

ANGELA CAROLINA GUILLEN

**Avaliação da competência de aves passeriformes *Turdus*
sp como hospedeiro amplificador da bactéria *Rickettsia*
rickettsii para carrapatos da espécie *Amblyomma aureolatum*
em condições de laboratório**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria do Controle de Doenças da Secretaria do Estado da Saúde de São Paulo, para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública.

Orientador: Prof. Dr. Adriano Pinter dos Santos

SÃO PAULO

2014

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Centro de Documentação – Coordenadoria de Controle de Doenças/SES-SP

©reprodução autorizada pelo autor, desde que citada a fonte

Guillen, Angela Carolina

Avaliação da competência de aves passeriformes *Turdus sp.* como hospedeiro amplificador da bactéria *Rickettsia rickettsii* para carrapatos da espécie *Amblyomma aureolatum* em condições de laboratório / Angela Carolina Guillen - São Paulo, 2014.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Ciências da Coordenadoria de Controle de Doenças da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo.

Área de concentração: Pesquisas Laboratoriais em Saúde Pública

Orientador: Adriano Pinter dos Santos

1. Carrapatos
2. Aves
3. *Rickettsia rickettsii*
4. Febre maculosa das montanhas rochosas/epidemiologia

SES/CCD/CD- 287/14

Nada te perturbe, nada te espante,
Tudo passa, Deus não muda,
A paciência tudo alcança;
Quem a Deus tem, nada lhe falta:
Só Deus basta.

DEDICATÓRIA

Ao meu querido Gustavo que não desanima nunca
A minha pequena Catarina que é nosso pedacinho do céu

AGRADECIMENTOS

Ao meu querido (des)orientador Dr. Adriano Pinter dos Santos pela amizade e, sobretudo, por me ensinar, que “faz parte”.

Gabriela Takeda pela ajuda durante todo o experimento e por todas as conversas enquanto o PCR não saia

A Maria Ogrzewalska pela ajuda com a coleta de sangue das aves

Ao Ibama por me conceder a guarda dos animais

Ao pesquisador Alexsander Zamorano, ele foi o precursor de tudo

Aos meus amigos Fernanda Federici e Adriano Leite por me acolherem em São Paulo e me ajudarem com a minha pequenina, sem eles não teria qualificado.

RESUMO

Carrapatos são importantes vetores de agentes infecciosos. A fauna ixodológica do Brasil é atualmente composta por mais de 60 espécies, mas apenas as riquetsioses são reconhecidas zoonoses transmitidas por carrapatos. A Febre Maculosa Brasileira tem como agente etiológico a bactéria *Rickettsia rickettsii*, transmitida na região Metropolitana de São Paulo pelo carrapato *Amblyomma aureolatum*, esse carrapato utiliza aves passeriformes, em especial o sabiá (*Turdus* sp), como hospedeiros primários das fases imaturas. É conhecido que os hospedeiros das fases subadultas dos carrapatos costumam desempenhar o importante papel de amplificadores da bactéria *R. rickettsii*, assim *Turdus* sp podem ser uma importante fonte de amplificação do agente etiológico para a população de carrapatos. No presente estudo foram realizadas quatro infestações experimentais seriadas (7 dias entre infestações) com ninfas de *A. aureolatum* em cinco indivíduos do gênero *Turdus* sp. A primeira infestação foi feita com cinco ninfas da colônia não infectada, a segunda foi realizada com cinco ninfas previamente infectadas com *R. rickettsii* (identificadas com a amputação do metatarso da pata esquerda III) e cinco susceptíveis, a terceira e a quarta foram realizadas com ninfas suscetíveis. Todas as ninfas de *A. aureolatum* alimentadas foram deixadas para realizar ecdise e os adultos subsequentes foram macerados e parte foi inoculado em cobaias e parte foi submetido à PCR, assim como amostras de sangue das aves colhidas em cada uma das infestações, para detecção de *R. rickettsii* para os genes *gltA*; *htrL* e *ompA*. Apenas as ninfas da colônia infectada foram positivas na PCR, todas as ninfas susceptíveis e o sangue colhido das aves se mostraram negativas, assim como nenhuma cobaia apresentou manifestação clínica compatível com infecção por *R. rickettsii*. Os resultados mostram que *Turdus* sp não desempenha o papel de amplificador de *R. rickettsii* para ninfas de *A. aureolatum*.

Palavras-chave: Carrapato. Aves. *Rickettsia rickettsii*. Febre Maculosa das Montanhas Rochosas. Epidemiologia

ABSTRACT

Ticks are important vectors of infectious agents. The ixodological fauna of Brazil is currently comprised of over 60 species, but only the tick-borne rickettsial diseases are recognized as zoonoses. The Brazilian Spotted Fever etiologic agent has as agent *Rickettsia rickettsii*, transmitted in the metropolitan region of São Paulo by the tick *Amblyomma aureolatum*, this tick uses passerine birds, especially the Brazilian Robin (*Turdus* sp) as primary hosts of the immature stages. It is known that the hosts of subadult stages of ticks often play an important role as amplifiers of *R. rickettsii*, so *Turdus* sp can be an important source of amplifying the etiologic agent for the tick population. In the present study four serial experimental infestations (7 days between infestations) with nymphs of *A. aureolatum* in five individuals of the genus *Turdus* sp were performed. The first infestation was performed with five nymphs taken from an uninfected colony, the second was performed with five previously infected nymphs by *R. rickettsii* (identified with the amputation of the left paw metatarsal III) and five susceptible nymphs, the third and fourth infestations were performed with susceptible nymphs. All of the nymphs that fed on *A. aureolatum* were allowed to accomplish ecdysis and the subsequent adults were macerated and part was inoculated into guinea pigs and part was subjected to PCR as well as blood samples taken from birds from each infestation, for detection of *R. rickettsii* for the genes *gltA*; *htrL* and *ompA*. Only nymphs from the infected colony were positive in the PCR, all the susceptible nymphs and the collected blood were negative, as well as none of the guinea pigs showed clinical signs compatible with infection by *R. rickettsii*. The results show that *Turdus* sp doesn't act as *R. rickettsii* amplifier for *A. aureolatum* nymphs.

Key words: Ticks. Birds. *Rickettsia rickettsii*. Rocky Mountain Spotted Fever. Epidemiology

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Altura
°C	Graus Celsius
C	Comprimento
BHI	Infusão Cérebro Coração
B.O.D.	Demanda Biológica de Oxigênio
BSA	Albumina de Soro Bovino
DNA	Ácido desoxirribonucléico
GFM	Grupo da Febre Maculosa
g	Gravidade Terrestre
HEPA	High Efficiency Particle Arresting
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC	Infestação Controle
L	Largura
M	Molar
ml	Mililitro
ng	Nanograma
PBS	Tampão Fostato-Salino
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pb	Pares de Base
pH	Potencial Hidrogeniônico
RIFI	Reação de Imunoflorescência Indireta
SP	São Paulo
SUCEN	Superintendência para o Controle de Endemias
Taq	DNA polimerase termoestável extraída da bactéria <i>Thermus aquaticus</i>

μl	Microlitro
UR	Umidade Relativa
%	Por cento
®	Marca registrada
Vero	Linhagem celular de rim macaco verde africano

Obs: Algumas abreviaturas seguem as iniciais de sua grafia no idioma inglês, visto terem seu uso consagrado na literatura técnica.

