



CAROLINE SIQUEIRA FRANCO

**“COMPETÊNCIA VETORIAL DE *ORNITHODOROS MIMON* KOHLS 1969 (ACARI:
ARGASIDAE) FRENTE À INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM LABORATÓRIO
COM CEPA DE *RICKETTSIA RICKETTSII* BRUMPT 1922”**

Campinas
2014



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CAROLINE SIQUEIRA FRANCO

“Competência vetorial de *Ornithodoros mimon* (Kohls 1969) (Acari: Argasidae) frente à infecção experimental com cepa de *Rickettsia rickettsii* (Ricketts 1909) em laboratório”

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação defendida pela candidata

Caroline Siqueira Franco

e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da UNICAMP para obtenção do Título de Mestre em BIOLOGIA ANIMAL, na área de Relações Antrópicas, Meio Ambiente e Parasitologia.

Orientador: Prof. Dr. Arício Xavier Linhares

CAMPINAS,
2014

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca do Instituto de Biologia
Mara Janaina de Oliveira - CRB 8/6972

F848c Franco, Caroline Siqueira, 1988-
Competência vetorial de *Ornithodoros mimon* KOHLS 1969 (Acari: Argasidae) frente à infecção experimental em laboratório com cepa de *Rickettsia rickettsii* BRUMPT 1922 / Caroline Siqueira Franco. – Campinas, SP : [s.n.], 2014.

Orientador: Arício Xavier Linhares.
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

1. Competência vetorial. 2. Argasidae. 3. *Rickettsia rickettsii*. I. Linhares, Arício Xavier, 1950-. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Vector competence of *Ornithodoros mimon* KOHLS 1969 (Acari: Argasidae) experimentally infected in laboratory with the strain of *Rickettsia rickettsii* BRUMPT 1922

Palavras-chave em inglês:

Vector competence

Argasidae

Rickettsia rickettsii

Área de concentração: Relações Antrópicas, Meio ambiente e Parasitologia

Titulação: Mestra em Biologia Animal

Banca examinadora:

Arício Xavier Linhares [Orientador]

Maria Halina Ogrzewalska

Patrícia Jacqueline Thyssen

Data de defesa: 16-01-2014

Programa de Pós-Graduação: Biologia Animal

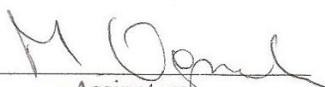
Campinas, 16 de janeiro de 2014

BANCA EXAMINADORA

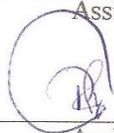
Prof. Dr. Arício Xavier Linhares (orientador)


Assinatura

Profa. Dra. Maria Halina Ogrzewalska


Assinatura

Profa. Dra. Patricia Jacqueline Thyssen


Assinatura

Profa. Dra. Selam Giorgio

Assinatura

Profa. Dra. Valeria Castilho Onofrio

Assinatura

RESUMO

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma doença infecciosa aguda transmitida através da picada de carrapatos infectados com *Rickettsia rickettsii* Brumpt 1922. O carrapato *Amblyomma cajennense* Fabricius 1787 (Acari: Ixodidae) é um dos principais vetores no Brasil. Contudo, outras espécies de carrapatos podem ser vetores da doença e parasitar humanos. Neste estudo, procurou-se avaliar a competência vetorial de *Ornithodoros mimon* Kohls 1969 (Acari: Argasidae) em laboratório após ser infectado experimentalmente com a cepa Taiapu de *Rickettsia rickettsii*, utilizando coelhos domésticos como modelo animal. Primeiramente, os carrapatos foram separados em grupos de acordo com seu estágio de desenvolvimento (larva, ninfa 2 e adulto). Na segunda etapa, dois coelhos foram utilizados como grupo tratamento, e foram inoculados com a *Rickettsia*, e um coelho foi usado como controle. Os carrapatos utilizados foram separados em lotes, de acordo com o coelho e dia em que foram alimentados. Na terceira etapa, novos coelhos sadios foram infestados com os carrapatos usados na segunda etapa, para verificar se houve transmissão. Carrapatos que tiveram contato com a bactéria foram macerados e inoculados em duas cobaias, e uma terceira cobaia foi infestada com carrapatos que foram alimentados em coelho infectado. PCR com os primers *gltA* e *ompA* (*R. rickettsii*), *ftsZ* (*Wolbachia* sp.), 28S (eucarioto) foi realizado, para avaliar se os carrapatos se tornaram infectados. Sequenciamento de amostras foram amplificadas com os primers *ompA* e 28S. Além da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI), que foi realizada com o soro dos coelhos para verificar a presença de infecção. Os dois coelhos que foram inoculados com *Rickettsia rickettsii* apresentaram picos de febre. Um dos coelhos apresentou resultado positivo na RIFI e o outro morreu no décimo sexto dia após a inoculação. Os coelhos que foram infestados com carrapatos que foram alimentados em coelho infectado não apresentaram febre e nenhum outro sintoma da doença. As cobaias que foram inoculadas com carrapatos e a cobaia que foi infestada com carrapatos não demonstraram nenhum sintoma da doença. Das amostras amplificadas com o primer *gltA* apenas uma amostra foi positiva. A PCR das amostras de carrapatos usando o primer *ompA* não apresentou o resultado esperado, provavelmente devido a presença do DNA da bactéria *Wolbachia* sp. A sequência gerada, com amostras que foram amplificadas com o primer 28S, foi o DNA do carrapato. A PCR com o primer

ftsZ não amplificou nenhum DNA. Portanto, conclui-se que *O. mimon* não se tornou infectado com a *Rickettsia rickettsii*, e não representa risco para a saúde pública.

ABSTRACT

The Brazilian Spotted Fever (BSF) is an acute infectious disease transmitted by the bite of ticks infected with *Rickettsia rickettsii* Brumpt 1922. The tick *Amblyomma cajennense* Fabricius 1787 (Acari: Ixodidae) is one of the main vectors in Brazil. However, other species of ticks can be vectors of this disease and parasitize humans. This study aimed to evaluate the vector competence of *Ornithodoros mimon* Kohls 1969 (Acari: Argasidae) in the laboratory after being experimentally infected with the Taiacu strain of *Rickettsia rickettsii*, using domestic rabbits as the animal models. Firstly, the ticks were separated into groups according to their developmental stage (larva, nymph 2 and adult). Secondly, two rabbits were used as treatment group, and were inoculated with the *Rickettsia*, and one rabbit was used as control. The ticks were separated into batches according to the rabbit and the day they were fed. New healthy rabbits were infested with the ticks used in the second experiment, to verify the occurrence of transmission. Ticks that had contact with the bacteria were macerated and inoculated into two guinea pigs, and a third guinea pig was infested with ticks that were fed on infected rabbits. PCR with *gltA* e *ompA* primers (*R. rickettsii*), *ftsZ* (*Wolbachia* sp.), 28S (eukaryotic) was performed, to assess if the ticks become infected. Sequencing of the samples was amplified with the primers *ompA* and 28S. In addition, the Immunofluorescence Assay (IFA) was performed with serum of rabbits to verify the presence of infection. The two rabbits that were inoculated with *Rickettsia rickettsii* presented peaks of fever. One rabbit presented a positive result in the IFA and the other died on the sixteenth day after inoculation. The rabbits that were infested with ticks that were fed on infected rabbits, showed no fever and no other symptoms of the disease. The guinea pigs that were inoculated with ticks and the guinea pig that was infested with ticks showed no symptoms of the disease. Of the samples only one of all samples amplified with the primer *gltA* was positive. The PCR samples of ticks using the primer *ompA* did not yield the expected result, probably due to the presence of the DNA of the bacteria *Wolbachia* sp. The sequence generated, with samples that were amplified with the primer 28S, it was the DNA of the tick. PCR performed with the primer *ftsZ* did not amplify any DNA. Therefore, we concluded that *O. mimon* did not become infected with *R. rickettsii*, and do not represent risk to public health.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL.....	1
2. OBJETIVO GERAL.....	6
3. CAPÍTULO 1 – INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE <i>RICKETTSIA RICKETTSII</i> BRUMPT 1922 EM <i>ORNITHODOROS MIMON</i> KOHLS 1969 (ACARI: ARGASIDAE).....	7
3.1 INTRODUÇÃO.....	8
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	10
3.3 RESULTADOS.....	18
3.4 DISCUSSÃO.....	20
3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	23
4. CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA TRANSMISSÃO DE <i>RICKETTSIA RICKETTSII</i> BRUMPT 1922 EM LARVAS, NINFAS 2 E ADULTOS DE <i>ORNITHODOROS MIMON</i> KOHLS 1969 (ACARI: ARGASIDAE) ALIMENTADAS EM COELHO INFECTADO E O EFEITO DA INFECÇÃO NO SEU DESENVOLVIMENTO	33
4.1 INTRODUÇÃO.....	34
4.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
4.3 RESULTADOS.....	37
4.4 DISCUSSÃO.....	39
4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
5. CAPÍTULO 3 – TESTE PARA DIAGNOSTICAR A BACTÉRIA <i>WOLBACHIA</i> SP. EM <i>ORNITHODOROS MIMON</i> KOHLS 1969.....	45
5.1 INTRODUÇÃO.....	45
5.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	47
5.3 RESULTADOS.....	49
5.4 DISCUSSÃO.....	51
5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
6. CONCLUSÕES GERAIS.....	56
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS.....	59
ANEXOS.....	64

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

- Figura 1.** Câmara de alimentação colocada em coelho para infestação com larvas, ninfas e adultos de *O. mimon*, fixadas nas orelhas para alimentação das larvas e no dorso para alimentação de ninfas e adultos..... 26
- Figura 2.** Fluxograma das infestações com larvas de *Ornithodoros mimon*. GC= Grupo Controle; G1* = grupo que teve contato com a *Rickettsia rickettsii* na fase de larva..... 26
- Figura 3.** Fluxograma das infestações com ninfas 2 de *Ornithodoros mimon*. GC= Grupo Controle; G2* = grupo que teve contato com a *Rickettsia rickettsii* na fase de ninfa de segundo estágio..... 27
- Figura 4.** Fluxograma das infestações com adultos de *Ornithodoros mimon*. GC= Grupo Controle; G3* = grupo que teve contato com a *Rickettsia rickettsii* na fase adulta e G4 = grupo oriundo dos adultos que tiveram contato com a bactéria..... 27
- Figura 5.** Fluxograma das infestações com ninfas 1 de *Ornithodoros mimon*, oriundos da segunda etapa. GC= Grupo Controle; G1* = grupo que teve contato com a *Rickettsia rickettsii*. 28
- Figura 6.** Fluxograma das infestações com ninfas 3 de *Ornithodoros mimon*, oriundos da segunda etapa. G2* = grupo que teve contato com a *Rickettsia rickettsii*..... 28
- Figura 7.** Divisão dos lotes de carrapatos alimentados em diferentes coelhos. Os coelhos da segunda etapa foram usados em todos os grupos (G1, G2 e G3). Na terceira etapa foi utilizado um coelho sadio para cada lote..... 29
- Figura 8.** Temperatura retal dos coelhos inoculados e controle (coelho 3 – não inoculado) a partir do dia em que foi inoculada a cepa da *Rickettsia rickettsii* – segunda etapa experimental..... 30
- Figura 9.** Temperatura dos coelhos a partir do sétimo dia após a infestação com ninfas 1 de *O. mimon* (controle – infestado com carrapatos que se alimentaram no coelho não inoculado)..... 31
- Figura 10.** Temperatura dos coelhos a partir do sétimo dia após a infestação com ninfas 3 de *O. mimon*..... 31
- Figura 11.** Temperatura retal das cobaias que foram inoculadas com macerado de ninfas 2 de *O. mimon* (cobaias 1 e 2) e infestada com ninfas 2 de *O. mimon* (cobaia 3) que tiveram com contato com coelho infectado com *Rickettsia rickettsii*..... 32

Capítulo 2

- Figura 1.** Média do tempo de ecdise de larvas e ninfas 2 de *O. mimon* alimentadas em coelhos infectados (coelho 1 e coelho 2) e controle (coelho3)..... 42
- Figura 2.** Média do tempo de ecdise de ninfas 1 de *O. mimon* alimentadas em coelhos sadios..... 43
- Figura 3.** Média do tempo de ecdise de ninfas 3 de *O. mimon* alimentadas em coelhos sadios..... 44

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1

Tabela 1. Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados nas reações de PCR.....	30
----------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo 2

Tabela 1. Tempo da oviposição de fêmeas de <i>O. mimon</i> separado por lote de acordo com a alimentação em coelho infectado com <i>R. rickettsii</i> (coelho 1 e coelho 2) ou controle. O período prévio é o tempo (dias) que a fêmea ficou em repouso após o acasalamento – período de pré-oviposição; período próprio são os dias em que houve oviposição – período de oviposição.....	42
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 2. Tempo de eclosão dos ovos de <i>O. mimon</i> , separados por coelho (coelho 1 e 2 – coelhos infectados; coelho controle – sem contato com a <i>R. rickettsii</i>) e seus respectivos lotes em dias (média \pm dp).....	43
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Capítulo 4

Tabela 1. Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados nas reações de PCR com o primer <i>ompA</i>	54
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 2. Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados nas reações de PCR com o primer 28S.....	54
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 3. Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados nas reações de PCR com o primer <i>ftsZ</i>	54
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 4. Organismos que apresentaram maior similaridade com o DNA amplificado e sequenciado de três carrapatos utilizando-se primers com alvo no gene <i>ompA</i> de <i>Rickettsia</i>	55
------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

Tabela 5. Organismos que apresentaram maior similaridade com o DNA amplificado e sequenciado de carrapatos utilizando-se primer com alvo no gene 28S Ribossomal de <i>Ornithodoros</i>	55
-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

**Dedico este trabalho a
todos que fazem parte de
minha vida.**

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer ao meu orientador Professor Dr. Arício por me aceitar como sua orientada, pela confiança e principalmente por toda ajuda, paciência e dedicação.

À CAPES pelo financiamento do meu projeto.

A todos os funcionários da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) por terem me ajudado na parte experimental do meu projeto. Principalmente ao Celso, Verinha, Delvo, Chico, e Mara.

Ao Adriano e a Nadia que me ajudaram na parte molecular do meu trabalho. Sem vocês meu trabalho não teria dado certo, então obrigada mesmo.

E principalmente queria agradecer a minha família, pela paciência e por todo apoio, pois sem vocês tudo seria mais difícil. Obrigada mãe, pai, Maíce, Mariane, Vó Nahyr e Vô Siqueira e ao meu namorado Renan por me levar muitos fins de semana para realização da parte experimental, pelo apoio e por me aguentar quando estava nervosa. Amo muito todos vocês!

1. INTRODUÇÃO GERAL

Dentro da família *Argasidae* (Acari), o gênero *Ornithodoros* é o que contém o maior número de espécies, ao menos 113 descritas até o momento. O Brasil possui 15 espécies registradas deste gênero, dentre as 52 espécies presentes na região neotropical, sendo encontrados parasitando morcegos (Landulfo *et al.*, 2012).

Carrapatos do gênero *Ornithodoros* (corpo mole) apresentam de 2-8 estágios ninfais durante seu ciclo de vida, além do estágio de larva e adulto, diferente dos ixodídeos (corpo duro) que apresentam apenas um estágio de ninfa. Quando atingem a maturidade podem viver em média 15 anos em algumas espécies, portanto sua longevidade permite se alimentarem várias vezes quando os hospedeiros estão disponíveis (Morel, 1969 Apud Vial, 2009). A rápida alimentação sanguínea é a principal característica desses carrapatos, particularmente para ninfas e adultos que se alimentam entre 15-60 minutos, a duração da alimentação para larvas é maior, podendo levar de 12 horas a vários dias (Sonenshine, 1993).

Em geral, as fêmeas ovipõem após cada alimentação sanguínea e, ao contrário dos carrapatos de corpo duro, o fazem em baixa quantidade, de duas a cinco vezes durante toda a sua vida adulta. O total de ovos produzidos varia entre 200 a 300 ovos mesmo com várias oviposições, essa estratégia pode ser uma adaptação à variação climática ou escassez de hospedeiros (Morel, 1969 Apud Vial, 2009; Randolph, 1998).

A espécie *Ornithodoros mimon* Kohls 1969 utiliza como hospedeiros os morcegos e também é muito agressiva aos humanos. Esta espécie foi originalmente descrita a partir de larvas coletadas de duas espécies de morcegos na Bolívia e Uruguai. No Brasil, *O. mimon* foi relatado parasitando humanos, sendo encontrada infestando morcegos (Landulfo *et al.*, 2012).

Carrapatos são conhecidos por transmitir organismos de vários grupos taxonômicos – incluindo protozoários, vírus e bactérias – entre hospedeiros vertebrados e têm sido documentados como eficientes vetores de doença animal e humana (Kocan, 1986). Os ixodídeos (corpo duro) e os argasídeos (corpo mole) são duas famílias de carrapatos que são de importância médica, pois se alimentam de quase todas as classes de vertebrados, transmitindo doenças a esses animais. A maioria dos carrapatos que se infectam com *Rickettsia* são membros da família *Ixodidae* (Socolovschi *et al.*, 2012).

Argasídeos podem causar intoxicação, paralisia, irritação, alergias e sangria, e pode desempenhar um papel importante como vetores e reservatórios de patógenos (Jongejan e Uilenberg, 2004). Porém, sua especialização para micro-habitats protegidos, sua rápida alimentação de sangue e seu estilo de vida nidícola esconde a sua presença de tal modo que o seu papel na saúde humana e animal geralmente é ignorado (Hoogstraal, 1985).

Os carrapatos moles são comumente polixenos, ou seja, mudam de hospedeiro a cada alimentação sanguínea (Morel, 1969 Apud Vial, 2009). Como consequência de seu estilo de vida nidícola podem simplesmente escolher hospedeiros que estão diretamente disponíveis no seu micro-habitat favorável, resultando numa seleção aparente de pequenos hospedeiros vertebrados, animais domésticos e seres humanos. No entanto, as preferências de hospedeiros são difíceis de investigar nesses carrapatos, porque se alimentam rapidamente e são, portanto, difíceis de encontrar em seu abrigo (Kent, 2009).

O gênero *Ornithodoros*, recebeu maior atenção por agirem como vetores biológicos do vírus da febre suína africana, onde algumas espécies têm se mostrado capazes de serem vetores (Beck *et al.*, 1986). A detecção de um grande número de espécies de riquetsias em argasídeos foram descobertas a partir de técnicas modernas de biologia molecular. O papel epidemiológico desempenhado por argasídeos como vetores, assim como a importância destas rickettsias como patógenos continua a ser determinado. Prevê-se que um número crescente de novas espécies de bactérias seja detectado em argasídeos, como já ocorre em ixodídeos (Manzano-Román *et al.*, 2012).

Em estudo feito por Davis & Hoogstraal (1954) foi demonstrado que este gênero parasita grandes vertebrados, incluindo o homem, e é considerado reservatório e eficiente vetor de *Borrelia crocidurae* (Leger 1917) Davis 1957, o agente causador da febre africana em seres humanos. São vetores e reservatórios da febre recorrente em diferentes partes do mundo, são também incriminados como potenciais vetores e reservatórios de *Rickettsia rickettsii* Brumpt 1922 e da doença de Lyme causada pela *Borrelia burgdorferi* Johnson, Schmidt, Hyde, Steigerwalt & Brenner 1984 (Guimarães *et al.*, 2001).

A introdução de rickettsias no hospedeiro vertebrado ocorre, principalmente, através da saliva durante a alimentação, porém esses organismos também podem ser passados por lesões da

picada, fluido coxal ou fezes (Arthur, 1961a; Kocan, 1986). Os órgãos infectados dos carrapatos incluem as glândulas salivares e os ovários, onde uma infiltração ampla ocorre nos tecidos, porém, o mecanismo exato de desenvolvimento e transmissão de rickettsias é desconhecido (Arthur, 1961a, Kocan, 1986).

O gênero *Rickettsiae* pertence à família *Rickettsiaceae*, ordem *Rickettsiales* das α -proteobactérias (Roux & Raoult, 1995). Este grupo foi nomeado por Rocha Lima (1916), em homenagem a Howard Ricketts, que realizou estudos com o agente da febre do tifo exantemático. Este gênero constitui um grupo de microrganismos comumente encontrado no tecido de artrópodes (Arthur, 1961b).

O gênero *Rickettsia* é dividido em quatro grupos: o grupo da febre maculosa, o grupo do tifo, o grupo de transição e o grupo ancestral. No Brasil, há relatos de sete espécies de *Rickettsia*: a *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* Parker 1937, *Rickettsia rhipicephali* (ex Burgdorfer *et al.* 1978) Weiss and Moulder 1988, e *Rickettsia amblyommii* (ainda não descrita segundo Stromdahl *et al.*, 2008) pertencem ao grupo da febre maculosa e são transmitidas através de carrapatos; *R. felis* Bouyer *et al.*, 2001 emend. La Scola *et al.*, 2002 pertence ao grupo de transição e *R. typhi* (Wolbach e Todd 1920) Philip 1943 faz parte do grupo do tifo, ambas transmitidas através de pulgas; e *R. bellii* Philip *et al.* 1983 do grupo ancestral e é transmitida através de carrapatos (Fortes *et al.*, 2010).

A bactéria *Rickettsia rickettsii* possui menos de 0,5 μ m de diâmetro, é gram-negativa, intracelular obrigatória e mostra considerável pleomorfismo, porém nunca apresenta o formato esférico. Além disso, tem tropismo por células endoteliais dos hospedeiros vertebrados, causando vasculite em diferentes regiões do organismo (Arthur, 1961a; Burgdorfer, 1988).

