos os sexos que tiveram pesos sobrepostos na mesma classe de frequência.
6. O modelo quadrático obteve melhor ajuste para representar o período parasitário de machos de *H. leporispalustris*.
7. O período parasitário de fêmeas de *H. leporispalustris* se alongou e a eclosão larval foi praticamente nula com o aumento do período parasitário de machos.
8. O período parasitário máximo alcançado pelos machos de *H. leporispalustris* foi de 117 dias, mas sua capacidade reprodutiva em coelhos domésticos é afetada pelo desenvolvimento de resistência pelo hospedeiro.