LISTA DE TABELAS E FIGURAS

Pag

Tabela 1	<i>Rickettsia spp</i> detectadas celular a partir de carrapatos no Brasil.	16
Figura 1	Esquema de liberação de ninfas de carrapatos <i>Amblyomma aureolatum</i> nos hospedeiros <i>Turdus rufiventris</i> e <i>Turdus flavipes</i> e o período esperado de parasitismo de acordo com o dia experimental.	27
Figura 2	Esquema esperado de inoculação em <i>Cavia porcellus</i> por grupos de ninfas de carrapatos <i>Amblyomma aureolatum</i> alimentadas e recuperadas em cada infestação e em cada uma das cinco aves <i>Turdus sp</i> .	28
Tabela 2	Resultado da recuperação de ninfas de carrapatos <i>A. aureolatum</i> alimentadas em aves <i>Turdus sp</i> na Infestação Controle.	31
Tabela 3	Resultado da recuperação de ninfas de carrapatos <i>A. aureolatum</i> alimentadas em aves <i>Turdus sp</i> na Primeira Infestação Experimental.	32
Tabela 4	Resultado da análise por PCR das ninfas de carrapatos <i>A. aureolatum</i> recuperadas após I Infestação para os primers <i>gltA</i> , <i>hrtL</i> e <i>ompA</i> .	32
Tabela 5	Resultado da recuperação de ninfas de carrapatos <i>Amblyomma aureolatum</i> alimentadas em aves <i>Turdus sp</i> na Segunda Infestação.	33
Tabela 6	Resultado da recuperação de ninfas de carrapatos <i>Amblyomma aureolatum</i> alimentadas em aves <i>Turdus sp</i> na Terceira Infestação.	33
Tabela 7	Coleta de sangue das aves <i>Turdus rufiventris</i> e <i>Turdus flavipes</i> de acordo com o dia experimental.	34
Figura 3	Esquema de inoculação intraperitoneal em cobaias (<i>Cavia porcellus</i>) das ninfas de carrapato <i>Amblyomma aureolatum</i> recuperadas após infestações experimentais no Sabiá 1 (<i>Turdus flavipes</i>).	35
Figura 4	Esquema de inoculação intraperitoneal em cobaias (<i>Cavia porcellus</i>) das ninfas de carrapato <i>Amblyomma aureolatum</i> recuperadas após infestações experimentais no Sabiá 2 (<i>Turdus rufiventris</i>).	36

Figura 5	Esquema de inoculação intraperitoneal em cobaias (<i>Cavia porcellus</i>) das ninfas de carrapato <i>Amblyomma aureolatum</i> recuperadas após infestações experimentais no Sabiá 3 (<i>Turdus rufiventris</i>).	37
Figura 6	Esquema de inoculação intraperitoneal em cobaias (<i>Cavia porcellus</i>) das ninfas de carrapato <i>Amblyomma aureolatum</i> recuperadas após infestações experimentais no Sabiá 4 (<i>Turdus rufiventris</i>).	38
Figura 7	Esquema de inoculação intraperitoneal em cobaias (<i>Cavia porcellus</i>) das ninfas de carrapato <i>Amblyomma aureolatum</i> recuperadas após infestações experimentais no Sabiá 5 (<i>Turdus rufiventris</i>).	39
Tabela 8	Monitoramento da temperatura real das cobaias (<i>Cavia porcellus</i>) inoculadas com macerado de ninfas de carrapato <i>Amblyomma aureolatum</i> .	40
Tabela 10	Resultado da análise por PCR dos fígados de cobaias (<i>Cavia porcellus</i>) necropsiados.	41
Tabela 11	Resultado da análise por PCR dos baços de cobaias (<i>Cavia porcellus</i>) necropsiados.	41

ÍNDICE

1. Introdução.....	14
2. Objetivos.....	22
3. Material e Métodos.....	23
3.1 Carrapatos.....	23
3.2 <i>Rickettsia rickettsii</i>.....	23
3.3 Infecção experimental da colônia de carrapatos <i>A. aureolatum</i>.... por <i>R. rickettsii</i>	24
3.4 Obtenção de ovos, larvas e ninfas infectadas por <i>R. rickettsii</i>.....	24
3.5 Delineamento experimental.....	25
3.5.1 Aves.....	25
3.5.2 Acondicionamento.....	25
3.5.3 Grupo experimental.....	26
3.5.3.1 Transmissão horizontal.....	26
3.5.3.2 Teste da transmissão horizontal.....	28
3.5.3.3 Desinfecção e descarte das carcaças e fômites.....	29
3.6 Extração de DNA.....	29
3.7 Detecção de <i>R. rickettsii</i> pela PCR.....	29
4. Resultados.....	31
4.1 Grupo de carrapatos alimentados e recuperados após Infestação Controle.....	31
4.2 Grupo de carrapatos alimentados e recuperados após Primeira Infestação.....	31
4.3 Grupos de carrapatos alimentados e recuperados após Segunda e Terceira Infestação.....	33

4.4 Avaliação de Infecção Sistêmica em aves do gênero <i>Turdus sp</i> por <i>R. rickettsii</i> através de sangue.....	35
4.5 Inoculação das ninfas de carrapato <i>A. aureolatum</i> recuperadas após infestações em cobaias (<i>Cavia porcellus</i>)	35
4.6 Monitoramento dos sinais clínicos e hipertermia das cobaias inoculadas	40
4.7 Avaliação por PCR de fragmentos de baço e fígado necropsiados de cobaias após inoculação.....	41
5.Discussão.....	42
6.Conclusão.....	48
7. Referências.....	49
8.0 Apêndice.....	57
8.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisas com Animais da Faculdade de Medicina do ABC.....	57

1. Introdução

Os carrapatos pertencem ao Filo Artropoda, Classe Aracnida, Subclasse Acarina, Ordem Ixodida. São considerados vetores de grande número de agentes infecciosos, entre eles riquetsias e outros tipos de bactérias, vírus e protozoários. Existem aproximadamente 870 espécies de carrapatos descritas mundialmente, mas apenas cerca de 10% assumem uma maior importância direta em saúde pública, devido às possibilidades desses carrapatos parasitarem humanos. Várias outras espécies que nunca foram descritas parasitando humanos assumem importante papel indireto na saúde pública pois, contribuem para a manutenção enzoótica de agentes infecciosos na natureza (Mcdade & Newhouse, 1986), além dos efeitos deletérios causados diretamente pela alimentação do ectoparasita.

No Brasil, apesar de sua variedade de biomas e de seu tamanho continental, a literatura ainda é muito escassa quando se refere à fauna ixodológica, hoje composta por aproximadamente 64 espécies de carrapatos (Aragão & Fonseca, 1961; Dantas-Torres et al., 2009, 2012; Guimarães et al., 2001; Labruna e Venzal, 2009; Nava et al., 2010). Recentemente, um estudo reavaliou o status taxonômico de *Amblyomma cajennense*, mostrando que *Amblyomma cajennense* s.s. é encontrada na região amazônica e que *A. sculptum* é encontrado centro-oeste do Brasil (Nava et al., 2014). Ainda assim, apenas a Febre Maculosa Brasileira e a Febre da Mata Atlântica (Spolidorio et al., 2010) são reconhecidas, atualmente, como zoonoses transmitidas por carrapatos no país.