O papel de hospedeiros amplificadores na ecologia da febre maculosa é crucial, pois são vertebrados que desenvolvem riquetsemia por alguns dias e iniciam novas linhagens de carrapatos infectados dentro da população, quando novos carrapatos não infectados tornam-se infectados (Piranda *et al.*, 2011). Na natureza, a taxa de carrapatos infectados com *R. rickettsii* é muito baixa, por isso, a participação de hospedeiros amplificadores da *R. rickettsii* é fundamental, já que somente a transmissão transovariana e transestadial não é suficiente (Souza *et al.*, 2009; Freitas *et al.*, 2009).

Os amplificadores primários de *R. rickettsii* nos Estados Unidos são pequenos roedores. O agente circula nos focos naturais por meio de carrapatos que adquirem a bactéria ao se alimentarem em animais infectados, transmitindo o patógeno para animais suscetíveis, sendo o homem um hospedeiro acidental. Os carrapatos desempenham um importante papel não só como vetores biológicos, mas também como reservatórios, pois transmitem a *R. rickettsii* verticalmente à sua progênie (transmissão transovariana) (Guimarães *et al.*, 2001).

A *R. rickettsii* é transmitida transovarianamente e transestadialmente em várias espécies de carrapatos, como demonstrado em estudos experimentais realizados nos Estados Unidos (Parker *et al.*, 1933). Em condições naturais, as taxas de infecção por *R. rickettsii* são muito baixas (geralmente < 1%), principalmente porque tem sido demonstrado que esta bactéria é patogênica para carrapatos (Burgdorfer, 1988; Niebylski *et al.*, 1999).

Carrapatos infectados na fase de larva e de ninfa sofrem infecção massiva no ovário, já em carrapatos infectados durante o estágio adulto a infecção ovariana é limitada. Portanto, a eficiência na transmissão transovariana depende do grau de desenvolvimento da riquetsia nos oócitos, o que por sua vez depende da fase de vida em que os carrapatos são infectados (Burgdorfer & Brinton, 1975). Ademais, a quantidade de bactérias ingeridas pelo carrapato modula a intensidade dos efeitos deletérios do agente infeccioso sobre o organismo do mesmo, este é um fator relevante na epidemiologia da febre maculosa, conforme relatou Burgdorfer (1988).

A febre maculosa brasileira (FMB) é uma doença altamente letal que tem sido reportada desde 1920 no Brasil, tem como agente etiológico a bactéria *Rickettsia rickettsii*, sendo transmitida através da picada de carrapatos infectados (Guedes *et al.*, 2005; Burgdorfer, 1988). A capivara (*Hydrochoerus hydrochaeris* Linnaeus 1766) é considerada reservatório da bactéria na natureza, mantendo o agente circulando sem apresentar sintomas clínicos da doença. A bactéria foi isolada também em gambá (*Didelphis marsupialis* Linnaeus 1758), cachorros (*Canis familiaris* Linnaeus 1758) e em coelhos selvagens (*Sylvilagus* spp.) (Greca *et al.*, 2008).

Em humanos, a bactéria apresenta período de incubação de dois a 14 dias, com média de sete dias. Os sintomas incluem: febre alta, cefaleia, mialgia, dor abdominal e aparecimento de máculas. No entanto, nem todas as pessoas acometidas apresentam esses sintomas, embora a

febre e a dor de cabeça sejam os sintomas mais frequentes. A letalidade em casos não tratados pode chegar a mais de 80% (Galvão & Ribeiro, 1993). É um problema de saúde pública em ascensão no estado de São Paulo, com aumento no número de casos humanos e sempre acompanhados de altas taxas de letalidade (Lima *et al.*, 2003; Katz *et al.*, 2009).

O *Amblyomma cajennense*, é o vetor mais comum da febre maculosa na América do Sul, porém outros artrópodes estão envolvidos na sua transmissão como o *Amblyomma aureolatum* Pallas 1772, principal vetor no estado de São Paulo (Vieira *et al.*, 2004; Labruna *et al.*, 2011). Nos Estados Unidos os vetores da febre maculosa são *Dermacentor andersoni* Stiles 1908 e *Dermacentor variabilis* Say 1821, e há relatos no México e nos EUA de *Rhipicephalus sanguineus* Latreille 1806 (Silveira, 2006).

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar a competência vetorial de *Ornithodoros mimon* em laboratório frente à infecção experimental por uma cepa de *Rickettsia rickettsii*.

2.1 Objetivos Específicos

Determinar a transmissão de *Rickettsia rickettsii* nas larvas, ninfas e adultos de *Ornithodoros mimon* alimentados nos coelhos infectados (Capítulo 1);

Verificar a presença de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* em soros de coelhos previamente parasitados por larvas e ninfas que se alimentaram em coelhos infectados (Capítulo 1);

Verificar a patogenicidade, em cobaia, de *R. rickettsii* de carrapatos previamente alimentados em coelhos infectados, por inoculação intraperitoneal (Capítulo 1);

Verificar a patogenicidade de *Rickettsia rickettsii*, através da infestação de carrapatos previamente alimentados em coelho infectados, utilizando cobaia (Capítulo 1);

Determinar e comparar o período de oviposição de fêmeas de *O. mimon*, o período de ecdise das larvas e ninfas alimentadas nos coelhos inoculados com *Rickettsia rickettsii* com o das larvas e ninfas alimentadas em coelho controle (Capítulo 2);

Identificar a espécie de bactéria presente em *Ornithodoros mimon* através da PCR (Capítulo 3).

3. CAPÍTULO 1: Infecção experimental de *Rickettsia rickettsii* Brumpt 1922 em *Ornithodoros mimon* Kohls 1969 (Acari: Argasidae)

RESUMO

Ornithodoros mimon Kohls (1969) é um carrapato de corpo mole que parasita morcegos e de comportamento agressivo ao ingerir sangue, podendo transmitir patógenos através da alimentação sanguínea. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar a competência vetorial de *Ornithodoros mimon* experimentalmente infectados com cepa Taiacu de *Rickettsia rickettsii* Brumpt 1922, utilizando-se coelhos domésticos como modelo animal. Primeiramente, os carrapatos foram separados em grupos de acordo com seu estágio de desenvolvimento (larva, ninfa 2 e adulto). Na segunda etapa dois coelhos foram utilizados como grupo tratamento, e foram inoculados com *Rickettsia*, e um coelho foi mantido como controle. Os carrapatos foram separados em lotes, de acordo com o coelho e dia em que foram alimentados. Na terceira etapa novos coelhos sadios foram infestados com os carrapatos usados no segundo experimento, para verificar a ocorrência da transmissão. Carrapatos que tiveram contato com a bactéria foram macerados e inoculados em duas cobaias, e uma terceira cobaia foi infestada com carrapatos que foram alimentados em coelho infectado. PCR com primers de *Rickettsia rickettsii* (*gltA* e *ompA*) foi realizado, para avaliar se os carrapatos se tornaram infectados. Além da Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI) que foi realizada com soro dos coelhos para verificar a presença da infecção. Os dois coelhos que foram inoculados com *Rickettsia rickettsii* apresentaram picos de febre. Um coelho apresentou resultado positivo na RIFI e o outro morreu no décimo sexto dia após a inoculação. Os coelhos que foram infestados com carrapatos que foram alimentados em coelho infectado não apresentaram febre e nenhum outro sintoma da doença. As cobaias que foram inoculadas com macerados de carrapatos e a cobaia que foi infestada com carrapatos não demonstraram nenhum sintoma da doença. Das amostras amplificadas com o primer *gltA* apenas uma amostra foi positiva. A PCR das amostras de carrapatos usando o primer *ompA* não apresentou resultado esperado, provavelmente devido a presença do DNA da bactéria *Wolbachia* sp.

ABSTRACT

Ornithodoros mimon Kohls (1969) is a soft-bodied tick that parasites bats and has an aggressive blood feeding behavior, and can transmit pathogens during blood meals. Therefore, the aim of this study was to evaluate the vector competence of *Ornithodoros mimon* experimentally infected with the Taiapu strain of *Rickettsia rickettsii* Brumpt 1922, using domestic rabbits as the animal models. Firstly, the ticks were separated into groups according to their developmental stage (larva, nymph 2 and adult). Secondly, two rabbits were used as treatment group, and were inoculated with the *Rickettsia*, and one rabbit was used as control. The ticks were separated into batches according to the rabbit and the day they were fed. New healthy rabbits were infested with the ticks used in the second experiment, to verify the occurrence of transmission. Ticks that had contact with the bacteria were macerated and inoculated into two guinea pigs, and a third guinea pig was infested with ticks that were fed on infected rabbits. PCR with *Rickettsia rickettsii* primers (*gltA* and *ompA*) was performed, to assess if the ticks become infected. In addition, the Immunofluorescence Assay (IFA) was performed with serum of rabbits to verify the presence of infection. The two rabbits that were inoculated with *Rickettsia rickettsii* presented peaks of fever. One rabbit presented a positive result in the IFA and the other died on the sixteenth day after inoculation. The rabbits were infested with ticks that were fed on infected rabbits, showed no fever and no other symptoms of the disease. The guinea pigs that were inoculated with macerated of ticks and guinea pig that was infested with ticks showed no symptoms of the disease. Of the samples only one of all samples amplified with the primer *gltA* was positive. The PCR samples of ticks using the primer *ompA* did not yield the expected result, probably due to the presence of the DNA of the bacteria *Wolbachia* sp.

3.1 INTRODUÇÃO

Carrapatos são ectoparasitas que se alimentam em diferentes animais, incluindo mamíferos, aves e répteis e possuem distribuição mundial. Por serem vetores de diversos agentes patogênicos para humanos e animais são de enorme importância médica e veterinária (Manzano-Román *et al.*, 2012).

A transmissão de vários tipos de vírus, pelas espécies do gênero *Ornithodoros*, ocorre através da alimentação em um animal infectado, passando o patógeno ao se alimentar em outro hospedeiro. O vírus no carrapato pode ser transmitido via transestadial e transovariana (Manzano-Román *et al.*, 2012).

Além de vírus, este gênero é vetor e reservatório de bactérias que são transmitidos através da saliva ou do líquido coxal (Manzano-Román *et al.*, 2012). Alguns dos principais patógenos transmitidos por este gênero são espécies de *Borrelia*, que causam a febre recorrente, estas espiroquetas podem persistir em seus vetores por muitos anos (Estrada-Peña e Jongejan, 1999).

Bactérias do gênero *Rickettsiae* causam doenças que são amplamente distribuídas, pois são mantidas na natureza através de vetores artrópodes que frequentemente infectam vertebrados e permitem novas linhagens de carrapatos adquirirem a infecção (Azad & Beard, 1998). Os humanos são hospedeiros acidentais, constituindo elo terminal no ciclo dessas bactérias (Galvão *et al.*, 2005).

A espécie *O. rudis* Karsch 1880 foi experimentalmente infectada com *R. rickettsii* e manteve a bactéria por 343 dias, os carrapatos transmitiram transovariamente para a próxima geração, porém não foram capazes de transmitir a *Rickettsia* para cobaias através da alimentação. A bactéria aparentemente não infecta as glândulas salivares deste carrapato, embora infecte os ovários (McDade & Newhouse, 1986).

Os hospedeiros vertebrados são fonte de alimento tanto para carrapatos infectados quanto para os não infectados, sendo, portanto, veículos nos quais novas linhagens de carrapatos se tornam infectados. Para o desenvolvimento de carrapatos da espécie *Dermacentor andersoni* Stiles 1908, mamíferos são necessários, esses animais geralmente são numerosos e se reproduzem rapidamente e também são infestados por uma grande carga de carrapatos durante sua vida (McDade & Newhouse, 1986). Cobaias são altamente suscetíveis à infecção com a bactéria da febre maculosa, a *R. rickettsii*, normalmente apresentam febre e morrem após alguns dias da inoculação (Walker *et al.*, 1977).

Em estudos realizados por Foot (1919) e Walker *et al.* (1977) cobaias que foram inoculados com *R. rickettsii*, mostraram aumento da temperatura no quarto dia, persistindo por cinco dias. Os animais apresentaram lesões no quinto ou sexto dia, sendo mais acentuada no escroto e testículos,

embora as orelhas, patas e pele podem se tornar avermelhadas. No entanto, a maioria das cobaias morre no sexto ou nono dia da doença, onde a letalidade de cobaias inoculadas com esta bactéria intraperitonealmente foi de 66,7% em experimento realizado por Freitas *et al.* (2009).

No Brasil, nenhum estudo ainda foi conduzido no sentido de se conhecer o desempenho de *O. mimon* frente à infecção por *R. rickettsii* e seu potencial como vetor e reservatório da febre maculosa brasileira. Tendo em vista que *O. mimon* é um carrapato que parasita seres humanos este estudo é de crucial importância. Portanto, o objetivo deste projeto foi avaliar a competência vetorial desta espécie de carrapato em laboratório, por infecção experimental, utilizando coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus* Linnaeus 1758) como modelo animal. Além disso, procurou-se verificar se ninfas de segundo estágio de *Ornithodoros mimon* alimentadas em coelhos infectados com uma cepa de *Rickettsia rickettsii*, são capazes de abrigar a bactéria e mantê-la ativa em seu organismo, utilizando cobaias.

3.2 MATERIAL E MÉTODOS

3.2.1 Local de estudo e obtenção dos exemplares para experimentação

A parte experimental teve início em dezembro de 2011 e foi desenvolvido até abril de 2012 no Laboratório de Carrapatos da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), localizada no Município de Mogi Guaçu – São Paulo. Os experimentos moleculares foram desenvolvidos no período compreendido entre janeiro de 2012 e outubro de 2013, no Laboratório Bioquímico e Molecular da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN), São Paulo – São Paulo.

O estudo foi realizado com uma colônia de *Ornithodoros mimon*, oriundo do Município de São Simão, SP. Esta colônia foi mantida há pelo menos cinco gerações em laboratório.

A *Rickettsia rickettsii* utilizada neste experimento, oriunda de uma cepa Taiacu, foi originalmente isolada em cultivo de células Vero a partir de carrapato *Amblyomma aureolatum* Pallas 1772, naturalmente infectado (Pinter & Labruna, 2006).

Os coelhos utilizados no experimento eram da raça Nova Zelândia, branco, do sexo masculino, com idade compreendida entre 60 a 120 dias, com peso inicial de 1,5kg, sem contato prévio com carrapatos, oriundos do Laboratório da SUCEN de Mogi Guaçu – SP.

Durante o período experimental os coelhos permaneceram alojados no Biotério do Laboratório de Carrapatos, sendo mantidos em sala isolada dos demais animais e em gaiolas individuais. Como medida preventiva de segurança, foi colada fita dupla face em toda gaiola e a gaiola permaneceu sobre uma bancada para o caso de algum carrapato escapar. Os animais receberam diariamente ração comercial para coelhos e água a vontade. O uso destes animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/Unicamp), Protocolo n°2508-1.

As cobaias usadas eram machos, de 30-60 dias, obtidas sem histórico de infestação com carrapatos, contato com acaricidas ou antibióticos. Os animais foram alimentados com ração comercial para roedores, capim e água a vontade. Durante o período experimental, as cobaias foram mantidas em sala isoladas dos outros animais e em gaiolas individuais. O uso destes animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA/Unicamp), Protocolo n°2795-1.

3.2.2 Procedimentos: Primeira etapa

Lotes de *O. mimon* não infectados por *Rickettsia rickettsii* foram formados para serem utilizados na segunda etapa. Os indivíduos provenientes desta colônia formaram os seguintes grupos: larvas (G1), ninfas 2 (G2) e adultos (G3), machos e fêmeas.

3.2.3 Segunda etapa

Alíquotas de sangue intracardíaco dos coelhos foram obtidas no dia “zero” da infecção e novamente trinta dias após, para a pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii*. Os coelhos foram sedados para retirada do sangue. Os soros foram acondicionados em criotubos de 2 ml de capacidade, rotulados e mantidos em freezer a -20°C até o processamento das alíquotas.

Dois coelhos (coelho 1 e coelho 2) foram inoculados por via subcutânea com 1 ml de células infectadas com *R. rickettsii* cepa Taiacu (Pinter & Labruna, 2006) e um coelho foi mantido como controle (coelho 3) sem qualquer tipo de exposição à bactéria.

Após a inoculação a temperatura retal foi aferida duas vezes ao dia até o animal apresentar pico febril (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 & Quesenberry (1997)). Além da temperatura retal os coelhos foram acompanhados diariamente até o aparecimento e recrudescimento da sintomatologia característica: edema e necrose da pele da bolsa escrotal. A inapetência e diarreia também foram observadas.

Após o primeiro pico febril o coelho 1 e coelho 2 receberam 993 e 994 larvas (G1) respectivamente. Lotes de ninfas 2 (G2) foram formados e colocados para se alimentarem nos coelhos infectados (coelho 1 e coelho 2) no segundo, terceiro e quarto dia após o aparecimento da febre. Cada coelho recebeu 160 ninfas 2 (G2) em cada dia, totalizando 480 ninfas 2 alimentadas em cada coelho que foi infectado.

O coelho 1 e o coelho 2 também foram infestados com casais de adultos (G3) no segundo e terceiro dia após o aparecimento da febre, onde cinco casais foram colocados para se alimentar em cada coelho por dia. O coelho controle (coelho 3) recebeu 857 larvas, dois lotes de 100 ninfas 2, onde cada lote foi colocado para se alimentar em dias diferentes; e dois lotes de seis casais de adultos, também colocados para infestação em dias diferentes.

A fase parasitária dos carrapatos foi realizada sob condições não controladas de temperatura e umidade. A infestação dos coelhos foi feita utilizando-se câmaras para alimentação artificial nos animais. Para colagem da câmara cada coelho foi anestesiado com a utilização de Cloridrato de Xilazina 2% (2mg/pv) e Cloridrato de Ketamina 1% (20mg/pv), associada na mesma seringa e inoculado subcutâneo.

Após a sedação, foi realizada tricotomia no animal nas orelhas (para alimentação das larvas) e na região dorsal (para alimentação de ninfas e adultos) com máquina de tosar. A pele foi esterilizada com éter absoluto para a colagem da câmara para alimentação artificial, confeccionada com tecido do tipo Brim. O tecido possuía forma afunilada com 15,5 cm de comprimento e 10,5 cm de largura com duas aberturas; a abertura inferior com diâmetro de sete

centímetros e uma bainha ao redor de cinco centímetros, colada com Brascoplast® na pele do animal. No dorso foram colados dois coletores universais com o fundo cortado, um foi utilizado para alimentação das ninfas e o outro para alimentação dos adultos (Figura 1).

A câmara de alimentação fixada nas orelhas de cada coelho foi aberta diariamente para coleta das larvas ingurgitadas que se desprenderam naturalmente (Figura 2). Formaram-se lotes, de acordo com o dia em que as larvas foram coletadas da câmara, que foram acondicionados em tubos plásticos, fechados com tecido voal e transferidos para uma incubadora BOD a 26°C e $\geq 90\%$ UR. Após sofrerem ecdise, amostras foram feitas para realização da PCR.

A alimentação das ninfas e adultos dura alguns minutos, portanto, elas foram colocadas para infestar o coelho e observadas até se desprenderem naturalmente, logo após foram transferidas para a incubadora como descrito para as larvas (Figuras 3 e 4).

Cada grupo experimental, que foi formado, seguiu com o próximo estágio de vida do carrapato isoladamente dos demais grupos, tomando-se o extremo cuidado em nunca misturar os carrapatos de um grupo com os outros. Os carrapatos do grupo controle foram sempre manipulados em primeiro lugar, como medida extra de segurança.

3.2.4 Terceira etapa

Nesta etapa foi realizada a alimentação dos carrapatos do G1 (larvas) e G2 (ninfas 2) oriundos da segunda etapa, após sofrerem ecdise (Figuras 5 e 6). As larvas oriundas do G3 (adultos) formaram um novo grupo G4, que foram submetidas a PCR para verificar se houve transmissão transovariana.

Cada coelho (coelho 1, coelho 2 e coelho 3) da segunda etapa gerou seis lotes de larvas ingurgitadas (G1) que se desprenderam (um lote para cada dia), totalizando 18 lotes. Após a ecdise, juntou-se os seis lotes do coelho 1, formando três lotes; o mesmo foi feito com os lotes do coelho 2, onde formou-se três lotes; para o coelho 3 (controle) juntou-se os seis lotes e formou apenas um. Portanto, para alimentação das ninfas 1 foram necessários sete coelhos, três coelhos para os lotes do coelho 1, três para os lotes do coelho 2 e um para o lote do coelho 3.

Para alimentação das ninfas 3 (G2) que foram obtidas de coelhos infectados, foram utilizados quatro coelhos saudáveis. As ninfas 3 que infestaram o coelho controle (segunda etapa) não foram alimentadas novamente.

Uma amostra de sangue intracardíaco de cada coelho foi retirada antes da infestação com os carrapatos e 30 dias depois, para verificação de anticorpos anti-*Rickettsia rickettsii* através da Reação de Imunofluorescência Indireta. Os coelhos foram sedados para retirada do sangue. Os soros foram acondicionados em criotubos de 2 ml de capacidade, rotulados e mantidos em freezer a -20°C até o processamento das alíquotas. A fase parasitária e o acondicionamento dos carrapatos foram realizados do mesmo modo que descrito na segunda etapa.

A temperatura retal dos coelhos foi aferida a partir do sétimo dia (após a infestação com carrapatos alimentados em coelhos infectados) até o décimo quinto dia, para verificar o aparecimento de febre, principal sintoma da infecção.

Os lotes do G1 foram separados em amostras para realização da PCR, onde foram submetidos ao teste tanto as ninfas que se tornaram ninfas 2, quanto as que não se alimentaram e continuaram sendo ninfas 1.