A febre maculosa brasileira, causada pela bactéria da espécie *Rickettsia rickettsii*, foi primeiramente descrita nos Estados Unidos onde a doença recebeu o nome de Febre Maculosa das Montanhas Rochosas. Neste país, o pesquisador Dr. Howard Taylor Ricketts efetuou o primeiro isolamento de *R. rickettsii* no início do século XX, quando também estabeleceu o papel do carrapato *Dermacentor andersoni* (Stiles, 1908), na transmissão da doença (Ricketts, 1909). Atualmente, *D. andersoni* é o vetor da *R. rickettsii* na costa oeste, enquanto que *Dermacentor variabilis* (Say, 1821), é o vetor na costa leste dos Estados Unidos. Ambas espécies foram estudadas quanto a sua biologia, ecologia e competência vetorial (Mcdade & Newhouse, 1986; Sonenshine, 1993).

R. rickettsii também ocorre endemicamente no México (febre manchada), Colômbia (febre de Tobia), Costa Rica e Panamá (Bustamante & Varela, 1947; Dias & Martins, 1939; Patino et al., 1937; Philip et al., 1978; Rodaniche, 1953). Diferente dos Estados Unidos, nesses países, incluindo o Brasil, a bactéria é transmitida primariamente por carrapatos do gênero *Amblyomma* (Labruna, 2009).

O primeiro caso de febre maculosa brasileira foi descrito no ano de 1929 em São Paulo (Piza, 1932) onde atualmente estão localizados os bairros paulistanos de Sumaré, Perdizes e Pinheiros.

No início da década de 30 a doença foi descrita em Minas Gerais, sobretudo na região vale do Jequitinhonha (Dias & Martins, 1939) mas foram nas últimas duas décadas que o estudo sobre riquetsias em carrapatos sofreu um imenso incremento.

Até o ano 2000, apenas uma bactéria pertencente ao Grupo da Febre Maculosa, *Rickettsia rickettsi*, era conhecida no país, desde então, esse número aumentou para cinco espécies com a inclusão de *R. parkeri*, *R. rhipicephali*, *R. amblyommii*, e *R. felis* (Labruna *et al.*, 2011a).

Melles *et al.* (1992) e Melles *et al.* (1999) isolaram pelo menos duas amostras de riquetsias do GFM, porém não caracterizadas, de carrapatos *A. dubitatum* (Neumann, 1899), provenientes de áreas endêmicas para febre maculosa no Estado de São Paulo. Além destas, diversas espécies de riquetsias foram isoladas em cultivo celular a partir de carrapatos, conforme **Tabela 1**.

Tabela 1 - *Rickettsia spp* detectadas a partir de carrapatos no Brasil

Ano	<i>Rickettsia</i>	Espécie de carrapato	Referência
2004 2007	<i>R. amblyommi</i>	<i>Amblyomma cajennense</i>	Labruna et al, 2004c.
2007	<i>R. parkeri</i>	<i>Amblyomma triste</i>	Silveira et al., 2007.
2007	<i>R. rhipicephali</i>	<i>Haemaphysalis juxtakochi</i>	Labruna et al., 2007.
2005 2006	<i>R. rickettsii</i>	<i>A. cajennense</i> , <i>A. aureolatum</i>	Guedes et al., 2005; Pinter & Labruna, 2006.
2004 2006 2007	<i>Rickettsia bellii</i>	<i>Amblyomma dubitatum</i> (como <i>A.cooperi</i>), <i>A.aureolatum</i> , <i>A.ovale</i> , <i>A. oblongoguttatum</i> , <i>A. rotundatum</i> , <i>A. scalpturatum</i> , <i>A. neumanni</i> , <i>H. juxtakochi</i> , <i>Ixodes loritcatus</i> .	Horta, 2006; Labruna 2004a ,2007; Pinter, 2006.
2004	<i>Candidatus "R.amblyommi"</i>	<i>Amblyomma longirostre</i> , <i>A.coelebs</i>	Labruna et al., 2004b; Labruna, 2007.
2004	<i>R. parkeri cepa COOPERI</i>	<i>A. dubitatum</i>	Labruna et al., 2004a.
2005 2007	<i>R. rhipicephali</i>	<i>H. juxtakock</i>	Labruna et al., 2005a; Labruna 2007.
2008	<i>Rickettsia sp cepa AL</i>	<i>A. longirostre</i>	Ogrzewalska, 2008.
2004	<i>Rickettsia sp cepa ARANHA</i>	<i>A. longirostre</i>	Labruna, 2004.

A transmissão transovariana e perpetuação transestadial de riquetsias faz dos carrapatos importantes reservatórios da bactéria no ambiente. Para muitas espécies de

riquétsia (ex. *Rickettsia africae*, *R. rhipicephali*) este mecanismo de sobrevivência na população de carrapato é tão eficiente, que possivelmente garante, por si só, a manutenção da riquétsia na natureza. Para *R. rickettsii*, este mecanismo é menos eficiente, pois a infecção por esta espécie de riquétsia no carrapato pode diminuir a capacidade reprodutiva de fêmeas, podendo ser, inclusive, letal para o ixodídeo (Burgdofer, 1988; Niebylski et al., 1999). Portanto, mesmo que os mecanismos de transmissão transovariana e perpetuação transestadial sejam extremamente importantes para a sobrevivência de *R. rickettsii* na natureza, por si só, não devem ser suficientes para a manutenção da bactéria.

Neste caso, os animais vertebrados, hospedeiros naturais dos carrapatos, vetores da *R. rickettsii*, devem assumir um papel fundamental na amplificação da infecção por *R. rickettsii* na população de carrapatos (Cooksey et al., 1990; Randolph, 1998). Diante desta premissa, pesquisadores vêm buscando encontrar animais silvestres naturalmente infectados por *R. rickettsii*, a fim de compreender melhor a ecologia da febre maculosa.

A possibilidade da participação de animais silvestres no ciclo da febre maculosa foi primeiramente sugerida por Ricketts (1909) mas o feito de isolar, pela primeira vez, uma amostra do agente causador da febre maculosa a partir de um animal silvestre foi de Moreira & Magalhães (1935). Os autores conseguiram reproduzir a doença em cobaias, após inoculação de sangue colhido de um gambá *Didelphis* sp proveniente do Estado de Minas Gerais.

Moreira & Magalhães (1937) também listaram, através do diagnóstico indireto por Weil-Felix, possíveis reservatórios silvestres do agente da febre maculosa brasileira (FMB), o gambá, *D. aurita*; o cachorro do mato, *Dusicyon* sp (*Sin Canis Brasiliensis*); o coelho do mato, *Sylvilagus brasiliensis* (*Sin Sylvilagus minensis*); o preá, *Cavia aperea* e a cutia, *Dasyprocta azarae*.

Na década de 1940, Travassos & Vallejo (1942a) verificaram que o preá era suscetível ao agente da FMB quando inoculado em laboratório e desenvolvia a doença, à semelhança da cobaia. Capivaras (*Hydrochaerus hydrochaerus*), no entanto, não apresentavam qualquer sintoma clínico através de inoculação experimental, embora fosse possível isolar o agente de seu sangue e órgãos, a partir do quinto dia, até 11º dia pós-inoculação. Os autores não obtiveram sucesso em nenhuma das tentativas de isolar o agente de preás e capivaras capturados em áreas de ocorrência da doença, mas constataram que alguns preás trazidos da natureza eram refratários à inoculação, em laboratório, pelo agente da febre maculosa brasileira. Permitindo-lhes concluir que esses animais já haviam tido contato com a doença na natureza e sobreviveram.

Travassos & Vallejo (1942b) também mostraram a infecção de carrapatos adultos *A. cajennense* após se alimentarem em capivaras experimentalmente infectadas pelo agente da febre maculosa brasileira. No entanto, os carrapatos utilizados no ensaio foram colhidos parasitando cavalos em condições naturais, assim sendo, os pesquisadores não puderam constatar seguramente que esses carrapatos estavam previamente livres de infecção.

Entre o período de 1942 a 2009, não houve publicação nos principais periódicos científicos de qualquer estudo testando animais silvestres hospedeiros de carrapatos da América do Sul como reservatórios ou amplificadores da bactéria *R. rickettsii* em condições de laboratório. Os estudos foram retomados recentemente por Souza *et al.* (2009) que mostrou que a capivara quando infectada pela bactéria *R. rickettsii* não desenvolve a doença de forma clínica, entretanto, apresenta riquetsemia e se torna uma importante fonte de infecção da bactéria para carrapatos *A. cajennense* suscetíveis durante o período aproximado de 15 dias.

O segundo estudo neste campo foi publicado por Horta *et al.* (2009) que mostrou que o gambá *D. aurita* quando infectado pela bactéria *R. rickettsii* também não desenvolve a doença e atua como fonte de infecção para carrapatos *A. cajennense* mas de forma pouco eficiente.

Embora os estudos sobre a doença tenham avançado de forma importante na última década, ainda não é claro qual é a participação de algumas espécies de animais vertebrados como hospedeiros para os carrapatos e amplificadores da bactéria *R. rickettsii*. Em alguns hospedeiros vertebrados naturais, infecções podem resultar em riquetsemia que permite carrapatos não infectados adquirirem infecção, há também outros animais que desenvolvem riquetsemias a níveis tão baixos ou tão transitóriamente que podem ser incapazes de servir de fonte de infecção para carrapatos susceptíveis (Lundgreen, 1966; Horta *et al.*, 2009).

Questões a respeito da competência de aves e outros animais vertebrados como hospedeiros amplificadores ainda não estão resolvidas ou completamente entendidas em relação a transmissão da febre maculosa onde o carrapato vetor é a espécie *A. aureolatum*.

O carrapato *A. aureolatum* é uma espécie Neotropical, com relatos no Brasil, Argentina, Guiana Francesa e Paraguai (Guglielmone *et al.*, 2003). Exige umidade relativa do ar maior que 95% e temperatura do ar média em torno de 23°C para completar o ciclo da vida (Pinter *et al.*, 2004). Estas condições ambientais podem ser encontradas na Mata Atlântica ao longo da costa Brasileira em altas altitudes, onde o microclima é propício para

essa espécie e de onde surgem mais relatos de sua ocorrência (Guglielmone et al., 2003).

Os adultos de *A. aureolatum* apresentam alta especificidade por carnívoros. Em áreas rurais, onde animais domésticos têm acesso às áreas de florestas, cães domésticos são frequentemente parasitados pelas formas adultas dessa espécie (Pinter et al., 2004). Entre os animais selvagens, os hospedeiros principais são o cachorro do mato (*Cerdocyon thous*) e o mão-pelada (*Procyon cancrivorus*) (Guimarães et al., 2001; Guglielmone et al., 2003; Labruna et al., 2001; Labruna et al., 2005b). Os adultos de *A. aureolatum* podem parasitar seres humanos (Guglielmone et al., 2006), sendo responsáveis pela transmissão de *R. rickettsii* em algumas áreas endêmicas no Estado de São Paulo (Dias & Martins, 1939; Pinter & Labruna, 2006, Ogrzewalska et al., 2012).

Os estágios imaturos de *A. aureolatum* foram encontrados em poucas espécies de mamíferos, entre eles, os roedores das espécies *Ctenomys* sp e *Euryzygomatomys spinosus* (Guglielmone et al., 2006). No entanto, aves silvestres, da ordem Passeriformes, especialmente espécies que têm hábitos de frequentar o solo a procura de insetos e que habitam os estratos mais baixos da floresta, são encontradas parasitadas com larvas e ninfas de *A. aureolatum* frequentemente. Sendo que, especialmente, aves do gênero *Turdus* tem sido relatadas como um importante hospedeiro para as fases de larva e ninfa (Arzua et al., 2003; Ogrzewalska et al., 2012 ; Pinter, 2007; Venzal et al., 2005).

Experimentos laboratoriais mostraram a preferência dos estágios imaturos de *A. aureolatum* por frangos (*Gallus gallus*) (Pinter et al., 2004), mostrando que este carrapato é altamente competente em se alimentar em aves. Adicionalmente, os resultados laboratoriais estão em concordância com os resultados de campo (Pinter, 2007) em que foram capturados 121 roedores da família Cricetidae em área de ocorrência de *A. aureolatum* e nenhum deles foi encontrado parasitado por essa espécie, embora tenha sido relatada na mesma área o parasitismo de aves e cães.

A despeito das aves silvestres, sabe-se que são importantes hospedeiros para algumas espécies de carrapatos. Além de cumprir o papel de carreadores mecânicos desses ectoparasitos. No Brasil, estudos mostraram o papel de aves silvestres como hospedeiro para estágios imaturos e adultos de *Ixodes auritulus* e *Ixodes paranaensis* (Arzua; Barros-Battesti, 1999; Arzua et al., 2003; Barros-Battesti et al., 2003), e para os estágios imaturos de *Amblyomma longirostre*, *A. calcaratum*, e *A. nodosum* (Aragão, 1911; Arzua; Barros-Battesti, 2005; Labruna et al., 2007d; Onofrio, 2005). Formas imaturas de

outras espécies de carrapatos foram registradas esporadicamente em aves como *Amblyomma pseudoconcolor*, e *Amblyomma brasiliense* (Aragão, 1911); *Amblyomma tigrinum* (Aragão, 1936; Evans; Guglielmone; Martins, 2000); *Ixodes fuscipes* (Arzua; Barros-Battesti; Onofrio, 2005); *A. cajennense* (Arzua; Barros-Battesti, 2005; Labruna *et al.*, 2007c; Onofrio, 2005) e *Amblyomma parkeri* (Ogrzewalska *et al.*, 2008). Adultos de *Rhipicephalus sanguineus* (Szabó *et al.*, 2008), e *Haemaphysalis juxtakochi* (Arzua; Barros-Battesti; Onofrio, 2005) também foram encontrados parasitando aves.