Os lotes do G2 foram divididos: metade de cada lote que não se alimentou (ninfas 3) foram separadas em amostras e realizado a PCR; a outra metade foi colocada para se alimentar em novos coelhos saudáveis e foi realizado todo processo como descrito com os carrapatos do G1. Após a ecdise os lotes de ninfas 4 foram separados em amostras para realização da PCR. A figura 7 mostra como foi dividido os lotes nos coelhos.

Os carrapatos foram acompanhados até o final de março de 2012. Porém, mesmo após o término da observação diária, os mesmos foram mantidos na estufa como citado anteriormente, até a realização da PCR.

Ao final de cada etapa do experimento os coelhos foram eutanasiados de acordo com a Resolução nº 714 do Conselho Federal de Medicina Veterinária (CFVM). Tal Resolução preconiza a eutanásia em coelhos por meio de aprofundamento de anestesia (Cloridrato de Ketamina e Cloridrato de Xilazina), até o animal perder o reflexo palpebral, logo após injetou-se T-61 via cardíaca.

As carcaças de todos os animais foram descartadas em lixo especial, onde o próprio Município coleta e toma as medidas necessárias.

3.2.5 Teste de imunofluorescência indireta

As amostras de sangue foram coletadas, rotuladas, centrifugadas a 1,500g por 10 minutos e os soros foram mantidos no freezer. Cada amostra foi processada conforme técnica de imunofluorescência indireta descrita por Souza *et al.* (2008, 2009), com a utilização de lâminas com 12 orifícios, que foram marcadas com o antígeno para *Rickettsia rickettsii* e armazenadas em freezer a -20°C. Antes da sua utilização foram descongeladas em imersão em um tampão salino de fosfato (PBS) por 10 minutos, secando naturalmente.

Após o descongelamento, os soros foram diluídos em PBS inicialmente a 1:64, e os soros reativos foram diluídos até chegar à titulação máxima. Feito isso, foi inserido em cada orifício 20µL dos soros e as lâminas foram incubadas em câmara úmida em estufa bacteriológica a 37°C durante o período de 30 minutos. Em seguida, foram lavadas com tampão de lavagem e secas naturalmente.

Dando sequência ao processo, foi utilizado um conjugado anti-coelho de acordo com Souza *et al.* (2008), que foi diluído na proporção de 1:256 em PBS e colocado 20µL nos orifícios das lâminas que foram incubadas novamente, utilizando-se o processo acima descrito.

Em seguida as lâminas foram lavadas com tampão de lavagem e simultaneamente coradas com azul de Evans com dois banhos de 15 minutos cada e secas naturalmente. Após todo este procedimento, foram montadas utilizando-se glicerina tamponada e cobertas por lamínula. A leitura foi realizada em microscópio de fluorescência a luz ultravioleta com aumento de 40 vezes. Foram considerados reagentes os orifícios que apresentaram pontos fluorescentes mais ou menos uniforme com formas cocóides, bacilares ou cocobacilares.

3.2.6 Análises moleculares

Amostras de carrapatos de cada lote (alimentados nos coelhos da segunda e terceira etapa, tanto dos tratamentos quanto do controle) foram submetidas à extração de DNA utilizando o Kit Dneasy (Qiagen, Chatsworth, EUA), segundo o protocolo do fabricante para o isolamento de DNA de sangue de animais ou tecidos.

Os carrapatos foram separados em pools, onde foram colocadas por amostra 5 ninfas 1 e 5 ninfas 2 (G1); 6 ninfas 3 e 2 ninfas 4 (G2); 5 adultos (G3); e 8 larvas (G4).

As larvas foram maceradas inteiras; já as ninfas e os adultos foram cortados ao meio com lâminas de gilete para facilitar a ação dos reagentes para a extração, antes de serem macerados. A lâmina usada em cada amostra foi descartada para não contaminar outras amostras.

O DNA extraído foi amplificado por meio da PCR (utilizando-se um kit comercial PCR Master Mix(Qiagen®)). Foi utilizado primeiramente um par de primers que amplificam um fragmento da sequência do gene *gltA* codificador da enzima citrato sintase e posteriormente outro par de primers que amplificam parte da sequência do gene *sca0* que codifica a proteína de membrana (*ompA*) (Tabela 1).

O seguinte protocolo de amplificação foi realizado para os primers *gltA* (citrato sintase - CS) e *ompA*: 95°C por 15 minutos para ativação da Taq DNA polimerase; seguido de 35 ciclos para desnaturação da fita a 94°C por 35 segundos; anelamento a 57°C por 40 segundos; extensão a 72°C por 45 segundos e finalmente uma etapa de 72°C por 7 minutos para permitir a extensão completa da fita, as amostras permaneceram à 14°C até a retirada das mesmas do termociclador. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corados por GELRED, e observados em luz ultravioleta. O marcador de peso molecular ladder com 100 pares de bases (pb) da Invitrogen foi utilizado para comparar com os amplicons.

Um gradiente de temperatura com o primer *ompA* foi realizado para verificar em qual temperatura de anelamento era obtido o melhor resultado para as amostras da PCR, com maior especificidade. Dentre as temperaturas de anelamento testadas (53,1°C; 53,6°C; 55,2°C; 57,4°C; 59,5°C e 61,0°C) concluiu-se que 55,2°C foi a mais eficiente, pois somente até esta temperatura os controles positivos foram amplificados, então para garantir a especificidade foi repetido a PCR

com a maior temperatura. Sendo assim, as amostras de 1-50 foram testadas com temperatura de anelamento a 55,2°C com o primer *ompA*.

Após ser realizado a PCR das amostras foi feito a purificação com amostras amplificadas com o primer *ompA*, utilizando um reagente chamado ExoSAP, que degrada o que sobrou da reação deixando somente o DNA alvo. O seguinte protocolo foi utilizado: o produto da PCR foi misturado com o reagente, em seguida a mistura foi incubada a 37°C durante 15 minutos em um termociclador e aquecida a 80°C durante 15 minutos ainda no termociclador. Após estes passos o DNA foi usado para fazer o sequenciamento.

Após a purificação do produto da PCR, o DNA amplificado foi submetido ao sequenciamento realizado pelo método de Sanger com o kit ABI PRISM® BigDye™ Primer.

3.2.7 Preparação e inoculação de macerado de carrapato em Cobaia

Macerado de quatro ninfas 2, do lote originárias do G1 que haviam se alimentado no coelho 1 (coelho infectado com *R. rickettsii*), foi inoculado em duas cobaias.

Os quatro carrapatos foram mantidos em estufa a 32°C durante 3 horas, para o aumento do metabolismo de possíveis *Rickettsia* presentes no seu organismo. Os indivíduos foram macerados com uma ponteira em um Eppendorf com solução estéril. Adicionou-se 2 ml de solução e 1 ml foi injetado intraperitonealmente em cada cobaia.

As cobaias foram anestesiadas com a utilização de Cloridrato de Xilazina 2% (10mg/pv) e Cloridrato de Ketamina 1% (60mg/pv), associada na mesma seringa e inoculado intramuscular. Após a inoculação a temperatura das cobaias foi aferida uma vez por dia durante 15 dias e foram observados os sintomas característicos da doença.

3.2.8 Infestação em cobaia

Uma cobaia foi infestada com ninfas 2, do lote originárias do G1 que haviam se alimentado no coelho 2 (coelho infectado com *R. rickettsii*).

A fase parasitária dos carrapatos foi realizada sob condições não controladas de temperatura e umidade. A infestação foi feita utilizando-se coletor universal pequeno com o fundo cortado. A cobaia foi anestesiada conforme descrito para as cobaias inoculadas com o macerado. Após a sedação, foi realizada tricotomia no animal na região dorsal, a pele foi esterilizada com éter absoluto para a colagem do coletor, com cola, para alimentação artificial.

Após o término da alimentação, os carrapatos foram mantidos na incubadora BOD, a 26°C, $\geq 90\%$ UR. Após cinco dias da infestação, a temperatura da cobaia foi aferida uma vez por dia durante 10 dias e os outros sintomas da doença foram observados.

3.3 RESULTADOS

Os coelhos 1 e 2 (primeira etapa) apresentaram pico febril no sexto dia após a inoculação, a temperatura persistiu por 10 e 9 dias, respectivamente, em dias alternados. Os coelhos apresentaram aumento da temperatura, sintoma característico da doença. Já a temperatura retal do coelho controle permaneceu sempre inferior a 39,9°C, mantendo-se dentro dos níveis normais (Figura 8).

Coelhos que foram infestados com ninfas 1 e ninfas 3 que foram alimentados no coelho infectado, não apresentaram aumento na temperatura, com exceção de um animal que teve aumento em dois dias (Figuras 9 e 10). Porém, nenhum dos coelhos apresentou outro sintoma da doença.

3.3.1 RIFI

Todas as amostras de soro, dos coelhos que foram inoculados com a cepa de *R. rickettsii* (segunda etapa), colhidas antes da inoculação se mostraram negativas. No entanto, a amostra colhida após 30 dias da inoculação do coelho 1 apresentou titulação 1:16384, já o coelho 2 morreu 16 dias após a inoculação.

Todos os coelhos infestados com carrapatos que tiveram contato com a bactéria e o coelho controle apresentaram resultado negativo tanto na primeira amostra sanguínea quanto na segunda amostra retirada 30 dias após a infestação.

3.3.2 Análises moleculares

As 99 amostras de lotes de carrapatos alimentados em diferentes coelhos foram separados para realização da PCR. Com o primer *gltA* foi feita a amplificação do DNA com as amostras de 1-48, porém somente uma amostra deu positivo para *Rickettsia* sp., sendo que os carrapatos desta amostra foram alimentados no coelho 1 quando eram larvas, porém a PCR foi feita quando estes estavam no segundo estágio de ninfa.

As amostras de 1-48 também foram testadas com o primer *ompA* (temperatura de anelamento: 57°C), onde somente uma amostra apresentou resultado negativo. Dentre as positivas quatro amostras eram do coelho controle e não era esperado que apresentasse resultado positivo. As amostras de 41-48 foram testadas novamente, e o mesmo resultado foi observado. Realizou-se, então, a amplificação com as amostras de 49-60 que não haviam sido testadas com este primer, demonstrando ter quatro amostras negativas e oito positivas, porém dessas positivas sete haviam se alimentado no coelho controle.

As amostras de 1-50 foram testadas com o primer *ompA*, com temperatura de anelamento de 55,2°C. Destas 10 foram negativas e 40 positivas, onde quatro dessas positivas eram de carrapatos alimentados em coelho controle.

3.3.3 Cobaias

A temperatura das duas cobaias, que foram inoculadas com macerado de carrapatos alimentados em coelhos infectados com cepa de *R. rickettsii*, foi aferida durante 15 dias, os animais não apresentaram febre e nenhum outro sintoma da doença. A cobaia que foi infestada com um lote de carrapatos faleceu após 21 dias da infestação, porém não houve nenhuma

evidência de que o animal estivesse doente, pois não apresentou febre ou nenhum outro sintoma da doença (Figura 11).

3.4 DISCUSSÃO

Os coelhos inoculados com a bactéria *R. rickettsii* apresentaram febre no sexto dia após a inoculação. O coelho 1 apresentou titulação de 1:16384, enquanto o coelho 2 morreu durante o curso do experimento e não teve a segunda amostra colhida. Segundo Foot (1919) coelhos que foram inoculados intraperitonealmente com *R. rickettsii* apresentaram elevação da temperatura no quinto e sexto dia, mantendo-se por quatro a sete dias. Além de apresentarem pelagem áspera, perda de apetite, apatia, testículos e escrotos congestionados e inchados, às vezes, apresentaram edema e necrose. Freitas *et al.* (2009) observaram que coelhos que foram inoculados com a bactéria tiveram febre após 2-5 dias, esses coelhos apresentaram titulação de 1:1024 após 30 dias da inoculação.

Nos coelhos que foram infestados com carrapatos que tiveram contato com a bactéria nenhum sintoma foi observado. Em um trabalho realizado por Foot (1919) um coelho infestado com carrapatos infectados (*Dermacentor venustus* Marx 1892) apresentou febre seis dias após a infestação, onde a temperatura se manteve elevada por cinco dias. Os sintomas no animal incluíram inchaço nos testículos e escroto. Os tecidos, particularmente dos testículos, baço e pele mostraram lesões típicas da doença.

Como padrão ouro para diagnóstico das riquetsioses a reação de imunofluorescência indireta (RIFI) é recomendada pela Organização Mundial da Saúde. Essa técnica utiliza antígenos espécie-específica de *Rickettsia*, onde a detecção de IgM é forte evidência de uma riquetsiose ativa. Os anticorpos IgG são detectados cerca de uma semana após o início da doença, onde são específicos dentro do biogrupo e podem perdurar por até quatro anos (Galvão *et al.*, 2005).

O resultado da RIFI utilizando soro do coelho que foi inoculado com a cepa de *Rickettsia* mostra que o coelho se tornou infectado, demonstrando que houve circulação sistêmica de bactérias (período de riquetsemia). Em trabalho realizado por Freitas *et al.* (2009) a espécie de carrapato *Haemaphysalis leporispalustris* Packard 1869, foi alimentada em coelhos que foram

infectados com *R. rickettsii* e depois foram colocados para se alimentar em coelhos não infectados. Amostras de sangue colhidas desses coelhos foram inoculadas em cobaias que apresentaram febre e lesão no escroto, demonstrando assim que os carrapatos adquiriram a bactéria ao se alimentarem em coelhos infectados.

A cobaia utilizada neste estudo, para alimentação de ninfas alimentadas em coelho infectado, não demonstrou nenhum sintoma da doença, ou seja, as ninfas 2 não estavam infectadas com a bactéria. Espécies de argasídeos como *O. parkeri* Cooley 1936 e *O. nicollei* Mooser 1932 ao se infectarem com *Rickettsia* no estágio de ninfa transmitiram a bactéria para cobaias através da alimentação, além de transmitirem transovariamente ao se tornarem adultos (Burgdorfer & Varma, 1967).

A capacidade do carrapato de se tornar infectado com *R. rickettsii* pode depender da concentração de rickettsias ingeridas. Carrapatos imaturos de *Dermacentor andersoni* que se alimentaram em cobaias infectadas tiveram diferentes taxas de infecção, dependendo se o carrapato se ingurgitou durante o estágio inicial ou final da doença (Burgdorfer *et al.*, 1966).

Gunders *et al.* (1979) alimentaram diferentes espécies de *Ornithodoros*, em diferentes estágios, em *Psammomys obesus* Cretzschmar 1828 infectados com *Rickettsia*, onde três eram *O. erraticus* Lucas 1849 idênticos exceto pelo local de origem. Os carrapatos foram colocados para se alimentarem em roedores não infectados, em diferentes períodos após a primeira alimentação. O resultado demonstrou que apenas um local apresentou cepa capaz de transmitir *Rickettsia*, isto indica que embora sejam idênticos morfológicamente deve haver diferenças fisiológicas entre eles.

A espécie *Ornithodoros rostratus* Aragão 1911 é capaz de transmitir *R. rickettsii* e a espécie *O. lahorensis* Neumann 1908 pode ser infectado experimentalmente com a *R. sibirica* (Estrada-Peña e Jongejan, 1999). As espécies *O. parkeri* Cooley 1936 e *O. rostratus* foram infectados com *R. rickettsii* e demonstraram serem capazes de transmitir a bactéria para hospedeiros em laboratório (Socolovschi *et al.*, 2012). Apesar da capacidade vetorial diversificada de rickettsias em argasídeos, relatos de *Ornithodoros* naturalmente infectados são bastante limitadas (Cutler *et al.*, 2006).

A espécie *O. moubata* Murray 1877, vetor da febre recorrente, foi encontrada recentemente infectada com uma nova *Rickettsia*, que foi detectada através da PCR, levantando a questão se este carrapato também é vetor para espécies de rickettsias patogênicas (Mattila *et al.*, 2007).

Na espécie *O. turicata* Duges 1876 a bactéria *R. rickettsii* se manteve por um longo período (860 dias) após infecção experimental, porém o carrapato não foi capaz de transmitir através da alimentação ou transovariamente (Burgdorfer & Varma, 1967). O mesmo foi observado por McDade & Newhouse (1986) onde a bactéria se manteve por mais de dois anos, porém não houve transmissão. Portanto, a *R. rickettsii* não pode infectar os ovários e glândulas salivares deste carrapato.

Segundo Hoogstraal (1967) a espécie *O. rostratus* transmitiu a *R. rickettsii* após 13 dias da inoculação, mas não após 28 dias, já *O. turicata* manteve a bactéria por 28 meses em seu corpo, porém foi incapaz de transmitir durante alimentação. Fêmeas de *Rhipicephalus sanguineus* Latreille 1806 não transmitiram a *R. rickettsii* transovariamente, pois não houve tempo para a bactéria se desenvolver no ovário, porém a colonização no ovário ocorreu quando fêmeas foram alimentadas no estágio de larva ou ninfa, sendo capazes de transmitir a bactéria para seus ovos (Piranda *et al.*, 2011).

Segundo Rehacek (1965) a transmissão da *Rickettsia* para hospedeiros vertebrados é realizada, na maioria dos casos, através da picada. Porém, nos carrapatos de corpo mole a transmissão é através da eliminação do agente através do fluido coxal. A transmissão transovariana e transestadial da bactéria *R. rickettsii* é eficiente, porém a bactéria é patogênica para carrapatos, por isso possui baixa prevalência de vetores naturalmente infectados. A prevalência em *Amblyomma cajennense* Fabricius 1787 (principal vetor no Brasil) varia de 0,05 a 1,3% (Freitas *et al.*, 2009).

A espécie *O. mimon* não se tornou infectado com a bactéria através da alimentação. Já a espécie *O. moubata* foi descrita sendo naturalmente infectada com *Rickettsia* sp. na África, onde se alimentavam em humanos, porém nenhuma evidência do DNA rickettsial foi detectado nas amostras de humanos onde os carrapatos infectados foram encontrados, demonstrando não serem capazes de transmitir a bactéria, como relatou Cutler *et al.* (2006). Em estudo realizado por Socolovschi *et al.* (2012), verificou-se que a espécie *O. papillipes* Birula 1895 se alimentou em

cobaias infectadas com a *R. sibirica* e foram capazes de transmitir verticalmente a bactéria, porém não transmitiram para hospedeiros vertebrados. Porém, outros tipos de bactérias podem ser transmitidos por argasídeos, como por exemplo, na África a *Borrelia* pode ser transmitida aos seres humanos (Jongejan e Uilenberg, 2004).

Um fator que pode levar a espécie *O. mimon* a não se tornar infectado com a bactéria é a rápida alimentação sanguínea, não tendo tempo suficiente para ingerir a bactéria. O curto período de alimentação apresentada por carrapatos de corpo mole pode ser uma adaptação para não se exporem a condições externas desfavoráveis. Por este motivo soltam rapidamente do hospedeiro e vão em busca de um parceiro sexual rapidamente. Isso pode resultar numa baixa dispersão e em uma distribuição limitada de espécies de carrapatos moles e seus patógenos (Sonenshine, 1993).

A longa alimentação dos carrapatos de corpo duro pode ser uma vantagem para o estabelecimento de infecções, diferente dos carrapatos de corpo mole que se alimentam rapidamente. A transmissão de *Rickettsia* em argasídeos através da picada é na sua maior parte sem êxito, devido à ausência da penetração da bactéria pela parede do intestino e da insuficiência para infectar as glândulas salivares e coxal (Rehacek, 1965).

A capacidade do carrapato se tornar infectado com *R. rickettsii* pode depender da concentração de rickettsias ingeridas. Carrapatos imaturos de *Dermacentor andersoni* Stiles 1908 que se alimentaram em cobaias infectadas tiveram diferentes taxas de infecção, dependendo se o carrapato se ingurgitou durante o estágio inicial ou final da doença (Burgdorfer *et al.*, 1966).

Portanto, os coelhos que foram inoculados apresentaram febre e titulação positiva na RIFI, demonstrando assim que tiveram período de riquetsemia. Porém, a espécie *O. mimon* mostrou ser incapaz de se infectar com a *R. rickettsii* e, por isso, não transmitiram a novos hospedeiros.

3.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Azad, A. F.; Beard, C. B. 1998. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerging Infectious Diseases** 4 (2):179-196.
- Burgdorfer, W.; Friedhoff, K. T.; Lancaster JR., J. L. 1966. Natural history of tick-borne spotted fever in the USA. **Bulletin of the World Health Organization** 35:149-153.
- Burgdorfer, W.; Varma, M. G. R. 1967. Trans-stadial and transovarial development of disease agents in arthropods. **Annual Review of Entomology** 12:347-376.