Algumas espécies de riquetsias foram encontradas em carrapatos parasitando aves. Entre elas, *R. rickettsii* foi encontrada em carrapatos parasitando as aves nos Estados Unidos (Sonenshine; Clifford, 1973); e *Rickettsia aeschlimanii*, *Rickettsia helvetica* e *R. massiliae* foram encontradas em carrapatos nas aves em Portugal (Santos-Silva *et al.*, 2006). Ioannou *et al.* (2009) encontrou *Rickettsia sp* em carrapatos coletados de aves migratórias em Cyprus. No Brasil, Candidatus `Rickettsia amblyommii` e *R. bellii* foram encontradas em *A. longirostre* coletados de aves silvestre na Mata Atlântica (Pinter, 2007; Ogrzewalska *et al.*, 2008).

Recentemente um estudo realizado na Europa revelou evidências moleculares de bacteremia em aves causada por *R. helvetica*. No estudo foram encontradas seis amostras de sangue de aves positivas na PCR para a presença de *R. helvetica* em cinco Pisco-de-peito-ruivo (*Erithacus rubecula*) e um Ferreirinha-comum (*Prunella modularis*), ambos da ordem Passeriformes. Os valores de CT do teste refletiram infecção bacteriana variando de níveis baixos até médios. (Hornok *et al.*, 2014)

No entanto, o papel das aves como amplificadoras da bactéria *R. rickettsii* foi testado experimentalmente em apenas um estudo realizado há várias décadas, por Lundgren *et al.* (1966) onde foi mostrado que algumas aves como o pombo, o faisão e o frango podem apresentar um período de riquetsemia por até 16 dias, embora não tenha sido verificado se desempenhariam o papel de fonte de infecção para carrapatos.

Para que uma ave seja uma importante fonte de infecção para carrapatos, esta deve apresentar riquetsemia sistêmica, a ponto de que a bactéria *R. rickettsii* se espalhe pelo tecido endotelial vascular do animal e seja acessada por carrapatos durante a fase de alimentação.

Outra maneira em que um animal poderia participar do ciclo natural de um agente patogênico, seria pelo fenômeno da coalimentação, descrito para carrapatos por Labuda

et al. (1993), Randolph *et al.* (1996) e Gern & Rais (1996) , neste caso carrapatos infectados se fixam no mesmo sítio de alimentação de carrapatos não infectados, as bactérias ou vírus são secretadas junto à saliva do carrapato infectado e são concomitantemente ingeridas por carrapatos suscetíveis, infectando-os. Também pode ocorrer a infecção por via linfática, onde células dentríticas de defesa fagocitam a bactéria ou vírus e migram pelo sistema linfático mas durante o trajeto são ingeridas por um carrapato que espacialmente não estava imediatamente próximo ao carrapato infectado, recentemente a amplificação horizontal de riquetsioses por coalimentação de carrapatos foi descrita de forma experimental por Zemtsova *et al.* (2010). Todos os estudos realizados até o momento sobre coalimentação utilizaram mamíferos como hospedeiros para o carrapato.

A despeito da importância da amplificação horizontal em carrapatos, esta hipótese jamais foi testada em aves. O presente projeto objetiva testar a hipótese de que os passeriformes do gênero *Turdus* podem desempenhar o papel de hospedeiro amplificador da bactéria *R. rickettsii*, sendo que serão testadas a transmissão por via local e por coalimentação .

Aves do gênero *Turdus* são importantes hospedeiros naturais para as fases imaturas do carrapato *A. aureolatum*, no presente estudo propomos testar se ninfas desta espécie de carrapato previamente infectadas com a bactéria *R. rickettsii* podem transmitir horizontalmente o agente para ninfas não infectadas (susceptíveis) quando ambas as fases se alimentam concomitantemente no mesmo animal.

2. Objetivos

2.1 Geral

Testar a hipótese de que aves passeriformes do gênero *Turdus* podem potencialmente participar no ciclo de vida da bactéria *Rickettsia rickettsii* como hospedeiros amplificadores sendo competentes na transmissão horizontal da bactéria entre ninfas infectadas e ninfas suscetíveis do carrapato da espécie *Amblyomma aureolatum*.

2.2 Específicos

1. Testar a hipótese de transmissão horizontal da bactéria *R. rickettsii* entre carrapatos por coalimentação devido ao compartilhamento do sítio de fixação dos carrapatos.

2. Testar a hipótese de infecção sistêmica nas aves e potencial capacidade de se tornar fonte de infecção para carrapatos.

3. Material e Métodos

Todos os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Entomologia da Divisão de Programas Especiais da SUCEN na Cidade de São Paulo, SP. Para manuseio da bactéria *Rickettsia rickettsii*, o laboratório contou com uma sala especial hermeticamente fechada e pressão negativa com exaustão forçada por filtro HEPA que exauri todo o volume de ar da sala a cada 15 minutos. O manuseio das amostras foi realizado em capela com fluxo laminar classe AII.

O insetário experimental onde foi realizado o experimento contou com telas de proteção e ante-sala, além de ser uma sala dedicada exclusivamente à ensaios biológicos com animais e artrópodes infectados.

3.1 Carrapatos

Foi utilizada uma colônia de carrapatos da espécie *A. aureolatum* proveniente da região metropolitana de São Paulo, do município de Mairiporã, a qual foi mantida no Laboratório de Entomologia da Divisão de Programas Especiais da SUCEN. As fases parasitárias da colônia foram mantidas em mamíferos (cobaias e cães) sem infestação prévia por carrapatos e as fases de vida livre foram mantidas em incubadoras B.O.D. ajustada na temperatura de 23°C e a UR de 95%, conforme previamente estabelecido para esta espécie de carrapatos (PINTER *et al.*, 2002; PINTER *et al.*, 2004).

3.2 *Rickettsia rickettsii*

Para este estudo, foi utilizada a cepa Taiacu de *R. rickettsii*, originalmente isolada de um espécime de carrapato *A. aureolatum* proveniente do Município de Mogi das Cruzes, São Paulo (Pinter & Labruna, 2006). Esta cepa foi amplificada pela inoculação do homogeneizado deste espécime de carrapato em cobaias, sendo posteriormente mantidas em uma cultura *in vitro* de células Vero . Para o presente estudo, entretanto, foram utilizadas amostras de órgãos de cobaias infectadas com a cepa, sem qualquer passagem pelo cultivo *in vitro*.

3.3 Infecção experimental da colônia de carrapatos *A. aureolatum* por *R. rickettsii*

Três cobaias (*Cavia porcellus*) foram inoculadas intra-peritonealmente com um homogeneizado de fígado e de baço de uma cobaia previamente eutanasiada durante o pico febril da infecção por *R. rickettsii*. Concomitantemente, uma câmara de tecido de algodão foi fixada ao dorso, previamente tricotomizado, de cada cobaia, na qual foram depositadas 3.000 larvas de *A. aureolatum* com 30 dias de vida (+/- 5 dias).