- Cutler, S. J.; Browning, P.; Scott, J. C. 2006. *Ornithodoros moubata*, a soft tick vector for *Rickettsia* in East Africa. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1078:373-377.
- Estrada-Peña, A.; Jongejan, F. 1999. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting *Ixodoidea* with special reference to pathogen transmission. **Experimental and Applied Acarology** 23:685-715.
- Foot, N. C. 1919. Rocky Mountain Spotted Fever in the domestic rabbit. **Journal of Medical Research** 39:495-507.
- Freitas, L. H. T.; Faccini, J. L. H.; Labruna, M. B. 2009. Experimental infection of the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris*, with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, and comparative biology of infected and uninfected tick lineages. **Experimental and Applied Acarology** 47:321-345.
- Galvão, M. A.; Silva, L. J.; Nascimento, E. M. M.; Simone, C. B.; Sousa, R.; Bacellar, F. 2005. Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. **Revista de Saúde Pública** 39 (5):850-856.
- Gunders, A. E.; Gottlieb, D.; Goldberg, Z. 1979. Transmission of a *Rickettsia* of *Psammomys obesus* by of *Ornithodoros*. **Refuah Veterinarith** 36 (1):13-15.
- Hillyer, E. V.; Quesenberry, K. E. 1997. **Ferrets, rabbits and rodents. Clinical medicine and surgery**. 1^a ed. Saunders, 432p.
- Hoogstraal, H. 1967. Ticks in relation to human diseases caused by *Rickettsia* species. **Annual Review of Entomology** 12:377-420.
- Jongejan, F.; Uilenberg, G. 2004. The global importance of ticks. **Parasitology** 129:S3-S14.
- Labruna, M. B.; Whitworth, T.; Horta, M. C.; Bouyer, D. H.; McBride, J. W.; Pinter, A.; Popov, V.; Gennari, S. M.; Walker, D. H. 2004. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology** 42 (1): 90-98.
- Manzano-Román, R.; Díaz-Martín, V.; Fuente, J.; Pérez-Sánchez. 2012. Soft ticks as pathogen vectors: distribution, surveillance and control. **Parasitology** 125-162.
- Mattila, J. T.; Burkhardt, N. Y.; Hutcheson, H. J.; Munderloh, U. G.; Kurtti, T. J. 2007. Isolation of cell lines and a *Rickettsial* endosymbiont from the soft tick *Carios capensis* (Acari: Argasidae: Ornithodorinae). **Journal of Medical Entomology** 44 (6):1091-1101.
- McDade, J. E.; Newhouse, V. F. 1986. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. **Annual Review of Microbiology** 40:287-309.
- Pinter A., Labruna M. B. 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1078:523-530.
- Piranda, E. M.; Faccini, J. L. H.; Pinter, A.; Pacheco, R. C.; Cançado, P. H. D.; Labruna, M. B. 2011. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. **Vector-borne and zoonotic diseases** 11 (1):29-36.
- Regnery, R. L.; Spruill, C. L.; Plikaytis, B. D. 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecific sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology** 173 (5): 1576-1589.
- Rehacek, J. 1965. Development of animal viruses and Rickettsiae in ticks and mites. **Annual Review of Entomology** 10:1-24.
- Socolovschi, C.; Kernif, T.; Raoult, D.; Parola, P. 2012. *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* species in bat ticks, France, 2010. **Emerging Infectious Diseases** 18 (12):1966-1975.

- Sonenshine, D. E. 1993. Ecology of nidicolous ticks. *In: **Biology of ticks.*** Vol. 2. Oxford University Press, New York, 465p.
- Souza, C. E.; Souza, S. S. L.; Lima, V. L. C.; Calic, S. B.; Camargo, C. G. O.; Savani, E. S. M. M.; D'Auria, S. R. N.; Linhares, A. X.; Yoshinari, N. H. 2008. Serological identification of *Rickettsia* spp from the spotted fever group in capybaras in the region of Campinas - SP – Brazil. **Revista Ciência Rural** 38 (6):1694-1699.
- Souza, C. E.; Moraes-Filho, J; Ogrzewalska, M.; Uchoa, F. C.; Horta, M. C.; Souza, S. S. L.; Borba, R. C. M. Labruna, M. B. 2009. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology** 16 (1):116-121.
- Walker, D. H.; Harrison, A.; Henderson, F.; Murphy, F. A. 1977. Identification of *Rickettsia rickettsii* in a Guinea Pig Model by Immunofluorescent and Electron Microscopic Techniques. **American Journal of Pathology** 88(2):343-352.

Figura 1 – Câmara de alimentação colocada em coelho para infestação com larvas, ninfas e adultos de *O. mimon*, fixadas nas orelhas para alimentação das larvas e no dorso para alimentação de ninfas e adultos.



Figura 2 – Fluxograma das infestações com larvas de *Ornithodoros mimon*. GC= Grupo Controle; G1* = grupo que teve contato com a *Rickettsia rickettsii* na fase de larva.

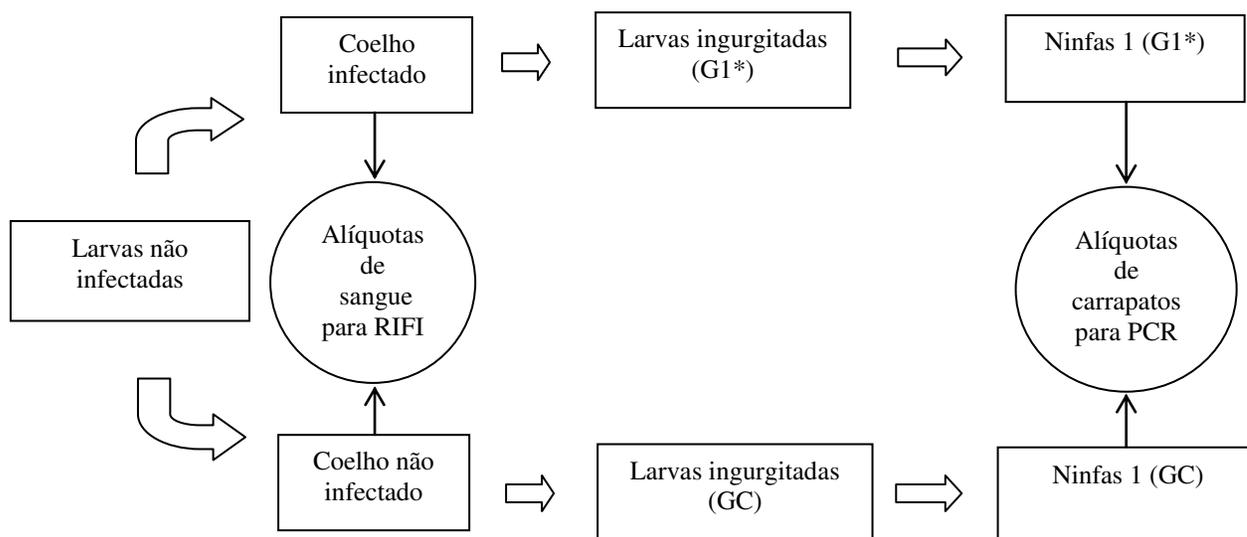


Figura 3 – Fluxograma das infestações com ninfas 2 de *Ornithodoros mimon*. GC= Grupo Controle; G2* = grupo que teve contato com a *Rickettsia rickettsii* na fase de ninfa de segundo estagio.

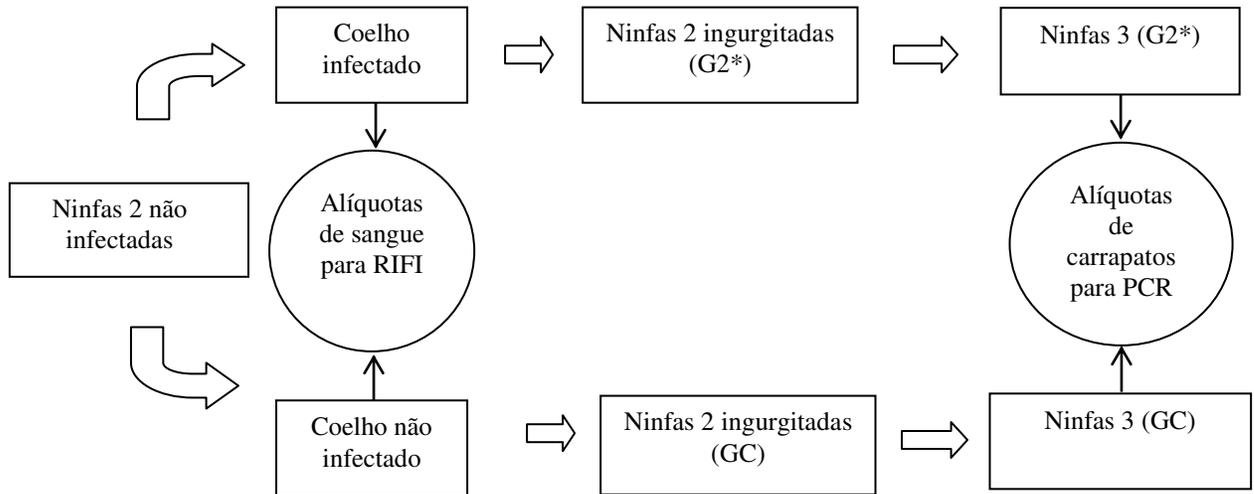


Figura 4 – Fluxograma das infestações com adultos de *Ornithodoros mimon*. GC= Grupo Controle; G3* = grupo que teve contato com a *Rickettsia rickettsii* na fase adulta e G4 = grupo oriundo dos adultos que tiveram contato com a bactéria.

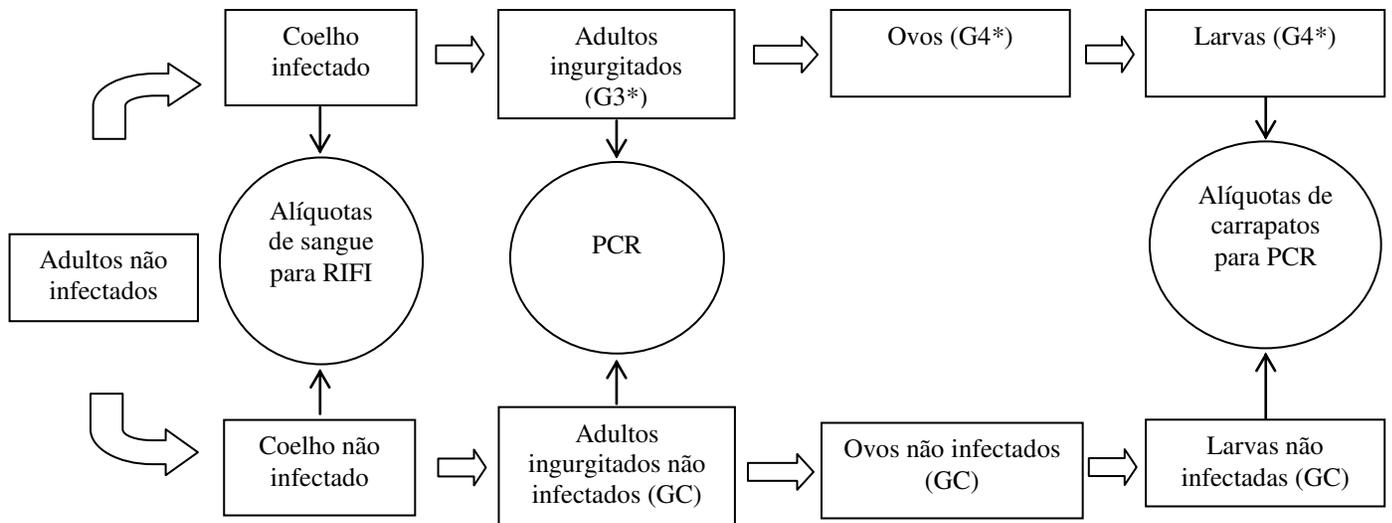


Figura 5 – Fluxograma das infestações com ninfas 1 de *Ornithodoros mimon*, oriundos da segunda etapa. GC= Grupo Controle; G1* = grupo que teve contato com a *Rickettsia rickettsii*.

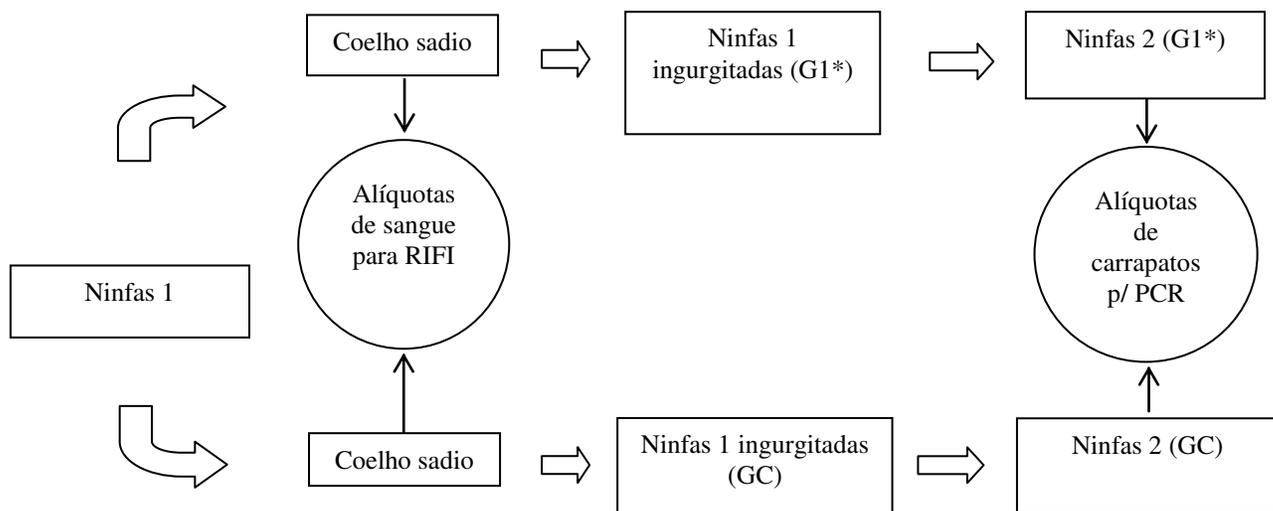


Figura 6 – Fluxograma das infestações com ninfas 3 de *Ornithodoros mimon*, oriundos da segunda etapa. G2* = grupo que teve contato com a *Rickettsia rickettsii*.

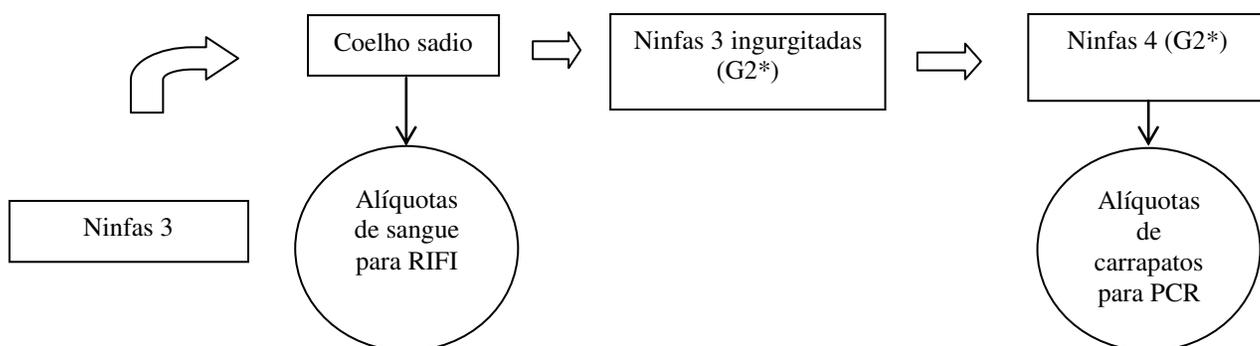


Figura 7 – Divisão dos lotes de carrapatos alimentados em diferentes coelhos. Os coelhos da segunda etapa foram usados em todos os grupos (G1, G2 e G3). Na terceira etapa foi utilizado um coelho sadio para cada lote.

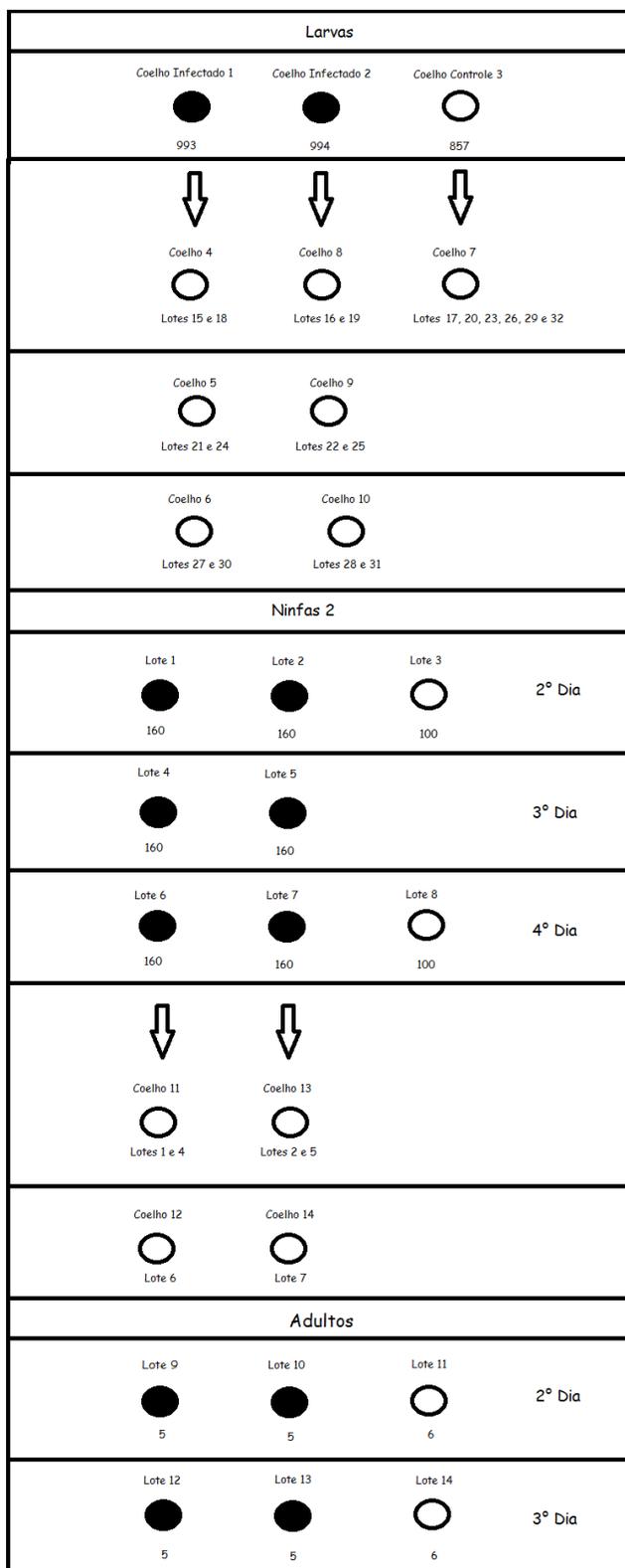


Tabela 1 – Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados nas reações de PCR.

Genes	Primers	Sequência dos primers (5' - 3')	Tamanho produzido (pb)	Referência
<i>gltA</i>	CS-78F	GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT		Labruna <i>et al.</i> (2004)
<i>gltA</i>	CS-323R	GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAG GAT		Labruna <i>et al.</i> (2004)
<i>ompA</i>	190.70F-A1	ATGGCGAATATTTCTCCAAAA	532	Regnery <i>et al.</i> (1991)
<i>ompA</i>	190.602R-A2	AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT	532	Regnery <i>et al.</i> (1991)

Figura 8 – Temperatura retal dos coelhos inoculados e controle (coelho 3 – não inoculado) a partir do dia em que foi inoculada a cepa da *Rickettsia rickettsii* – segunda etapa experimental.

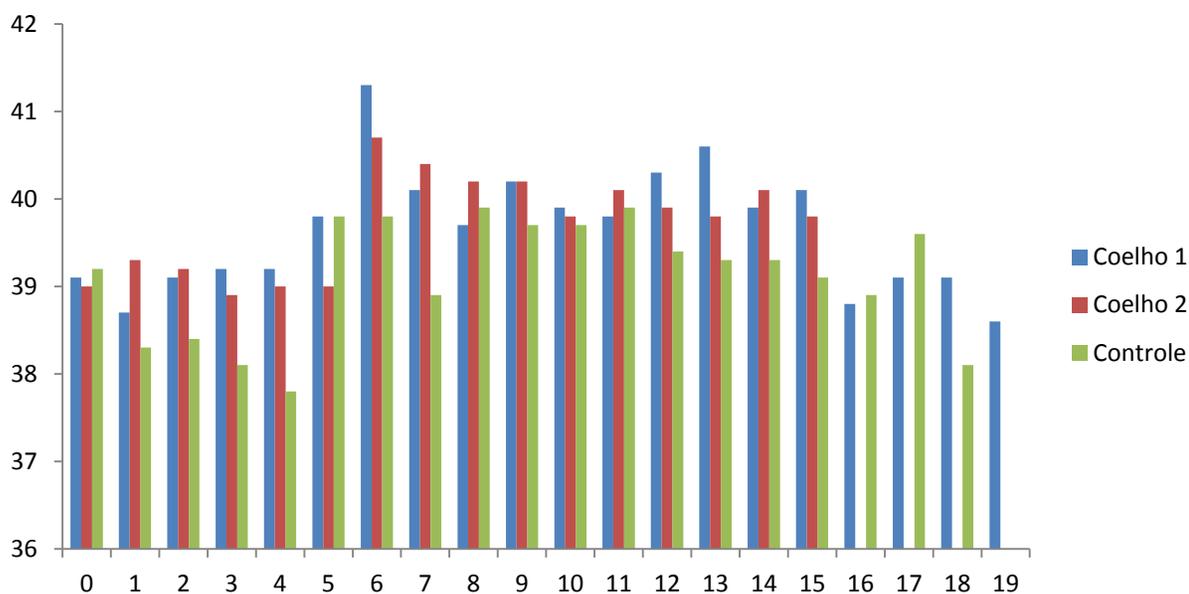


Figura 9 – Temperatura dos coelhos a partir do sétimo dia após a infestação com ninfas 1 de *O mimon* (controle – infestado com carrapatos que se alimentaram no coelho não inoculado).

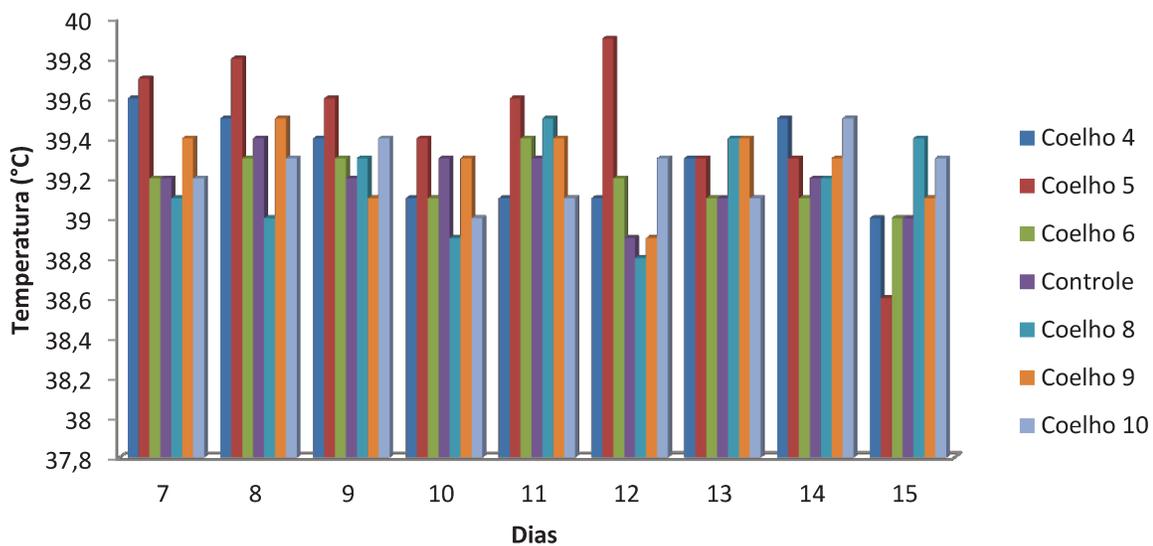


Figura 10 – Temperatura dos coelhos a partir do sétimo dia após a infestação com ninfas 3 de *O mimon*.

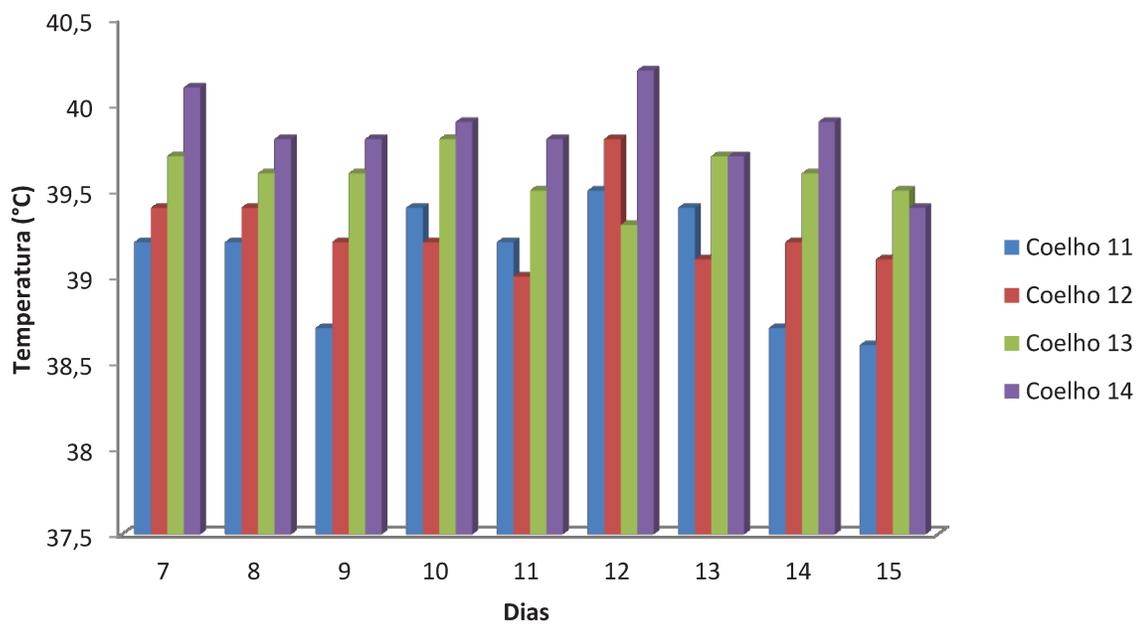
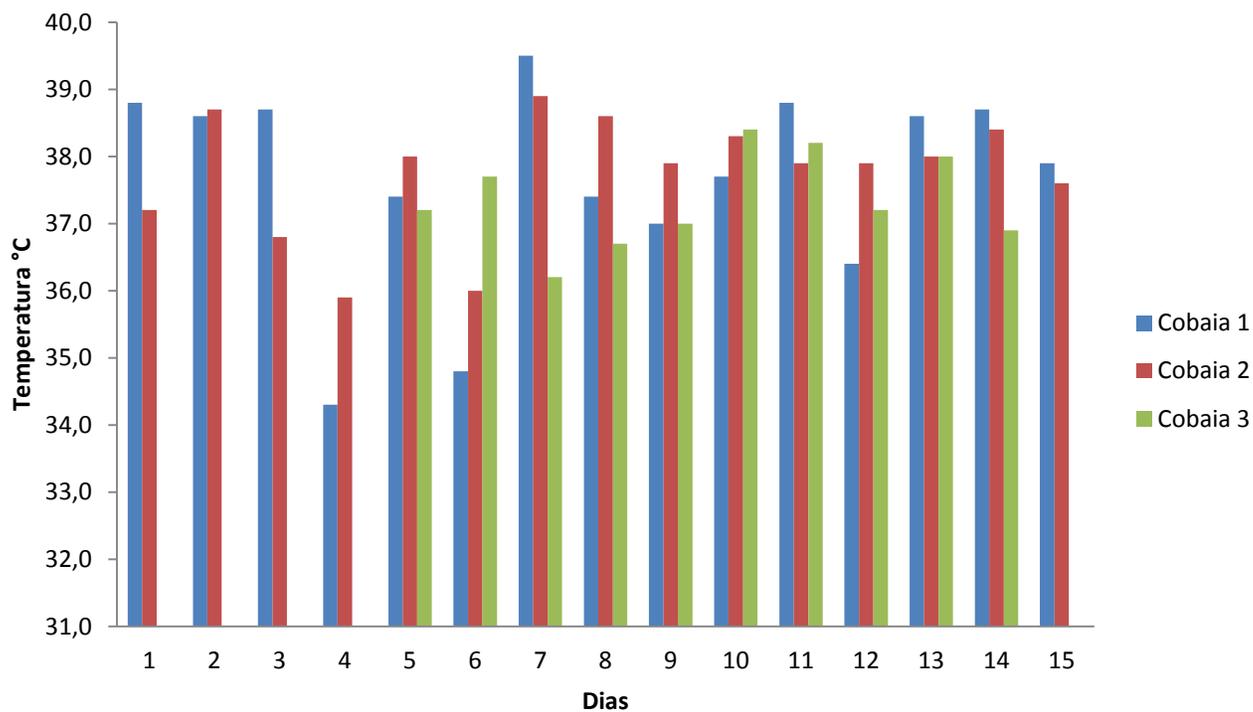


Figura 11 – Temperatura retal das cobaias que foram inoculadas com macerado de ninfas 2 de *O. mimon* (cobaias 1 e 2) e infestada com ninfas 2 de *O. mimon* (cobaia 3) que tiveram com contato com coelho infectado com *Rickettsia rickettsii*.



4. CAPÍTULO 2: Avaliação da transmissão de *Rickettsia rickettsii* Brumpt 1922 em larvas, ninfas 2 e adultos de *Ornithodoros mimon* Kohls 1969 (Acari: Argasidae) alimentados em coelho infectado e o efeito da infecção no seu desenvolvimento

RESUMO

A bactéria *Rickettsia rickettsii* Brumpt 1922 pode ser transmitida em várias espécies de carrapatos, porém sua prevalência em condições naturais é baixa, uma vez que pode ter influência negativa no desenvolvimento de seu vetor. Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito da bactéria *R. rickettsii* no desenvolvimento do *Ornithodoros mimon* Kohls 1969 em laboratório, bem como determinar a ocorrência da transmissão transovariana e transestadial neste carrapato. Lotes de carrapatos de diferentes estagios (larva, ninfa 2 e adulto) foram alimentados em dois coelhos que foram inoculados com cepa Taiacu de *Rickettsia rickettsii* e um coelho foi mantido como controle. Os carrapatos foram mantidos em incubadora após a alimentação e acompanhados até a conclusão da ecdise e oviposição. Após sofrer ecdise, os carrapatos foram alimentados em novos coelhos sadios. Logo após a alimentação, os carrapatos foram mantidos na incubadora e acompanhados até a conclusão da ecdise. Comparações entre a duração dos períodos de ecdise das larvas e ninfas, e oviposição dos adultos (infectadas vs não infectadas) foram feitas através de Análise de Variância (ANOVA) (Zar, 1999), usando o procedimento PROC GLM do pacote estatístico SAS®. Não houve diferença estatística significativa entre a proporção de larvas alimentadas e quantidade de larvas que sofreram ecdise entre as larvas alimentadas em coelho tratamento e controle, assim como a proporção de ninfas 2 alimentadas e quantidade que sofreram ecdise. Nos adultos, não houve diferença na quantidade de ovos por oviposição, quantidade total de ovos, período de pré-oviposição, período de oviposição, taxa de eclosão. Porém, houve diferença no número de ovos entre as fêmeas que se alimentaram em coelho infectado e coelho controle. Conclui-se que o desenvolvimento dos diferentes estagios de *Ornithodoros mimon* não foi afetado pela *Rickettsia rickettsii*.

ABSTRACT

The bacterium *Rickettsia rickettsii* Brumpt 1922 can be vertically transmitted in several species of ticks, but its prevalence in natural conditions is low as it can have a negative influence the development of the vector. Therefore, this work objectived to assess effect of the bacterium *R. rickettsii* on the development of *Ornithodoros mimon* Kohls 1969 in the laboratory as well as to determine the occurrence of transestadial and transovarial transmission in this tick. Batches of ticks in different stages (larva , nymph 2 and adult) were fed on two rabbits that had been inoculated with the Taiapu strain of *Rickettsia rickettsii* and a third rabbit was kept as a control. Ticks were kept in an incubator after being fed, and were followed until the completion of ecdysis and oviposition. After molting, the ticks were transferred to new healthy rabbits. After completing the blood meal, they were kept in an incubator and followed until the completion of ecdysis. Comparisons between the duration of molt of the larvae and nymphs, and oviposition of adults (Infected vs uninfected) were done by one way Analysis of Variance (ANOVA) (Zar, 1999), using the PROC GLM procedure of the statistical package SAS®. There were no statistically significant differences between the proportion of fed larvae and number of larvae molt suffered among larvae fed on rabbits treatment and control, as well as among the proportions of nymphs 2 fed and the numbers that molted. In the adults, there were no significant differences in the number of eggs per oviposition, the total number of eggs, the preoviposition period, the oviposition period and the eclosion rate. However, there was a significant difference in the numbers of eggs that between females that fed on infected rabbits and the control ones. We conclude that, the development of the different stages of *Ornithodoros mimon* was not affected by *Rickettsia rickettsii*.

4.1 INTRODUÇÃO

Espécies do gênero *Ornithodoros* foram encontradas infestando animais da ordem *Chiroptera* (Landulfo *et al.*, 2012). Os morcegos não possuem pêlos densos e têm uma grande quantidade de vasos sanguíneos logo abaixo da derme e por esse motivo são hospedeiros adequados para ingestão de sangue por carrapatos (Socolovschi *et al.*, 2012).

A espécie *Ornithodoros moubata* Murray 1877, vive em tocas habitadas por ursos, porco-espinho e javalis. *Ornithodoros turicata* Duges 1876 ataca uma variedade de hospedeiros, incluindo répteis, pássaros e mamíferos. Espécimes também foram encontrados em cascavel, tartarugas, coruja-buraqueira, esquilos de chão, cães de pradaria, canguru, ratos, coelhos, porcos, gados e cavalos. O homem é parasitado por todos os estagios, apresentando intensa irritação e edema após a picada, e às vezes, nódulos subcutâneos podem persistir por muitos meses (Arthur, 1961).

Sonenshine e Anasios (1960) estudaram a espécie *O. kelleyi* Cooley & Kohls 1941 em laboratório e observaram que para atingir a maturidade o carrapato passa por larva e pode ter de dois a quatro estagios ninfais, sendo que a ninfa de primeiro estagio não precisa de alimentação sanguínea para mudar para o próximo estagio ninfal. O sucesso e a duração do ciclo de carrapatos moles dependem da eficiência da alimentação e das condições climáticas, onde os efeitos da temperatura e umidade influenciam o período de incubação dos ovos, a duração da pré-alimentação, pré-muda e oviposição (Shoura, 1987).

Carrapatos da família *Argasidae* desenvolveram estratégias fisiológicas para favorecer a rápida alimentação de sangue, incluindo alta distensão do tegumento durante a alimentação e excreção de excesso de água e íons através da glândula coxal, enquanto o sangue está sendo ingerido ou após o desprendimento (Hoogstraal, 1985).

A febre suína africana causada por uma arbovirose é transmitida por espécies de *Ornithodoros*, que ao se tornarem adultos podem viver entre 15-20 anos, portanto o vírus é mantido durante longo período no carrapato (Manzano-Román *et al.*, 2012). É também responsável por transmitir espiroquetas que causa a febre recorrente, uma infecção letal que tem como vetor a espécie *O. hermsi* Wheeler, Herms & Meyer 1935. Este carrapato pode se infectar com vários genótipos da espiroqueta e transmitir para hospedeiros vertebrados (Policastro *et al.*, 2011).

As espécies *O. erraticus* Lucas 1849, *O. rostratus* Aragão 1911 e *O. parkeri* Cooley 1936 foram capazes de se infectar e transmitir a bactéria *R. rickettsii* em laboratório (Gunders *et al.*, 1979; Estrada-Peña e Jongejan, 1999; Socolovschi *et al.*, 2012).

Alguns órgãos, como os túbulos de Malpighi, ovários e parte do intestino, não sofrem alterações morfológicas quando o carrapato sofre ecdise. Portanto, o fato de que a maioria dos órgãos onde a *R. rickettsii* está presente não sofre alterações, faz com que ocorra a transmissão transestadial (Rehacek, 1965). A transmissão transestadial é um componente necessário para a competência vetorial do carrapato. Quando o carrapato consegue transmitir a bactéria transestadial e transovariamente este carrapato servirá como reservatório da *Rickettsia* (Parola *et al.*, 2005).

A bactéria *R. rickettsii* causa efeitos deletérios ao vetor, porém não é extinta porque há transmissão transovariana da bactéria. A transmissão é comprovadamente mantida por gerações nos carrapatos (Silveira, 2006). Portanto, o objetivo deste estudo foi verificar se a bactéria interfere no desenvolvimento do carrapato.

4.2 MATERIAL E MÉTODOS

4.2.1 Procedimentos

As larvas, ninfas 2 e adultos de *Ornithodoros mimon* foram separados em lotes para alimentação em dois coelhos que foram inoculados por via subcutânea com 1 ml de células infectadas com *R. rickettsii* cepa Taiacu (tratamento) e em um coelho controle que não teve nenhum contato com a bactéria.

A temperatura retal dos coelhos inoculados com a bactéria foi aferida duas vezes ao dia até o animal apresentar pico febril (acima de 40,0°C). Após o primeiro pico febril lotes de larvas foram colocados para infestar os coelhos; lotes de ninfas 2 foram colocados para se alimentar no segundo, terceiro e quarto dia após o aparecimento da febre; e lotes de adultos foram colocados para se alimentar no segundo e terceiro dia após o primeiro pico febril.

O coelho controle foi infestado com larvas, dois lotes de ninfas 2 (onde cada lote foi colocado para se alimentar em dias diferentes); e dois lotes de adultos, também colocados para infestação em dias diferentes (o procedimento completo pode ser visto no Capítulo 1).

A alimentação das larvas foi realizada utilizando câmara de alimentação nas orelhas do coelho, onde a câmara foi aberta diariamente para coleta das larvas ingurgitadas. Lotes foram formados para cada dia em que as larvas se desprenderam do coelho. As ninfas 2 e adultos foram alimentados no dorso do animal, onde eram colocados para infestar o coelho e retirados após alguns minutos já que se alimentam rapidamente.

Após a alimentação os carrapatos foram mantidos em incubadora BOD a 26°C, $\geq 90\%$ UR em tubos plásticos fechados com tecido voal. As larvas e ninfas 2 foram acompanhados diariamente até a ecdise, já os adultos foram acompanhados com o objetivo de se coletar os ovos. Os ovos coletados formaram lotes de acordo com o dia da oviposição onde foram mantidos em seringas, com a parte superior cortada e fechadas com algodão, em incubadora até a eclosão.

Após sofrer ecdise, as ninfas 1 e ninfas 3 foram alimentadas em novos coelhos sadios (descrito na terceira etapa do Capítulo 1). Os carrapatos foram mantidos na incubadora até sofrerem ecdise, após a alimentação.

4.2.2 Análise estatística

Para comparar a duração dos períodos de ecdise das larvas e ninfas, e oviposição dos adultos foram realizadas Análises de Variância (ANOVA) de um fator (ZAR, 1999), em que a variável independente foi o Tratamento (Infectadas vs não infectadas). As médias foram comparadas pelo teste de comparações múltiplas "a posteriori" de Duncan com nível global de significância de α de 5%. Foi utilizado o procedimento PROC GLM do pacote estatístico SAS® (Statistical Analysis System) (SAS, 2006).

4.3 RESULTADOS

As larvas se alimentaram nos coelhos entre 5-10 dias, sendo estas recuperadas durante seis dias consecutivos, formando um lote para cada dia, de acordo com o dia que foi recuperado. A média do tempo de ecdise das larvas foi de $6,6 \pm 0,11$ dias e ninfas 2 em média de $12,7 \pm 0,35$ dias (Figura 1) (segunda etapa – Capítulo 1).

Os dados referentes à oviposição são demonstrados na Tabela 1. Os dias de oviposição se referem aos dias em que houve postura de ovos, pois as fêmeas desse gênero não ovipõem em dias contínuos, diferindo do período próprio que é o tempo de oviposição. Ademais, larvas demoraram em média 17,28 dias para eclodirem (Tabela 2).

A média do tempo de ecdise das ninfas 1 foi de $10,5 \pm 0,64$ dias, e a média de ninfas 3 foi de $16,3 \pm 5,13$ dias, alimentadas (terceira etapa) nos coelhos não infectados (Figuras 2 e 3).

4.3.1 Análise estatística

Para larvas comparou-se à proporção que se alimentaram em coelhos infectados e coelho controle ($F = 0,15$; $p = 0,6992$) e a quantidade de larvas que sofreram ecdise após alimentação ($F = 0,28$; $p = 0,6034$), demonstrando não existir diferença estatística significativa. Como não houve transmissão da *R. rickettsii* para os carrapatos como demonstrado no Capítulo 1, não foi realizado o teste para as ninfas 1 (larvas após sofrerem ecdise).

Comparou-se a proporção de ninfas 2 alimentadas em coelhos infectados e coelho controle ($F = 1,74$; $p = 0,2300$) e a quantidade de ninfas 2 que sofreram ecdise após alimentação ($F = 0,1$; $P = 0,9869$), mostrando que não houve diferença estatística. Não foi realizado o teste para as ninfas 3 (ninfas 2 após sofrerem ecdise), pois não houve transmissão para os carrapatos que se alimentaram em coelho infectado, como mostrado no Capítulo 1.

Para os adultos foi comparado entre os lotes das fêmeas alimentadas em coelhos infectados e coelho controle a quantidade de ovos por oviposição ($F=0,22$; $p= 0,6649$), quantidade total de ovos por lote ($F = 1,65$; $p = 0,2681$), o período prévio ($F = 0,42$; $p = 0,5515$) e o período próprio ($F = 0,17$; $p = 0,7036$), não havendo diferença estatística em nenhum dado apresentado.

Comparou-se também a frequência com que os lotes das fêmeas alimentadas em coelhos infectados e coelho controle ovipuseram ($F = 4,99$; $p = 0,0276$) demonstrando ter diferença estatística, onde a frequência de oviposição foi maior em fêmeas alimentadas no coelho controle. A taxa de eclosão ($F = 1,88$; $p = 0,1738$) não apresentou diferença estatística.

4.4 DISCUSSÃO

As larvas deste estudo levaram entre 6,5-6,7 dias para sofrerem ecdise e se alimentaram entre 5 a 10 dias; as ninfas 2 levaram de 12,3-13 dias para sofrerem ecdise e se alimentaram em minutos. Em estudo realizado por Landulfo *et al.* (2012), as larvas de *O. mimon* se alimentaram em um período de 5 a 9 dias, e a média do período para a ecdise foi de 6,8 dias. Para larvas de *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* Clifford, Kohls & Sonenshine 1964 a ecdise leva de 4-12 dias; já as ninfas 2 para ninfas 3 levam de 6-9 dias (Shoura, 1987). As larvas de *Ornithodoros (Alectorobius) amblus* Chamberlin 1920 levaram de 5-23 para alimentação e a ecdise ocorreu após 3-6 dias, já as ninfas 2 levaram de 5-11 dias para sofrerem ecdise e se tornarem ninfas 3 (Khalil & Hoogstraal, 1981).

As larvas de *O. kelleyi* necessitam de vários dias para ingurgitar, pois se alimentam lentamente, diferente das ninfas e adultos que se alimentam em ratos entre 20 a 150 minutos (Sonenshine e Anasios, 1960).