A temperatura retal das cobaias foi aferida diariamente para a comprovação clínica da infecção, temperaturas retais acima de 39,5° C foram consideradas febris. As câmaras de alimentação também foram abertas diariamente para recolhimento das larvas ingurgitadas que se desprenderam naturalmente dos hospedeiros. As larvas ingurgitadas foram transferidas para incubadoras B.O.D. a 23°C e a UR de 95%, para a realização de ecdise.

Posteriormente, as ninfas de *A. aureolatum* foram alimentadas separadamente em novas três cobaias, as quais foram monitoradas para a infecção por *Rickettsia* tanto clinicamente quanto sorologicamente através da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) com antígeno de *R. rickettsii*. Esta avaliação foi realizada nos soros de cobaias sobreviventes 21 dias após a infestação, conforme descrito por Labruna *et al.* (2007b).

As ninfas ingurgitadas foram recolhidas das cobaias e transferidas para incubadoras B.O.D. para a ecdise para o estágio adulto, nas mesmas condições conforme descrito para larvas.

Os carrapatos adultos que emergiram da ecdise das ninfas foram alimentados em dois cães. Estes cães tiveram a região cervical tricotomizada e receberam, cada um, uma câmara de alimentação confeccionada em tecido de algodão que foi aderida à pele com cola especial (Kamar ®). Os animais infestados foram monitorados para a infecção por *Rickettsia*, conforme descrito anteriormente para as cobaias.

3.4 Obtenção de ovos, larvas e ninfas infectadas por *R. rickettsii*.

As fêmeas ingurgitadas foram transferidas para a incubadora BOD a 23°C e a UR de 95%, para oviposição. Por volta do quinto dia de postura, uma pequena alíquota dos ovos postos de cada fêmea teve seu DNA extraído, o qual foi testado para infecção por *Rickettsia* através de PCR específico para o gênero (descrito abaixo no item 3.6). Somente as posturas das fêmeas que se mostraram positivas na PCR foram utilizadas

adiante. A alimentação das larvas foi realizada como descrito acima e após a ecdise, as ninfas dos grupos infectados e suscetíveis foram mantidas a 23°C e >95% UR até o momento do uso.

3.5 Delineamento experimental

3.5.1 Aves

Foram utilizadas no projeto 4 aves da espécie *Turdus rufiventris* (Sabiá Laranjeira) e uma ave da espécie *Turdus flavipes* (Sabiá Una). As aves foram encaminhadas a partir do Centro de Recuperação de Animais Silvestres do Parque Ecológico do Tietê. Esses animais que foram utilizadas neste experimento não estavam aptos à reintrodução ao meio ambiente silvestre devido a comprometimento locomotor ou proprioceptivo e com recomendação veterinária para a eutanásia. O Experimento foi realizado em cinco aves.

A autorização para a guarda e uso dos animais foi concedida pelo IBAMA e a Secretaria Estadual de Meio Ambiente (processo 38239-1) do Estado de São Paulo.

O número de aves foi definido em cinco animais devido a dificuldade na manutenção de aves silvestres em condições de laboratório da forma que foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais. Mas o número de animais utilizados para o teste de competência de hospedeiro amplificador está de acordo com trabalhos prévios. Souza et al. (2009) estudaram a competência de capivaras, sendo apenas dois animais foram utilizados no grupo exposto a carrapatos e Horta et al. (2009) estudaram a competência de gambás, sendo que apenas cinco animais foram utilizados no grupo exposto a carrapatos. Levin e Ross (2004) estudaram a competência de camundongos como amplificadores para *Anaplasma phagocytophilum* utilizaram seis animais para conduzir o experimento e Moraru et al. (2013) estudaram a competência de camundongos silvestres e codornas como amplificadores de *R. parkeri* tendo sido utilizados cinco animais de cada espécie. Estes artigos mostram a dificuldade de delinear estudo com grande quantidade de animais, e mostram que o número em torno de cinco animais é a escolha comum entre os pesquisadores que desenvolvem conhecimento neste escopo.

3.5.2 Acondicionamento

As aves foram mantidas em gaiolas individuais 40cm x 30cm x 40cm (A x L x C), com água e alimento *ad libitum* pelo período estritamente necessário para a realização do experimento.

Os animais foram acondicionados no insetário experimental da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN) localizado na Cidade de São Paulo.

3.5.3 Grupo experimental

3.5.3.1 Transmissão horizontal

Todas as aves foram submetidas ao mesmo teste de infecção sistêmica e coalimentação.

Cinco aves do gênero *Turdus*, entre elas, quatro *Turdus rufiventris* e um *Turdus flavipes*, foram infestadas por quatro vezes, em momentos distintos. A infestação foi realizada na região periocular com ninfas do carrapato *A. aureolatum*.

A primeira infestação foi realizada a fim de verificar se essas aves estavam previamente infectadas com *R. rickettsii*. Para tanto três ninfas de *A. aureolatum* sabidamente não infectadas foram liberadas na região periocular das aves e, recolhidas após se desprenderem naturalmente. No dia de queda, as ninfas foram recuperadas e submetidas à extração de DNA e PCR conforme descrito em 3.6 e 3.7.

No dia zero do experimento foram liberadas na região periocular, cinco ninfas não infectadas e cinco ninfas infectadas pela bactéria *R. rickettsii* do carrapato *A. aureolatum*. As ninfas infectadas foram identificadas com a amputação do metatarso da pata esquerda III.

Sabe-se que as ninfas se alimentam por um período médio de quatro dias (3-6 dias), assim no dia seis do experimento, novas cinco ninfas não infectadas foram liberadas mais uma vez na região periocular das aves e o procedimento foi repetido no dia doze do experimento. O número de carrapatos foi determinado de acordo com a intensidade parasitária média de pássaros em condições naturais.

O número de três e cinco ninfas liberadas sobre os animais foi determinada com o objetivo de simular uma condição natural de acordo com a intensidade parasitária natural encontrada em aves capturadas no meio ambiente. Ogrzewalska et al. (2012) encontraram em aves naturalmente infestadas uma intensidade parasitária mínima de uma e máxima de quatro ninfas por animal, Pinter (2007) encontrou um intensidade parasitária máxima de duas ninfas por ave e Arzua et al. (2003) coletaram 102 aves infestadas por carrapatos, sendo que a intensidade parasitária de ninfas de *A. aureolatum* variou entre um e três ninfas por ave infestada.

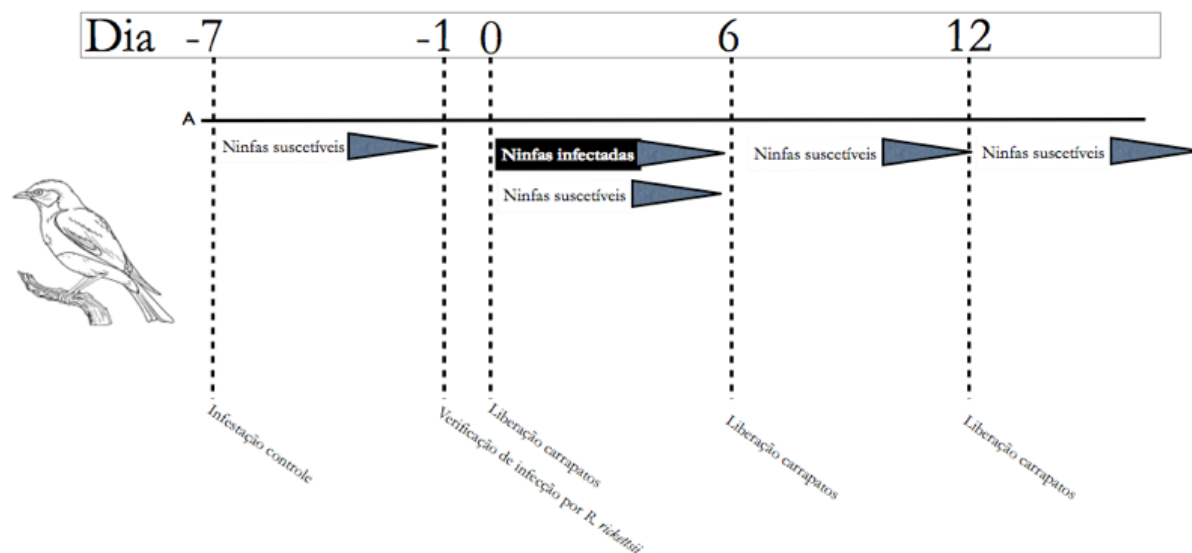


Figura 1- Esquema de liberação de ninfas de carrapatos *Amblyomma aureolatum* nos hospedeiros *Turdus rufiventris* e *Turdus flavipes* e o período esperado de parasitismo de acordo com o dia experimental.

Todas as aves tiveram uma pequena amostra de sangue (20 microlitros) retiradas uma vez, nos dias três, oito, 15 e 22 do experimento, após cada uma das três infestações experimentais. A amostra de sangue foi retirada por uma pequena punção na veia jugular dos animais. O sangue foi submetido à extração de DNA e à PCR como descrito nos itens 3.6 e 3.7.

Todos os carrapatos recuperados foram mantidos em incubadora B.O.D. como descrito anteriormente, para que completassem a ecdise para o próximo estágio do ciclo de vida.

As ninfas não infectadas que se alimentaram junto com as ninfas infectadas, foram utilizadas para testar a transmissão por coalimentação local. As ninfas que se alimentaram na infestações dos dias 6 e 12 foram utilizadas para testar a transmissão do agente etiológico por via sistêmica.

A adição de novas ninfas nos dias 6 e 12 do experimento, testou a persistência da infecção.

Todas as aves foram eutanasiadas ao final do experimento com uma sobredose de isoflurano.

3.5.3.2 Teste da transmissão horizontal

Após a ecdise, todas as ninfas de cada uma das três infestações experimentais de cada uma das aves que de forma bem sucedida mudaram para a fase de adulto foram deixadas a 35°C e >95% UR por um período de 72 horas e posteriormente foram maceradas com 1ml de solução de BHI (Brain Heart Infusion) e inoculadas intraperitonealmente em cobaias (*Cavia porcellus*). O restante do macerado foi submetido à extração de DNA e PCR como descrito nos itens 3.6 e 3.7.

As ninfas que não obtiveram êxito durante a ecdise foram também submetidas à extração de DNA e PCR mas não foram inoculadas em cobaias. Para a inoculação, os carrapatos adultos foram separados por grupos de infestação, configurando um esperado de quatro grupos por ave, uma vez que os carrapatos da primeira infestação formaram dois grupos, um de carrapatos sabidamente infectados e outro de carrapatos sabidamente suscetíveis.

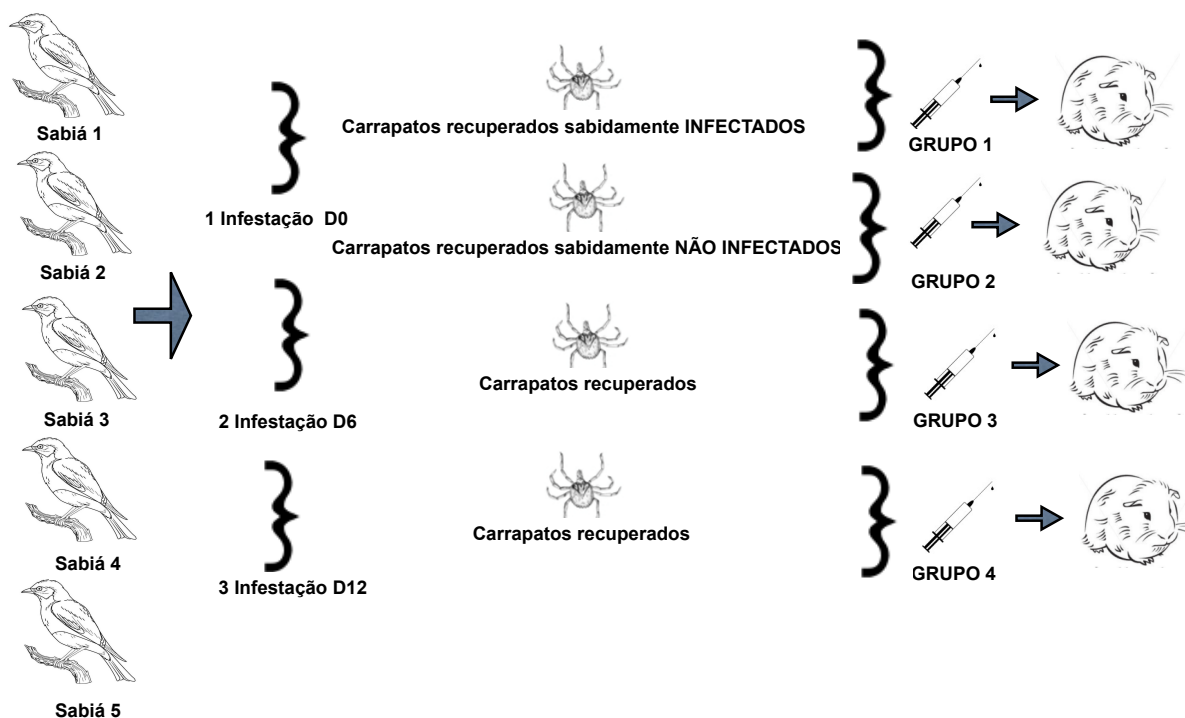


Figura 2 - Esquema esperado de inoculação em *Cavia porcellus* por grupos de ninfas de carrapatos *Amblyomma aureolatum* alimentadas e recuperadas em cada infestação e em cada uma

Cada cobaia foi identificada com uma marcação de cerca de 1 cm ou na cabeça, dorso e cauda, ou mais de uma marcação combinada, usando esmalte colorido, os animais formaram grupos de três indivíduos e foram mantidos em caixas plásticas com

maravalha de 50 x 50 x 30 cm com água e ração comercial *ad libitum* . Cada animal foi monitorado diariamente para apresentação de sinais clínicos e hipertermia (>39,5°C). Todos os animais, seja no final do experimento ou antes, para os que apresentaram quadro mórbido, foram eutanasiados através de uma sobredose de isofluorano, em seguida necropsiados e tiveram fragmentos de baço e fígado retirados e submetidos à extração de material genético, e posteriormente, à PCR para detecção de *Rickettsia rickettsii* (itens 3.6 e 3.7).