O tempo até a eclosão dos ovos de *O. mimon* deste trabalho variou entre 16,67-18,5 dias de fêmeas que se alimentaram no coelho inoculado e controle. Landulfo *et al.* (2012) observaram que o tempo de incubação dos ovos de *O. mimon* levou em média 11,9 dias. A eclosão dos ovos de *Ornithodoros (P.) erraticus* variou de 5-14 dias (Shoura, 1987). O período de incubação dos ovos para a espécie *O. (Alectorobius) amblus* foi de 11-15 dias (média de 12,7 dias) (Khalil & Hoogstraal, 1981).

O período prévio de *O. mimon* deste experimento variou entre 25-110 dias e o período próprio entre 33-76 dias. Já em fêmeas de *Ornithodoros (P.) erraticus* o período prévio foi de 9 a 12 dias e o período próprio de 4 a 8 dias (Shoura, 1987). A oviposição de *O. kelleyi* ocorreu entre 10 a 210 dias após a alimentação (Sonenshine e Anasios, 1960). A média para o período prévio de *O. (Alectorobius) amblus* foi de 80,4 dias e período próprio de 6,9 dias (Khalil & Hoogstraal, 1981).

Como demonstrado no Capítulo 1, *O. mimon* não foi capaz de se infectar com *R. rickettsii*, não tendo interferência em seu desenvolvimento pela bactéria. A influência de patógenos sobre a biologia de carrapatos começou a ser observada por Burgdorfer e Brinton (1975) estudando carrapatos *Dermacentor andersoni* Stiles 1908 infectados. A partir de gerações filiais mais

afastadas da geração em que ocorreu a infecção, o efeito prejudicial da *R. rickettsii* seria detectado sobre o ciclo de vida do carrapato. A mortalidade de fêmeas ingurgitadas foi observada a partir da quinta geração infectada de *D. andersoni*, já as fêmeas sobreviventes tiveram sua postura reduzida em $\frac{1}{3}$ ou em até pela metade.

As rickettsias se multiplicam em quase todos os órgãos no carrapato, em especial nas glândulas salivares e nos ovários, fazendo com que ocorra a transmissão de patógenos durante a alimentação e transmissão transovariana. Outras bactérias não infectam as glândulas salivares do carrapato, então não ocorre à transmissão a hospedeiros suscetíveis, embora transmitam transovariamente (Parola e Raoult, 2001).

A transmissão do agente da doença de Lyme (*Borrelia burgdorferi* Johnson, Schmidt, Hyde, Steigerwalt & Brenner 1984) ocorre através da picada de carrapatos infectados (*Ixodes dammini* Spielman, Clifford, Piesman & Corwin). O risco da infecção por esta bactéria tem sido associado com a duração da alimentação, sendo transmitidas para novos hospedeiros quando ninfas do carrapato se alimentam por 48 horas ou mais (Shih e Spielman, 1993).

Para uma *Rickettsia* ter potencial patogênico para infectar seres humanos a bactéria deve ser transmitida através da picada do carrapato, o que implica a localização nas glândulas salivares do vetor (Parola *et al.*, 2005). Segundo Raoul e Roux (1997) pouco se sabe a respeito dos efeitos que a infecção por *Rickettsia* causa nos carrapatos, embora já tenha sido reportada redução na fertilidade.

As fêmeas que se alimentaram em coelho infectado tiveram uma frequência menor de oviposição se comparadas com as fêmeas alimentadas em coelho controle, porém o motivo da baixa frequência de oviposição não ficou claro. Na espécie *Rhipicephalus sanguineus* Latreille 1806 a manutenção de *Rickettsia* através da transmissão transovariana pode chegar a 100%, a bactéria não tem nenhum efeito sobre a aptidão reprodutiva e viabilidade do hospedeiro (Parola *et al.*, 2005).

Portanto, a bactéria *R. rickettsii* não afetou, nas condições testadas neste experimento, o desenvolvimento dos carrapatos em diferentes estagios na espécie *O. mimon*.

4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arthur, R. D. 1961. Host preferences and the behavior of feeding and fed ticks. *In*: Arthur, R. D. **Ticks and Disease**. Pergamon Press Ltd. New York, USA, 236-269p.
- Burgdorfer, W.; Brinton, L.P. 1975. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever *Rickettsiae* in ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences** 266:61–72.
- Estrada-Peña, A.; Jongejan, F. 1999. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting *Ixodoidea* with special reference to pathogen transmission. **Experimental and Applied Acarology** 23:685-715.
- Gunders, A. E.; Gottlieb, D.; Goldberg, Z. 1979. Transmission of a *Rickettsia* of *Psammomys obesus* by of *Ornithodoros*. **Refuah Veterinarith** 36 (1):13-15.
- Hoogstraal, H. 1985. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology** 24:135-238.
- Khalil, G. M.; Hoogstraal, H. 1981. The life cycle of *Ornithodoros (Alectorobius) amblus* (Acari: Ixodoidea: Argasidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology** 18 (2):134-139.
- Landolfo, G. A.; Pevidor, L. V.; Sampaio, J. S.; Luz, H. R.; Onofrio, V. C.; Faccini, J. L. H.; Barros-Battesti, D. M. 2012. Life cycle of *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) under laboratory conditions. **Experimental & Applied Acarology** 58:69-80.
- Manzano-Román, R.; Díaz-Martín, V.; Fuente, J.; Pérez-Sánchez. 2012. Soft ticks as pathogen vectors: distribution, surveillance and control. **Parasitology** 125-162.
- Parola, P.; Raoult, D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases** 32:897-928.
- Parola, P.; Paddock, C. D.; Raoult, D. 2005. Tick-borne rickettsioses around the world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews** 18 (4):719-756.
- Policastro, P. F.; Raffel, S. J.; Schwan, T. G. 2011. Cotransmission of divergent relapsing fever spirochetes by artificially infected *Ornithodoros hermsi*. **Applied and Environmental Microbiology** 77 (24):8494-8499.
- Raoult, D.; Roux, V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews** 10 (4):694-719.
- Rehacek, J. 1965. Development of animal viruses and *Rickettsiae* in ticks and mites. **Annual Review of Entomology** 10:1-24.
- SAS. 2006. Institute Incorporation. **S.A.S. user's guide: Statistics**, Version 6.12. Cary: S.A.S Institute Inc.
- Shih, C-M.; Spielman, A. 1993. Accelerated transmission of Lyme disease spirochetes by partially fed vector ticks. **Journal of Clinical Microbiology** 31 (11):2878-2881.
- Shoura, S. M. E. 1987. The life cycle of *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* (Acari: Ixodoidea: Argasidae) in the laboratory. **Journal Medical Entomology** 24 (2):229-234.
- Silveira, I. 2006. **Investigação da infecção pela bactéria *Rickettsia rickettsii* em carrapatos *Amblyomma triste* no Estado de São Paulo: isolamento e caracterização molecular da bactéria**: 1-54. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- Socolovschi, C.; Kernif, T.; Raoult, D.; Parola, P. 2012. *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* species in bat ticks, France, 2010. **Emerging Infectious Diseases** 18 (12):1966-1975.
- Sonenshine, D. E.; Anasios, G. 1960. Observations on the life history of the bat tick *Ornithodoros kelleyi* (Acarina: Argasidae). **The journal of parasitology** 46 (4):449-454.
- ZAR, J.H. 1999. **Biostatistical analysis**. 4^a ed. Prentice-Hall, New Jersey. 663p., 1999.

Figura 1 – Média do tempo de ecdise de larvas e ninfas 2 de *O. mimon* alimentadas em coelhos infectados (coelho 1 e coelho 2) e controle (coelho3).

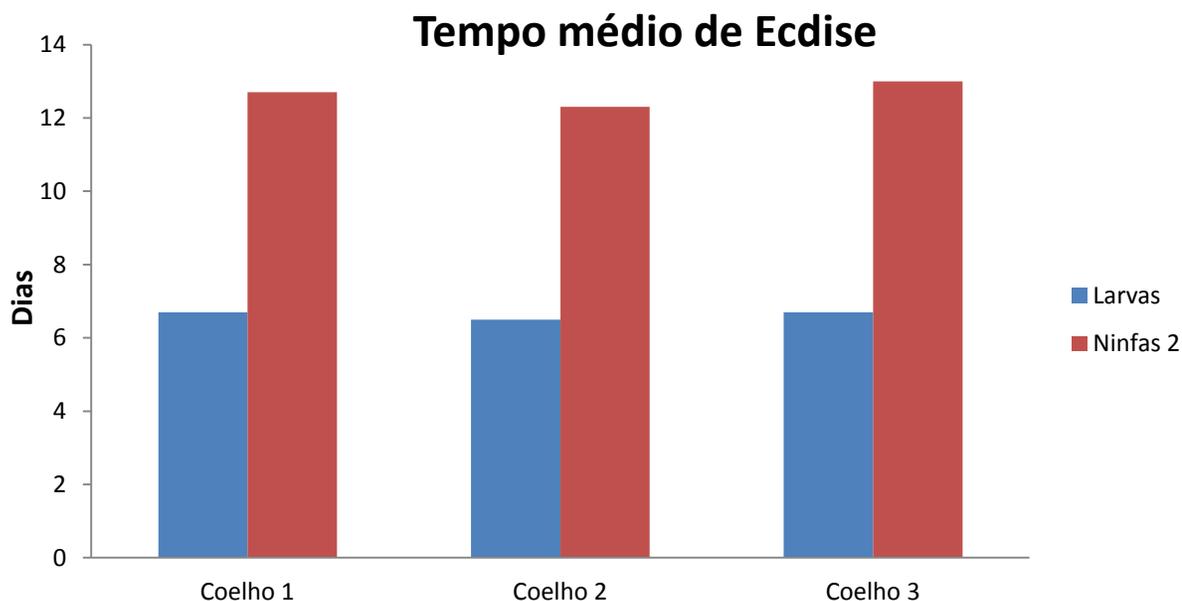


Tabela 1 – Tempo da oviposição de fêmeas de *O. mimon*, separado por lote de acordo com a alimentação em coelho infectado com *R. rickettsii* (coelho 1 e coelho 2) ou controle. O período prévio é o tempo (dias) que a fêmea ficou em repouso após o acasalamento – período de pré-oviposição; período próprio são os dias em que houve oviposição – período de oviposição.

Coelho	Lote	Quantidade de ovos	Média de Ovos/dia	Período Prévio	Período Próprio	Dias de oviposição
1	9	173	4,81	25	64	36
	12	339	9,16	44	76	37
2	10	35	17,5	110	4	2
	13	198	8,61	65	50	23
Controle	11	279	9,96	64	33	28
	14	501	8,49	18	92	59
Média Total		254,2 ± 159,07	9,8 ± 4,18	54,3 ± 33,44	53,2 ± 31,56	30,8 ± 18,75

Tabela 2 – Tempo de eclosão dos ovos de *O. mimon*, separados por coelho (coelho1 e 2 – coelhos infectados; coelho controle – sem contato com a *R. rickettsii*) e seus respectivos lotes em dias (média \pm dp).

Coelho	Lote	Dias
1	9	17,08 \pm 1,12
	12	16,67 \pm 1,02
2	10	-
	13	18,50 \pm 1,93
Controle	11	17,33 \pm 0,52
	14	17,55 \pm 0,86
Média Total		17,28 \pm 1,24

Figura 2 – Média do tempo de ecdise de ninfas 1 de *O. mimon* alimentadas em coelhos sadios.

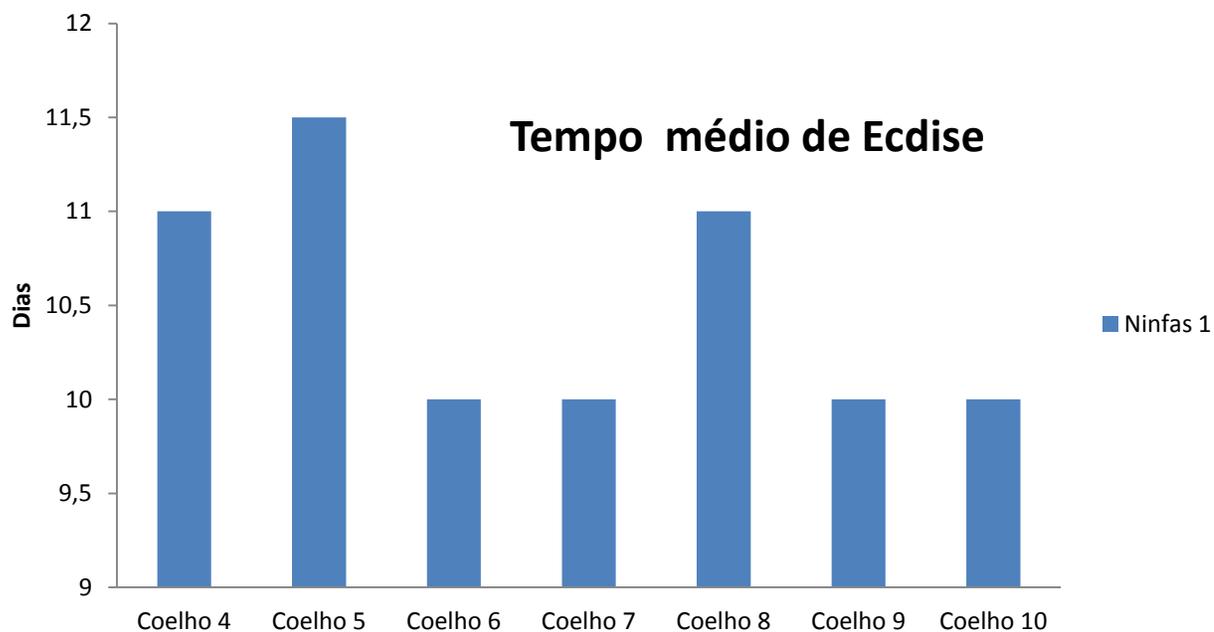
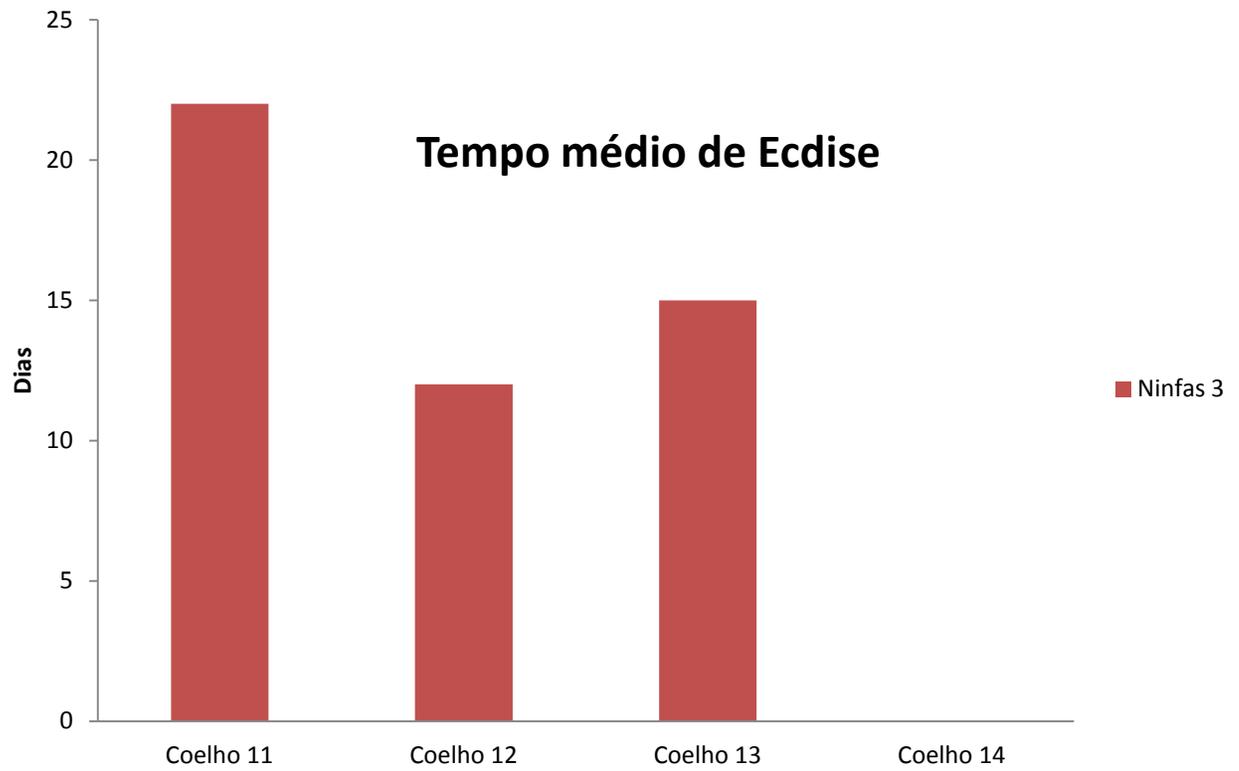


Figura 3 – Média do tempo de ecdise de ninfas 3 de *O. mimon* alimentadas em coelhos sadios.



5. CAPÍTULO 3: Testes para diagnosticar a bactéria *Wolbachia* sp. em *Ornithodoros mimon* Kohls 1969

RESUMO

A ocorrência de endossimbiontes em carrapatos é comum. Bactérias do gênero *Wolbachia* são encontradas em tecidos reprodutivos de artrópodes e são conhecidas por não serem patogênicas aos vertebrados. O objetivo deste estudo foi identificar a espécie de endossimbionte que ocorre no carrapato *Ornithodoros mimon* Kohls 1969. Amostras de *O. mimon* foram usadas para realização da PCR utilizando os primers 28S (eucarioto) e *ftsZ* (*Wolbachia* sp.). Além disso, foi feito sequenciamento de amostras que foram amplificadas com o primer 28S. Amostras de carrapatos amplificadas com o primer 28S foram sequenciadas. A sequência foi depositada no GenBank e retornou similaridade com DNA do carrapato estudado. A PCR com o primer *ftsZ* não amplificou nenhum DNA.

ABSTRACT

The occurrence of endosymbionts in ticks is common. Bacteria of the genus *Wolbachia* are found in the reproductive tissues of arthropods and are not known to be pathogenic to vertebrates. The aim of this study was to identify the species of endosymbionts occurring in the tick *Ornithodoros mimon* Kohls 1969. Samples of *O. mimon* were used to perform PCR using the primers 28S (eukaryote) and *ftsZ* (*Wolbachia* sp.). In addition, sequencing was done with samples that were amplified with the primer 28S. Ticks DNA samples of ticks were amplified and sequenced using primer 28S. The sequence was deposited in GenBank and showed similarity with the DNA of the tick studied. PCR performed with the primer *ftsZ* did not amplify any DNA.

5.1 INTRODUÇÃO

A bactéria *Wolbachia* está classificada na família *Rickettsiaceae*, tribo *Wolbachieae* (Fenollar *et al.*, 2003). O gênero *Wolbachia* contém duas principais subdivisões (A e B) a

Wolbachia pipientis Hertig 1936, uma bactéria indutora de incompatibilidade citoplasmática (IC) pertence à divisão B (Werren, 1997).

Wolbachia só tem sido encontrada associada com o tecido reprodutivo de artrópodes, e não há nenhuma evidência de que cause doenças em animais vertebrados. No entanto, tendo em vista a abundância de espécies de artrópodes infectados com *Wolbachia*, esta possibilidade não pode ser descartada (Werren, 1997). Estas bactérias são conhecidas como endossimbiontes de uma variedade de insetos, ácaros e nematóides, porém, dependendo da cepa da *Wolbachia* e da espécie do hospedeiro elas atuam como mutualista, comensalista ou simbiontes parasitas (Tijssse-Klasen *et al.*, 2011).

Wolbachia pipientis pertence ao grupo das α -proteobactérias, sendo todas as bactérias que causam rickettsiose, que são doenças transmitidas por artrópodes a mamíferos. Possui características gerais de riquetsia, é dimórfica, apresentam pequenas formas irregulares (0,5-1,3 μ m de comprimento), cocóide (0,25-0,5 μ m de diâmetro) e formas grandes (1-1,8 μ m de diâmetro) (Stouthamer *et al.*, 1999). Foi descrita pela primeira vez em 1924, quando foi encontrada nos ovários do mosquito *Culex pipiens* Linnaeus 1758, sendo classificada como uma *Rickettsia* desconhecida e posteriormente nomeada como *Wolbachia pipientis*, em homenagem a Wolbach (Fenollar *et al.*, 2003).

São encontradas em tecidos reprodutivos (ovários e testículos) de artrópodes, sendo transmitidas através do citoplasma de ovos. Estas bactérias evoluíram vários mecanismos para manipulação de reprodução de seus hospedeiros, incluindo a incompatibilidade citoplasmática (IC) entre cepas e espécies relacionadas. Na sua forma mais simples, um cruzamento entre um macho infectado e uma fêmea não infectada resulta na mortalidade dos embriões. Além de causar a indução de partenogênese (IP), e feminização. A transmissão também ocorre horizontalmente entre espécies de artrópodes (Werren, 1997; Stouthamer *et al.*, 1999).

São extremamente difundidas, pois estas modificações na reprodução do hospedeiro dá uma vantagem seletiva para as bactérias (Werren, 1997). Por isso, permite-lhe aumentar a frequência em populações de hospedeiros, sem a necessidade de transmissão horizontal (Zhou *et al.*, 1998). O esperma de machos infectados com a *Wolbachia* tem uma vantagem competitiva em relação ao esperma dos machos não infectados, podendo acelerar a disseminação da infecção. As taxas de

transmissão típicas variam de 90 a 100%, dependendo das espécies hospedeiras e, presumivelmente, da cepa bacteriana (Werren, 1997).

As bactérias mais próximas a *Wolbachia* são um grupo de rickettsias que inclui *Ehrlichia canis* Donatien & Lestoquard 1935 e *Anaplasma marginale* Theiler 1910, o gênero *Rickettsia* são mais distantes (Werren, 1997). Para Noda *et al.* (1997) espécies de *Wolbachia* presentes em insetos são filogeneticamente relacionada a espécies transmitidas por carrapatos, como *Rickettsia*, *Ehrlichia* e *Anaplasma*.

Independente da origem geográfica é comum ocorrer simbioses bacterianas na maioria das espécies de argasídeos e ixodídeos, onde não parecem ser patogênicos para carrapatos e são transmitidos via transovariana. Essas bactérias estão presentes durante todas as fases de vida dos carrapatos e foram identificados como *Wolbachia* ou *Rickettsia*, com base na sua ultraestrutura (Noda *et al.*, 1997).

Carrapatos abrigam *Rickettsia* e *Wolbachia* não patogênicas, estas bactérias pertencem a um grupo diversificado de simbioses intracelulares, e sua localização ocorre geralmente nos túbulos de Malpighi e ovários (Fenn *et al.*, 2006; Noda *et al.*, 1997). O primeiro organismo simbiote semelhante à *Rickettsia* encontrado foi descrito em *Argas (Persicargas) arboreus* Kaiser, Hoogstraal & Kohls 1964, um carrapato de corpo mole. Porém, o organismo encontrado não mostrou ser capaz de infectar ou causar doenças em vertebrados (Socolovschi *et al.*, 2012).

Endossimbiontes que estão intimamente relacionados a conhecidos patógenos como: *Coxiella*, *Rickettsia*, e *Francisella* spp são abrigados por carrapatos de corpo mole, a bactéria vive junto com o hospedeiro carrapato sem nenhuma relação mutualística ou de parasitismo (Mattila *et al.*, 2007). Portanto, o objetivo deste estudo foi identificar qual endossimbionte à espécie *Ornithodoros mimon* abriga em seu organismo.

5.2 MATERIAL E MÉTODOS

Lotes de larvas, ninfas 2 e adultos de *Ornithodoros mimon* foram alimentados em coelhos que foram inoculados por via subcutânea com 1 ml de células infectadas com *R. rickettsii* e em

um coelho controle que não teve nenhum contato com a bactéria (detalhes do procedimento completo no Capítulo 1).

5.2.1 Análises moleculares com o primer *ompA*

Amostras de carrapatos alimentados em coelhos que foram inoculados com cepa de *Rickettsia rickettsii* foram submetidas à extração de DNA e amplificadas utilizando o primer *ompA* (Tabela 1). O seguinte protocolo de amplificação foi realizado: 95°C por 15 minutos para ativação da Taq DNA polimerase; seguido de 35 ciclos para desnaturação da fita a 94°C por 35 segundos; anelamento a 55,2°C por 40 segundos; extensão a 72°C por 45 segundos e finalmente uma etapa de 72°C por 7 minutos para extensão completa da fita, as amostras permaneceram a 14°C até a retirada das mesmas do termociclador. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5%, corados por GELRED, e observados em luz ultravioleta. O marcador de peso molecular ladder com 100pb da Invitrogen foi utilizado para comparar com os amplicons.

Após ser realizado a PCR, três amostras que haviam dado positivo foram separadas para realização da purificação, utilizando um reagente, chamado ExoSAP, que degrada o que sobrou da reação, deixando somente o DNA alvo. O seguinte protocolo foi utilizado: o produto da PCR foi misturado com o reagente, em seguida a mistura foi incubada a 37°C durante 15 minutos em um termociclador e aquecida a 80°C durante 15 minutos ainda no termociclador. Posteriormente, o DNA purificado foi submetido ao sequenciamento, realizado pelo método de Sanger com o kit ABI PRISM® BigDye™ Primer. A sequência foi determinada usando o programa Geneious R6 (2013).

5.2.2 Análises moleculares com o primer 28S

Foram testadas 24 amostras de carrapatos que foram utilizados no Capítulo 1 (tanto os que foram alimentados no coelho infectado com *Rickettsia rickettsii* quanto do coelho controle), usando o primer 28S (Tabela 2).

O seguinte protocolo foi realizado para amplificação do DNA: 95°C por três minutos; 94°C por um minuto; 55°C por um minuto; 72°C por dois minutos; seguido de 35 ciclos de 94°C, por 15 segundos; 55°C por um minuto; 72°C por 45 segundos e finalmente uma etapa de 72°C por sete minutos, as amostras permaneceram a 14°C até a retirada do termociclador (modificado de Werren *et al.* (1995a)). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5%, coradas por GELRED e visualizadas em luz ultravioleta. O marcador de peso molecular ladder com 100pb da Invitrogen foi utilizado para comparar com os amplicons.

Após a realização da PCR, três amostras que haviam dado positivo foram separadas para realização da purificação e sequenciamento, que foi realizado conforme descrito acima.

5.2.3 Técnica da PCR com o primer *ftsZ*

Foram testadas 15 amostras de carrapatos que foram utilizados no Capítulo 1 (tanto os que foram alimentados no coelho infectado com *Rickettsia rickettsii* quanto do coelho controle), usando o primer *ftsZ* (Tabela 3).

O seguinte protocolo foi realizado: 95°C por 15 minutos; 94°C por um minuto; seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos; 62°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos. Terminado o ciclo de 35 vezes, seguiu-se um período de 72°C por sete minutos e posteriormente as amostras foram mantidas a 14°C até a retirada do termociclador (modificado de Werren *et al.* (1995b)). Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5%, coradas por GELRED e visualizadas em luz ultravioleta. O marcador de peso molecular ladder com 100pb da Invitrogen foi utilizado para comparar com os amplicons.

5.3 RESULTADOS

Dentre as amostras de carrapatos testadas com o primer *ompA* somente uma amostra apresentou resultado negativo, porém entre elas haviam amostras do coelho controle e não era esperado que apresentasse resultado positivo.

O sequenciamento do fragmento amplificado do primer com alvo no gene *ompA* com a temperatura de anelamento a 55,2°C de três amostras diferentes do grupo de carrapatos alimentados em coelhos infectados com *Rickettsia rickettsii* apresentou sobreposição de leituras. Algumas regiões do fragmento amplificado apresentaram leituras sobrepostas, estas leituras se repetiram nas três amostras, portanto não se trata de um erro de sequenciamento, mas de um padrão, mostrando que nestas regiões há a presença de mais do que uma base nitrogenada, portanto de mais do que um organismo. A sequência gerada pelo alinhamento tem ambiguidades de bases em vários pontos da sequência, no alinhamento global com sequência do genbank (Blast n) os resultados retornaram similaridade parcial com sequências de bactérias do gênero *Wolbachia* (Tabela 4).

5.3.1 PCR – primer 28S

Das 24 amostras testadas com o primer 28S, nove foram positivas e 15 negativas. Após fazer o sequenciamento de nove amostras, optou-se por não dar continuidade ao procedimento, devido ao sequenciamento ter demonstrado que o DNA sequenciado foi o do carrapato *O. mimon*.

O sequenciamento do fragmento amplificado pelos primers com alvo no gene 28S de amostras diferentes do grupo de carrapatos alimentados em coelhos apresentou uma grande consistência para a composição de uma fita consenso de 346 bases. Após a retirada da sequência referente aos óligos iniciadores, a sequência consenso foi utilizada para busca através do banco de dados on-line GenBank (Blast n), e os resultados mostraram similaridade parcial com sequências de carrapatos do gênero *Ornithodoros* (Tabela 5).

Os primers, embora inespecíficos para o uso neste experimento, se anelaram na sequência do carrapato. O sequenciamento mostrou que embora 100% da sequência consenso foi alinhada com as disponíveis no GenBank, a similaridade máxima atingida foi de 97% com a espécie *Ornithodoros turicata* Duges 1876, mostrando que atualmente não há disponível no GenBank fragmento correspondente do gene 28S Ribossomal da espécie *O. mimon* (Tabela 5).

5.3.2 PCR – primer *ftsZ*

O primer específico para *Wolbachia* não amplificou nenhum DNA das amostras, portanto não foi possível realizar o sequenciamento das amostras para verificar qual espécie se encontrava no carrapato.

5.4 DISCUSSÃO

O sequenciamento com o primer *ompA* (específico para *Rickettsia* do grupo da febre maculosa), mostrou que provavelmente existem mais do que uma espécie de *Wolbachia*, pois três diferentes bases nitrogenadas foram observadas. Insetos podem conter diversas cepas de *Wolbachia*, e estas cepas apresentam considerável diversidade. A ocorrência de infecções com duas cepas de *Wolbachia* é surpreendente, pois é esperado que uma cepa fosse eliminada durante gerações sucessivas no interior dos ovos (Werren *et al.*, 1995c).

Ixodídeos podem estar colonizados por duas ou mais espécies de *Borrelia burgdorferi* Johnson, Schmidt, Hyde, Steigerwalt & Brenner 1984 simultaneamente (Policastro *et al.*, 2011). A espécie *Ixodes scapularis* Say 1821 demonstrou ter como simbiote uma *Rickettsia* do grupo da febre maculosa, porém, os machos perdem seus simbiossitos durante a alimentação ou ao sofrer ecdise e nas fêmeas os simbiossitos foram encontrados apenas nos ovários (Noda *et al.*, 1997).

Organismos endossimbiossitos podem fazer com que carrapatos se tornem incapazes de transmitir patógenos que são intimamente relacionados a estes endossimbiossitos. Por exemplo, o carrapato *Dermacentor andersoni* Stiles 1908 tem como endossimbiossito a *R. peacockii*, e esta bactéria pode ter ajudado a diminuir a prevalência da *R. rickettsii* na América do Norte (Baldrige *et al.*, 2004).

Apesar de uma quantidade crescente de espécies de artrópodes infectados, ainda não se tem um padrão e sistema confiável para quantificar a diversidade de cepas de *Wolbachia*. Embora esta bactéria seja extremamente importante, pois estão entre o grupo mais comum de bactérias intracelular obrigatório, por causar diversos efeitos no seu hospedeiro e devido ao seu potencial para a saúde (Baldo *et al.*, 2006).

As bactérias *Wolbachia* e *Rickettsia* são organismos filogeneticamente muito próximos, por isso, é provável que os primers tenham anelado em fragmentos de DNA de *Wolbachia*, pois não havia o DNA alvo de *Rickettsia*. Em um trabalho realizado por Cutler *et al.* (2006) o primer *gltA* (uma porção interna do gene citrato sintase) utilizado para detectar *Rickettsia* em *O. moubata* não foi específico, o fragmento amplificado foi de um microrganismo do solo *Acinetobacter* ssp. Porém, estudos com os primers *gltA* e *ompA* apresentaram resultados positivos para a *R. rickettsii* com a espécie *A. aureolatum* (Ixodídeo), como demonstrado por Pinter & Labruna (2006).

O fato de que as sequências dos carrapatos terem alinhado com maior similaridade com sequências de *Wolbachia* encontrada em *Drosophila* mostra que as bactérias encontradas em *O. mimon* não têm sequências de DNA depositadas no GenBank, o que demonstra se tratarem de espécies novas e ainda não descritas. De fato, não há na literatura científica publicações tratando sobre estes organismos.

Portanto, a espécie *O. mimon* abriga bactérias endossimbiontes do gênero *Wolbachia*. Porém, não se sabe em que órgão a bactéria fica localizada, se esta altera a reprodução do seu hospedeiro e se interfere no desenvolvimento da *R. rickettsii*. Mais primers precisam ser testados para verificar se a espécie presente trata-se de uma nova espécie.

5.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Baldo, L.; Hotopp, J. C. D.; Jolley, K. A.; Bordenstein, S. R.; Biver, S. A.; Chourdhury, R. R.; Hayashi, C.; Maiden, M. C. J.; Tettelin, H.; Werren, J. H. 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Applied and Environmental Microbiology** 72 (11): 7098-7110.
- Baldrige, G. D.; Burkhard, N. Y.; Simser, J. A.; Kurtti, T. J.; Munderloh, U. G. 2004. Sequence and expression analysis of the *ompA* of *Rickettsia peacockii*, an endosymbiont of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. **Applied and Environmental Microbiology** 70 (11):6628-6636.
- Cutler, S. J.; Browning, P.; Scott, J. C. 2006. *Ornithodoros moubata*, a soft tick vector for *Rickettsia* in East Africa. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1078:373-377.
- Fenn, K.; Conlon, C.; Jones, M.; Quail, M. A.; Holroy, E.; Parkhill, J.; Blaxter, M. 2006. Phylogenetic relationships of the *Wolbachia* of nematodes and arthropods. **PLoS Pathogens** 2 (9):0887-0899.

- Fenollar, F.; La Scola, B.; Inokuma, H.; Dumler, J. S.; Taylor, M. J.; Raoult, D. 2003. Culture and phenotypic characterization of a *Wolbachia pipientis* isolate. **Journal of Clinical Microbiology** 41 (12):5434-5441.
- Mattila, J. T.; Burkhardt, N. Y.; Hutcheson, H. J.; Munderloh, U. G.; Kurtti, T. J. 2007. Isolation of cell lines and a Rickettsial endosymbiont from the soft tick *Carios capensis* (Acari: Argasidae: Ornithodorinae). **Journal of Medical Entomology** 44 (6):1091-1101.
- Noda, H.; Munderloh, U. G.; Kurtti, T. J. 1997. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. **Applied and environmental microbiology** 63 (10):3926-3932.
- Pinter A., Labruna M. B. 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1078:523-530.
- Policastro, P. F.; Raffel, S. J.; Schwan, T. G. 2011. Cotransmission of divergent relapsing fever spirochetes by artificially infected *Ornithodoros hermsi*. **Applied and Environmental Microbiology** 77 (24):8494-8499.
- Socolovschi, C.; Kernif, T.; Raoult, D.; Parola, P. 2012. *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* species in bat ticks, France, 2010. **Emerging Infectious Diseases** 18 (12):1966-1975.
- Stouthamer, R.; Breeuwer, J. A. J.; Hurst, G. D. D. 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annual Review of Microbiology** 53:71-102.
- Tijssen-Klasen E.; Braks, M.; Scholt, E-J.; Sprong, H. 2011. Parasites of vectors – *Ixodiphagus hookeri* and its *Wolbachia* symbionts in ticks in the Netherlands. **Parasites & Vectors** 4:228.
- Werren, J. H.; Windsor, D.; Guo, L. 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London B** 262:197-204.
- Werren, J. H.; Jaenike, J. 1995b. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mycophagous *Drosophila* and their relatives. **Heredity** 75:320-326.
- Werren, J. H.; Zhang, W.; Guo, L. 1995c. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London B** 261:55-71.
- Werren, J. H. 1997. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology** 42:587-609.
- Zhou, W.; Rousset, F.; O'Neill, S. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. **Proceedings of the Royal Society of London B** 265:509-515.

Tabela 1 – Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados nas reações de PCR com o primer *ompA*.

Genes	Primers	Sequência dos primers (5' - 3')	Tamanho produzido (pb)	Referência
<i>ompA</i>	190.70F-A1	ATGGCGAATATTTCTCCAA AA	532	Regnery <i>et al.</i> (1991)
<i>ompA</i>	190.602R-A2	AGTGCAGCATTCGCTCCCC CT	532	Regnery <i>et al.</i> (1991)

Tabela 2 – Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados nas reações de PCR com o primer 28S.

Genes	Sequência dos óligos (5' - 3')	Tamanho produzido (pb)	Referência
28Sf	CCCTGTTGAGCTTGACTCTAGTCTGGC	500-600	Werren <i>et al.</i> (1995a)
28Sr	AAGAGCCGACATCGAAGGATC	500-600	Werren <i>et al.</i> (1995a)

Tabela 3 – Sequência dos primers e tamanho dos produtos amplificados nas reações de PCR com o primer *ftsZ*.

Genes	Sequência dos óligos (5' - 3')	Tamanho produzido (pb)	Referência
<i>ftsZfl</i>	GTTGTCGCAAATACCGATGC	1035-1047	Werren <i>et al.</i> , (1995b)
<i>ftsZrl</i>	CTTAAGTAAGCTGGTATATC	1035-1047	Werren <i>et al.</i> , 1995b)

Tabela 4 – Organismos que apresentaram maior similaridade com o DNA amplificado e sequenciado de três carrapatos utilizando-se primers com alvo no gene *ompA* de *Rickettsia*.

Organismo	Cobertura	Valor-e	Identidade	Identificação
<i>Wolbachia</i> endossimbionte de <i>Drosophila</i>	97%	9e -04	100%	CP003884.1
<i>Wolbachia</i> sp.	97%	9e -04	100%	CP001391.1
<i>Wolbachia</i> endossimbionte de <i>Drosophila</i>	97%	9e -04	100%	AE017196.1

Tabela 5 – Organismos que apresentaram maior similaridade com o DNA amplificado e sequenciado de carrapatos utilizando-se primer com alvo no gene 28S Ribossomal de *Ornithodoros*.

Organismo	Cobertura	Valor-e	Identidade	Identificação
<i>Ornithodoros turicata</i>	100%	8e -162	97%	AF213370.1
<i>Ornithodoros turicata</i>	100%	8e -162	97%	AF120298.1
<i>Otobius meginini</i>	100%	4e -155	96%	AF120297.1

6. CONCLUSÕES GERAIS

A espécie *Ornithodoros mimon* não foi capaz de se infectar com *Rickettsia rickettsii* ao se alimentar em coelhos infectados. Por isso, novos hospedeiros suscetíveis ao serem infestados com os carrapatos não apresentaram febre ou resultado positivo na Reação de Imunofluorescência Indireta.

As cobaias utilizadas para inoculação com macerado e a cobaia infestada com carrapatos serviram para comprovação de que a bactéria estava ausente no organismo dos carrapatos, pois nenhuma cobaia apresentou sintoma da doença, apesar destes animais serem suscetível a ela.

A bactéria *Wolbachia* sp. foi encontrada em *O. mimon*, membro de um grupo de simbioses que ainda não foi descrita neste carrapato.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arthur, R. D. 1961a. Host preferences and the behavior of feeding and fed ticks. *In*: Arthur, R. D. **Ticks and Disease**. Pergamon Press Ltd. New York, USA, 236-269p.
- Arthur, R. D. 1961b. Rickettsiae transmitted by ticks. *In*: Arthur, R. D. **Ticks and Disease**. Pergamon Press Ltd. New York, USA, 352-384p.
- Beck, A. F.; Holscher, K. H.; Butler, J. F. 1986. Life cycle of *Ornithodoros turicata americanus* (Acari: Argasidae) in the laboratory. **Journal Medical Entomology** 23 (3):313-319.
- Burgdorfer, W.; Brinton, L.P. 1975. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences** 266:61-72.
- Burgdorfer, W. 1988. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. *In*: Walker, D.H. **Biology of Rickettsial Diseases**. Boca Raton. CRC Inc, 33-50p.
- Davis, G.E.; Hoogstraal, H. 1954. The relapsing fevers: A survey of the tick-borne spirochetes of Egypt. **Journal Egyptian Public Health Association** 29:139-143.
- Fortes, F. S.; Silveira, I.; Moraes-Filho, J.; Leite, R. V.; Bonacim, J. E.; Biondo, A. W.; Labruna, M. B.; Molento, M. B. 2010. Seroprevalence of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia felis* in dogs, São José dos Pinhais, State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal** 19 (4):222-227.
- Freitas, L. H. T.; Faccini, J. L. H.; Labruna, M. B. 2009. Experimental infection of the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris*, with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, and comparative biology of infected and uninfected tick lineages. **Experimental and Applied Acarology** 47:321-345.
- Galvão, M. A. M. & Ribeiro, J. G. L. 1993. Febre maculosa. *In*: Pedrosa, E. R. P., Rocha, M. O. C., Silva, O. A. (Ed.) **Clínica médica; os princípios da prática ambulatorial**. Atheneu. São Paulo, Brasil, 1374-1380p.
- Greca, H.; Langoni, H.; Souza, L. C. 2008. Brazilian Spotted Fever: a reemergente zoonosis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases** 14 (1): 3-18.
- Guedes, E.; Leite, R. C.; Prata, M. C. A.; Pacheco, R. C.; Walker, D. H. 2005. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 100 (8): 841-845.
- Guimarães, J. H.; Tucci, E. C.; Barros-Battesti, D. M. 2001. **Ectoparasitos de importância veterinária**. Plêiade/FAPESP. São Paulo, Brasil, 213p.
- Hoogstraal, H. 1985. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology** 24:135-238.
- Jongejan, F.; Uilenberg, G. 2004. The global importance of ticks. **Parasitology** 129:S3-S14.
- Katz, G.; Camargo-Neves, V. L. F.; Angerami, R. N.; Nascimento, E. M. M.; Colombo, S. 2009. Situação epidemiológica e importância da febre maculosa no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista** 6 (69):4-13.
- Kent, R. J. 2009. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. **Molecular Ecology Resources** 9:4-18.
- Kocan, K. M. 1986. Development of *Anaplasma marginale* Theiler in ixodid ticks: Coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. *In*: Sauer, J. R.; Hair, J. A. **Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks**. Ellis Horwood Limited. England, 472-505p.

- Labruna, M. B.; Ogrzewalska, M.; Soares, J. F.; Martins, T. F.; Soares, H. S.; Moraes-Filho, J.; Nieri-Bastos, F. A.; Almeida, A. P.; Pinter, A. 2011. Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. **Emerging Infectious Diseases** 17 (5):829-834.
- Landulfo, G. A.; Pevidor, L. V.; Sampaio, J. S.; Luz, H. R.; Onofrio, V. C.; Faccini, J. L. H.; Barros-Battesti, D. M. 2012. Life cycle of *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) under laboratory conditions. **Experimental & Applied Acarology** 58:69-80.
- Lima, V. L. C.; Souza, S. S. L.; Souza, C. E.; Vilela, M. F. G., Papaiordanou, P. M. O.; Del Guércio, V. M. F. 2003. Situação da febre maculosa na Região Administrativa de Campinas, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** 19 (1):331-334.
- Manzano-Román, R.; Díaz-Martín, V.; Fuente, J.; Pérez-Sánchez. 2012. Soft ticks as pathogen vectors: distribution, surveillance and control. **Parasitology** 125-162.
- Morel P.C. 1969. Ticks from Africa and the Mediterranean Bassin [French]. Published by CIRAD in 2003, CDROM.
- Niebylski, M. L.; Peacock, M. G.; Schwan, T. G. 1999. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on Its tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Applied and Environmental Microbiology** 65 (2): 773-778.
- Parker, R. P.; Philip, C. B.; Jellinson, W. L. 1933. Rocky Mountain spotted fever. Potentialities of tick transmission in relation to geographic occurrence in the United States. **The American Journal of Tropical Medicine** 13:241-378.
- Piranda, E. M.; Faccini, J. L. H.; Pinter, A.; Pacheco, R. C.; Cançado, P. H. D.; Labruna, M. B. 2011. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. **Vector-borne and zoonotic diseases** 11 (1):29-36.
- Randolph, S. E. 1998. Ticks are not insects: consequences of contrasting vector biology for transmission potential. **Parasitology Today** 14 (5):186-192.
- Roux, V.; Raoult, D. 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. **Research in Microbiology** 146:385-396.
- Silveira, I. 2006. **Investigação da infecção pela bactéria *Rickettsia rickettsii* em carrapatos *Amblyomma triste* no Estado de São Paulo: isolamento e caracterização molecular da bactéria**: 1-54. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- Socolovschi, C.; Kernif, T.; Raoult, D.; Parola, P. 2012. *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* species in bat ticks, France, 2010. **Emerging Infectious Diseases** 18 (12):1966-1975.
- Sonenshine, D. E. 1993. Ecology of nidicolous ticks. In: **Biology of ticks**. Vol. 2. Oxford University Press, New York, 465p.
- Souza, C. E.; Moraes-Filho, J.; Ogrzewalska, M.; Uchoa, F. C.; Horta, M. C.; Souza, S. S. L.; Borba, R. C. M. Labruna, M. B. 2009. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology** 16 (1):116-121.
- Stromdahl, E. Y.; Vince, M. A.; Billingsley, P. M.; Dobbs, N. A.; Williamson, P. C. 2008. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma americanum* larvae. **Vector Borne Zoonotic Diseases** 8 (1):15-24.
- Vial, L. 2009. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. **Parasite** 16:191-202.
- Vieira, A. M. L.; Souza, C. E.; Labruna, M. B.; Mayo, R. C.; Souza, S. S. L.; Camargo-Neves, V. L. F. 2004. **Manual de Vigilância Acarológica**. A Secretaria. São Paulo, Brasil, 62p.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS GERAIS

- Arthur, R. D. 1961a. Host preferences and the behavior of feeding and fed ticks. *In*: Arthur, R. D. **Ticks and Disease**. Pergamon Press Ltd. New York, USA, 236-269p
- Arthur, R. D. 1961b. Rickettsiae transmitted by ticks. *In*: Arthur, R. D. **Ticks and Disease**. Pergamon Press Ltd. New York, USA, 352-384p.
- Azad, A. F.; Beard, C. B. 1998. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerging Infectious Diseases** 4 (2):179-196.
- Baldo, L.; Hotopp, J. C. D.; Jolley, K. A.; Bordenstein, S. R.; Biver, S. A.; Chourdury, R. R.; Hayashi, C.; Maiden, M. C. J.; Tettelin, H.; Werren, J. H. 2006. Multilocus sequence typing system for the endosymbiont *Wolbachia pipientis*. **Applied and Environmental Microbiology** 72 (11): 7098-7110.
- Baldrige, G. D.; Burkhard, N. Y.; Simser, J. A.; Kurtti, T. J.; Munderloh, U. G. 2004. Sequence and expression analysis of the *ompA* of *Rickettsia peacockii*, an endosymbiont of the Rocky Mountain wood tick, *Dermacentor andersoni*. **Applied and Environmental Microbiology** 70 (11):6628-6636.
- Beck, A. F.; Holscher, K. H.; Butler, J. F. 1986. Life cycle of *Ornithodoros turicata americanus* (Acari: Argasidae) in the laboratory. **Journal Medical Entomology** 23 (3):313-319.
- Burgdorfer, W.; Friedhoff, K. T.; Lancaster JR., J. L. 1966. Natural history of tick-borne spotted fever in the USA. **Bulletin of the World Health Organization** 35:149-153.
- Burgdorfer, W.; Varma, M. G. R. 1967. Trans-stadial and transovarial development of disease agents ins arthropods. **Annual Review of Entomology** 12:347-376.
- Burgdorfer, W.; Brinton, L.P. 1975. Mechanisms of transovarial infection of spotted fever Rickettsiae in ticks. **Annals of the New York Academy of Sciences** 266:61-72.
- Burgdorfer, W. 1988. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. *In*: Walker, D.H. **Biology of Rickettsial Diseases**. Boca Raton. CRC Inc, 33-50p.
- Cutler, S. J.; Browning, P.; Scott, J. C. 2006. *Ornithodoros moubata*, a soft tick vector for *Rickettsia* in East Africa. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1078:373-377. Davis, G.E.; Hoogstraal, H. 1954. The relapsing fevers: A survey of the tick-borne spirochetes of Egypt. **Journal Egyptian Public Health Association** 29:139-143.
- Estrada-Peña, A.; Jongejan, F. 1999. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting *Ixodoidea* with special reference to pathogen transmission. **Experimental and Applied Acarology** 23:685-715.
- Fenn, K.; Conlon, C.; Jones, M.; Quail, M. A.; Holroy, E.; Parkhill, J.; Blaxter, M. 2006. Phylogenetic relationships of the *Wolbachia* of nematodes and arthropods. **PLoS Pathogens** 2 (9):0887-0899.
- Fenollar, F.; La Scola, B.; Inokuma, H.; Dumler, J. S.; Taylor, M. J.; Raoult, D. 2003. Culture and phenotypic characterization of a *Wolbachia pipientis* isolate. **Journal of Clinical Microbiology** 41 (12):5434-5441.
- Foot, N. C. 1919. Rocky Mountain Spotted Fever in the domestic rabbit. **Journal of Medical Research** 39:495-507.
- Fortes, F. S.; Silveira, I.; Moraes-Filho, J.; Leite, R. V.; Bonacim, J. E.; Biondo, A. W.; Labruna, M. B.; Molento, M. B. 2010. Seroprevalence of *Rickettsia bellii* and *Rickettsia felis* in dogs, São José dos Pinhais, State of Paraná, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária, Jaboticabal** 19 (4):222-227.

- Freitas, L. H. T.; Faccini, J. L. H.; Labruna, M. B. 2009. Experimental infection of the rabbit tick, *Haemaphysalis leporispalustris*, with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, and comparative biology of infected and uninfected tick lineages. **Experimental and Applied Acarology** 47:321-345.
- Galvão, M. A. M. & Ribeiro, J. G. L. 1993. Febre maculosa. *In*: Pedrosa, E. R. P., Rocha, M. O. C., Silva, O. A. (Ed.) **Clínica médica; os princípios da prática ambulatorial**. Atheneu. São Paulo, Brasil, 1374-1380p.
- Galvão, M. A.; Silva, L. J.; Nascimento, E. M. M.; Simone, C. B.; Sousa, R.; Bacellar, F. 2005. Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. **Revista de Saúde Pública** 39 (5):850-856.
- Greca, H.; Langoni, H.; Souza, L. C. 2008. Brazilian Spotted Fever: a reemergente zoonosis. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases** 14 (1): 3-18.
- Guedes, E.; Leite, R. C.; Prata, M. C. A.; Pacheco, R. C.; Walker, D. H. 2005. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 100 (8): 841-845.
- Guimarães, J. H.; Tucci, E. C.; Barros-Battesti, D. M. 2001. **Ectoparasitos de importância veterinária**. Plêiade/FAPESP. São Paulo, Brasil, 213p.
- Gunders, A. E.; Gottlieb, D.; Goldberg, Z. 1979. Transmission of a *Rickettsia* of *Psammomys obesus* by of *Ornithodoros*. **Refuah Veterinarith** 36 (1):13-15.
- Hillyer, E. V.; Quesenberry, K. E. 1997. **Ferrets, rabbits and rodents. Clinical medicine and surgery**. 1ª ed. Saunders, 432p.
- Hoogstraal, H. 1967. Ticks in relation to human diseases caused by *Rickettsia* species. **Annual Review of Entomology** 12:377-420.
- Hoogstraal, H. 1985. Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. **Advances in Parasitology** 24:135-238.
- Jongejan, F.; Uilenberg, G. 2004. The global importance of ticks. **Parasitology** 129:S3-S14.
- Katz, G.; Camargo-Neves, V. L. F.; Angerami, R. N.; Nascimento, E. M. M.; Colombo, S. 2009. Situação epidemiológica e importância da febre maculosa no Estado de São Paulo. **Boletim Epidemiológico Paulista** 6 (69):4-13.
- Kent, R. J. 2009. Molecular methods for arthropod bloodmeal identification and applications to ecological and vector-borne disease studies. **Molecular Ecology Resurces** 9:4-18.
- Khalil, G. M.; Hoogstraal, H. 1981. The life cycle of *Ornithodoros (Alectorobius) amblus* (Acari: Ixodoidea: Argasidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology** 18 (2):134-139.
- Kocan, K. M. 1986. Development of *Anaplasma marginale* Theiler in ixodid ticks: Coordinated development of a rickettsial organism and its tick host. *In*: Sauer, J. R.; Hair, J. A. **Morphology, physiology, and behavioral biology of ticks**. Ellis Horwood Limited. England, 472-505p.
- Labruna, M. B.; Whitworth, T.; Horta, M. C.; Bouyer, D. H.; McBride, J. W.; Pinter, A.; Popov, V.; Gennari, S. M.; Walker, D. H. 2004. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. **Journal of Clinical Microbiology** 42 (1): 90-98.
- Labruna, M. B.; Ogrzewalska, M.; Soares, J. F.; Martins, T. F.; Soares, H. S.; Moraes-Filho, J.; Nieri-Bastos, F. A.; Almeida, A. P.; Pinter, A. 2011. Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. **Emerging Infectious Diseases** 17 (5):829-834.

- Landulfo, G. A.; Pevidor, L. V.; Sampaio, J. S.; Luz, H. R.; Onofrio, V. C.; Faccini, J. L. H.; Barros-Battesti, D. M. 2012. Life cycle of *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) under laboratory conditions. **Experimental & Applied Acarology** 58:69-80.
- Lima, V. L. C.; Souza, S. S. L.; Souza, C. E.; Vilela, M. F. G., Papaiordanou, P. M. O.; Del Guécio, V. M. F. 2003. Situação da febre maculosa na Região Administrativa de Campinas, São Paulo, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública** 19 (1):331-334.
- Manzano-Román, R.; Díaz-Martín, V.; Fuente, J.; Pérez-Sánchez. 2012. Soft ticks as pathogen vectors: distribution, surveillance and control. **Parasitology** 125-162.
- Mattila, J. T.; Burkhardt, N. Y.; Hutcheson, H. J.; Munderloh, U. G.; Kurtti, T. J. 2007. Isolation of cell lines and a Rickettsial endosymbiont from the soft tick *Carios capensis* (Acari: Argasidae: Ornithodorinae). **Journal of Medical Entomology** 44 (6):1091-1101.
- McDade, J. E.; Newhouse, V. F. 1986. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. **Annual Review of Microbiology** 40:287-309.
- Morel P.C. 1969. Ticks from Africa and the Mediterranean Bassin [French]. Published by CIRAD in 2003, CDROM.
- Niebylski, M. L.; Peacock, M. G.; Schwan, T. G. 1999. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on Its tick vector (*Dermacentor andersoni*). **Applied and Environmental Microbiology** 65 (2): 773-778.
- Noda, H.; Munderloh, U. G.; Kurtti, T. J. 1997. Endosymbionts of ticks and their relationship to *Wolbachia* spp. and tick-borne pathogens of humans and animals. **Applied and environmental microbiology** 63 (10):3926-3932.
- Parker, R. P.; Philip, C. B.; Jellinson, W. L. 1933. Rocky Mountain spotted fever. Potentialities of tick transmission in relation to geographic occurrence in the United States. **The American Journal of Tropical Medicine** 13:241-378.
- Parola, P.; Raoult, D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: an emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases** 32:897-928.
- Parola, P.; Paddock, C. D; Raoult, D. 2005. Tick-borne rickettsioses around de world: emerging diseases challenging old concepts. **Clinical Microbiology Reviews** 18 (4):719-756.
- Pinter A., Labruna M. B. 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Annals of the New York Academy of Sciences** 1078:523-530.
- Piranda, E. M.; Faccini, J. L. H.; Pinter, A.; Pacheco, R. C.; Cançado, P. H. D.; Labruna, M. B. 2011. Experimental infection of *Rhipicephalus sanguineus* ticks with the bacterium *Rickettsia rickettsii*, using experimentally infected dogs. **Vector-borne and zoonotic diseases** 11 (1):29-36.
- Policastro, P. F.; Raffel, S. J.; Schwan, T. G. 2011. Cotransmission of divergent relapsing fever spirochetes by artificially infected *Ornithodoros hermsi*. **Applied and Environmental Microbiology** 77 (24):8494-8499.
- Randolph, S. E. 1998. Ticks are not insects: consequences of contrasting vector biology for transmission potential. **Parasitology Today** 14 (5):186-192.
- Raoult, D.; Roux, V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. **Clinical Microbiology Reviews** 10 (4):694-719.
- Regnery, R. L.; Spruill, C. L.; Plikaytis, B. D. 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation if intraspecies sequences divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology** 173 (5): 1576-1589.
- Rehacek, J. 1965. Development of animal viruses and Rickettsiae in ticks and mites. **Annual Review of Entomology** 10:1-24.

- Roux, V.; Raoult, D. 1995. Phylogenetic analysis of the genus *Rickettsia* by 16S rDNA sequencing. **Research in Microbiology** 146:385-396.
- SAS. 2006. Institute Incorporation. **S.A.S. user's guide: Statistics**, Version 6.12. Cary: S.A.S Institute Inc.
- Shih, C-M.; Spielman, A. 1993. Accelerated transmission of Lyme disease spirochetes by partially fed vector ticks. **Journal of Clinical Microbiology** 31 (11):2878-2881.
- Shoura, S. M. E. 1987. The life cycle of *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* (Acari: Ixodoidea: Argasidae) in the laboratory. **Journal Medical Entomology** 24 (2):229-234.
- Silveira, I. 2006. **Investigação da infecção pela bactéria *Rickettsia rickettsii* em carrapatos *Amblyomma triste* no Estado de São Paulo: isolamento e caracterização molecular da bactéria**: 1-54. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo.
- Socolovschi, C.; Kernif, T.; Raoult, D.; Parola, P. 2012. *Borrelia*, *Rickettsia*, and *Ehrlichia* species in bat ticks, France, 2010. **Emerging Infectious Diseases** 18 (12):1966-1975.
- Sonenshine, D. E.; Anasios, G. 1960. Observations on the life history of the bat tick *Ornithodoros kelleyi* (Acarina: Argasidae). **The journal of parasitology** 46 (4):449-454.
- Sonenshine, D. E. 1993. Ecology of nidicolous ticks. In: **Biology of ticks**. Vol. 2. Oxford University Press, New York, 465p.
- Souza, C. E.; Souza, S. S. L.; Lima, V. L. C.; Calic, S. B.; Camargo, C. G. O.; Savani, E. S. M. M.; D'Auria, S. R. N.; Linhares, A. X.; Yoshinari, N. H. 2008. Serological identification of *Rickettsia* spp from the spotted fever group in capybaras in the region of Campinas - SP – Brazil. **Revista Ciência Rural** 38 (6):1694-1699.
- Souza, C. E.; Moraes-Filho, J.; Ogrzewalska, M.; Uchoa, F. C.; Horta, M. C.; Souza, S. S. L.; Borba, R. C. M. Labruna, M. B. 2009. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology** 16 (1):116-121.
- Stouthamer, R.; Breeuwer, J. A. J.; Hurst, G. D. D. 1999. *Wolbachia pipientis*: microbial manipulator of arthropod reproduction. **Annual Review of Microbiology** 53:71-102.
- Stromdahl, E. Y.; Vince, M. A.; Billingsley, P. M.; Dobbs, N. A.; Williamson, P. C. 2008. *Rickettsia amblyommii* infecting *Amblyomma americanum* larvae. **Vector Borne Zoonotic Diseases** 8 (1):15-24.
- Tijssse-Klasen E.; Braks, M.; Scholt, E-J.; Sprong, H. 2011. Parasites of vectors – *Ixodiphagus hookeri* and its *Wolbachia* symbionts in ticks in the Netherlands. **Parasites & Vectors** 4:228.
- Vial, L. 2009. Biological and ecological characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. **Parasite** 16:191-202.
- Vieira, A. M. L.; Souza, C. E.; Labruna, M. B.; Mayo, R. C.; Souza, S. S. L.; Camargo-Neves, V. L. F. 2004. **Manual de Vigilância Acarológica**. A Secretaria. São Paulo, Brasil, 62p.
- Walker, D. H.; Harrison, A.; Henderson, F.; Murphy, F. A. 1977. Identification of *Rickettsia rickettsii* in a Guinea Pig Model by Immunofluorescent and Electron Microscopic Techniques. **American Journal of Pathology** 88(2):343-352.
- Werren, J. H.; Windsor, D.; Guo, L. 1995a. Distribution of *Wolbachia* among neotropical arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London B** 262:197-204.
- Werren, J. H.; Jaenike, J. 1995b. *Wolbachia* and cytoplasmic incompatibility in mycophagous *Drosophila* and their relatives. **Heredity** 75:320-326.
- Werren, J. H.; Zhang, W.; Guo, L. 1995c. Evolution and phylogeny of *Wolbachia*: reproductive parasites of arthropods. **Proceedings of the Royal Society of London B** 261:55-71.

- Werren, J. H. 1997. Biology of *Wolbachia*. **Annual Review of Entomology** 42:587-609.
- ZAR, J.H. 1999. **Biostatistical analysis**. 4^a ed. Prentice-Hall, New Jersey. 663p., 1999.
- Zhou, W.; Rousset, F.; O'Neill, S. 1998. Phylogeny and PCR-based classification of *Wolbachia* strains using *wsp* gene sequences. **Proceedings of the Royal Society of London B** 265:509-515.

ANEXOS

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o conteúdo de minha dissertação de Mestrado intitulada: Competência vetorial de *Ornithodoros mimon* (Kohls 1969) (Acarí: Argasidae) frente à infecção experimental com cepa de *Rickettsia rickettsii* (Ricketts 1909) em laboratório:

não se enquadrará no § 3º do Artigo 1º da Informação CCPG 01/08, referente a bioética e biossegurança.

Tem autorização da(s) seguinte(s) Comissão(ões):

CIBio – Comissão Interna de Biossegurança, projeto No. _____, Instituição:

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais, projeto No. 2508-1 e 2795-1, Instituição: Universidade Estadual de Campinas.

CEP - Comissão de Ética em Pesquisa, protocolo No. _____, Instituição:

* Caso a Comissão seja externa ao IB/UNICAMP, anexar o comprovante de autorização dada ao trabalho. Se a autorização não tiver sido dada diretamente ao trabalho de tese ou dissertação, deverá ser anexado também um comprovante do vínculo do trabalho do aluno com o que constar no documento de autorização apresentado.

Caroline da Queiroz Gomes
Aluna: (nome completo)

AXL
Orientador: (nome completo)
Aricio Xavier/Linhães
Matr. 03685-4

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido Indeferido

Carimbo e assinatura

Prefa. Dra. ANA MARIA APARECIDA GUARALDO
Presidente da CEUA/UNICAMP

Para uso da Comissão ou Comitê pertinente:

Deferido Indeferido

Carimbo e assinatura

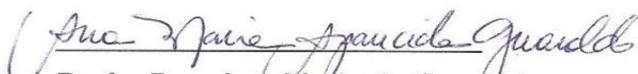
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

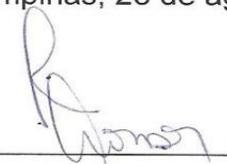
CERTIFICADO,

Certificamos que o projeto "Avaliação da competência vetorial de *Ornithodoros mimon* para *Rickettsia rickettsii*" (protocolo nº 2508-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Arício Xavier Linhares / Caroline Siqueira Franco, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 23 de agosto de 2011.

Campinas, 23 de agosto de 2011.


Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente


Fátima Alonso
Secretária Executiva

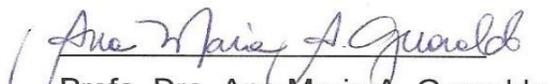
**Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp**

CERTIFICADO

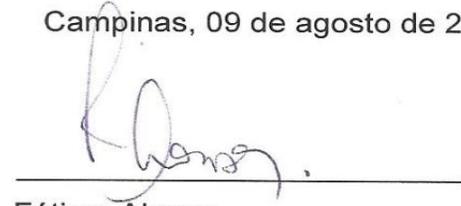
Certificamos que o projeto "Avaliação da competência vetorial de *Ornithodoros mimon* para *Rickettsia rickettsii*" (protocolo nº 2795-1), sob a responsabilidade de Prof. Dr. Arício Xavier Linhares / Caroline Siqueira Franco, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 09 de agosto de 2012.

Campinas, 09 de agosto de 2012.



Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente



Fátima Alonso
Secretária Executiva