As cobaias que não desenvolveram quadro mórbido foram mantidas por 19 dias quando foram eutanasiadas como descrito acima, através de uma sobredose de isofluorano e, além de necropsiadas, tiveram uma amostra de sangue colhida para análise sorológica com objetivo de detectar anticorpos contra *R. rickettsii*, como descrito no item 3.8.

As cobaias inoculadas que morreram precocemente foram substituídas por novos animais, para tanto, as novas cobaias foram inoculadas intra-peritonealmente com um homogeneizado de fígado e de baço daquelas que morreram.

3.5.3.3 Desinfecção e descarte das carcaças e fômites

Todas as carcaças dos animais, assim como todos fômites que foram utilizados no experimento foram tratados em autoclave antes do descarte como resíduos biológicos.

3.6 Extração de DNA

Para a extração de DNA de carrapatos, sangue e fragmentos de órgãos foi utilizado produto comercial DNeasy Blood & Tissue kit® – Qiagen (Quiagen – Maryland, EUA), conforme protocolo de uso para extração de artrópodes e de sangue. O material genético extraído foi conservado a -4° C até o processamento.

3.7 Detecção de *R. rickettsii* pela PCR

Para determinar a presença da bactéria *R. rickettsii* nas amostra, estas foram analisada pela PCR com alvo em três genes de *Rickettsia*. Para cada reação, 100 ng do DNA genômico extraído dos carrapatos, sangue e órgãos foram utilizados como fita molde para a amplificação de um fragmento de 830-pb do gene da citrato sintase (*gltA*) de *Rickettsia* sp, utilizou-se o par de oligonucleotídeos iniciadores CS-239 (5'-CS-1069 CAGGGTCTTCGTGCATTTCTT-3') e CS-1069 (5'- GCTCTTCTCATCCTATGGCTATTA-3

’); para a amplificação de um fragmento de 491-pb do gene *ompA* de *Rickettsia* sp específico para o grupo da Febre Maculosa, utilizou-se o par de oligonucleotídeos iniciadores Rr190.70p (5'- ATGGCGAATATTTCTCCAAAA - 3') e Rr190.602n (5'- AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT - 3') e, por fim, para a amplificação de um fragmento de 562-pb do gene *htrL* utilizou-se o par de oligonucleotídeos iniciadores 17k-5 (5'- G C T T T A C A A A A T T C T A A A A C C A T A T A - 3 ') e 1 7 k - 3 (5 ' - TGTCTATCAATTCACAACCTTGCC - 3') como descrito em Labruna et al. (2004b).

O produto da PCR foi visualizado em gel de agarose 1,5% corado com GelRed (Uniscience ®) e visualizado em luz ultravioleta.

O tamanho dos fragmentos foi comparado com a escala de peso molecular e com o controle positivo, bandas com o mesmo tamanho do esperado foram consideradas positivas.

4. Resultados

4.1 Grupo de carrapatos alimentados e recuperados após Infestação controle

O percentual e o número de ninfas recuperadas após Infestação controle estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2 - Resultado da recuperação de ninfas de carrapatos *A. aureolatum* alimentadas em aves *Turdus sp* na Infestação Controle

Ninfas suscetíveis n=3	IC - Infestação Controle 15/05				
	Sabiá 1	Sabiá 2	Sabiá 3	Sabiá 4	Sabiá 5
Total Ninfas Recuperadas	2	3	2	1	2
% de recuperação	66%	100%	66%	33%	66%

As dez ninfas de carrapatos *A. aureolatum* recuperadas, quando submetidas à análise por PCR para os genes citrato sintase (*gltA*) e *htrL* de *Rickettsia sp* e do gene *ompA* de *Rickettsia sp* específico para o grupo da Febre Maculosa, apresentaram os resultados negativos para todas as amostras e para todos os genes

4.2 Grupo de carrapatos alimentados e recuperados após Primeira Infestação

O percentual e o número de ninfas recuperadas após a Primeira Infestação Experimental estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3- Resultado da recuperação de ninfas de carrapatos *A. aureolatum* alimentadas em aves *Turdus sp* na Primeira Infestação Experimental

Ninfas infectadas n=5 Ninfas suscetíveis n=5	I - Infestação 22/05				
	Sabiá 1	Sabiá 2	Sabiá 3	Sabiá 4	Sabiá 5
Total NS	3	3	2	2	1
Total NI	2	1	1	-	-
% de recuperação NS	60%	60%	40%	40%	20%
% de recuperação NI	40%	20%	20%	-	-

Ninfa Infectada= NI Ninfa Suscetível= NS

Das quinze ninfas recuperadas, catorze completaram o processo de ecdise com sucesso para a fase de adulto.

As ninfas de carrapatos *A. aureolatum* recuperadas, quando submetidas à análise por PCR para os genes citrato sintase (*gltA*) e *htrL* de *Rickettsia* sp e do gene *ompA* de *Rickettsia* sp específico para o grupo da Febre Maculosa, apresentaram os resultados conforme tabela 4, abaixo.

Tabela 4- Resultado da análise por PCR das ninfas de carrapatos *A. aureolatum* recuperadas após I Infestação para os primers *gltA*, *htrL* e *ompA*

Resultado de PCR para as ninfas recuperadas após I Infestação					
Sabiá	Ninfas recuperadas	Estado prévio a alimentação	PCR para <i>gltA</i>	PCR para <i>htrL</i>	PCR para <i>ompA</i>
1	N1	Infectado	+	+	+
	N2	Infectado	-	-	-
	N3	Suscetível	-	-	-
	N4	Suscetível	-	-	-
	N5	Suscetível	-	-	-
2	N6	Suscetível	-	-	-
	N7	Suscetível	-	-	-
	N8	Suscetível	-	-	-
	N9	Infectado	+	+	+
3	N10	Infectado	+	+	+
	N11	Suscetível	-	-	-
	N12	Suscetível	-	-	-
4	N13	Suscetível	-	-	-
	N14	Suscetível	-	-	-
5	N15	Suscetível	-	-	-

4.3 Grupos de carrapatos alimentados e recuperados após Segunda e Terceira Infestação

O percentual e o número de ninfas recuperadas após a segunda e terceira infestação estão apresentados na tabela 5 e 6, respectivamente.

Tabela 5- Resultado da recuperação de ninfas de carrapatos *A. aureolatum* alimentadas em aves *Turdus sp* na Segunda Infestação.

Ninfas suscetíveis n=5	II - Infestação 29/05				
	Sabiá 1	Sabiá 2	Sabiá 3	Sabiá 4	Sabiá 5
Total Ninfas Recuperadas	2	2	-	4	4
% de recuperação	40%	40%	-	80%	80%

Das doze ninfas recuperadas após a Segunda Infestação, apenas nove delas mudaram com sucesso para a fase de adulto.

Tabela 6- Resultado da recuperação de ninfas de carrapatos *A. aureolatum* alimentadas em aves *Turdus sp* na Terceira Infestação.

Ninfas suscetíveis n=5	III - Infestação 05/06				
	Sabiá 1	Sabiá 2	Sabiá 3	Sabiá 4	Sabiá 5
Total Ninfas recuperadas	2	4	2	1	2
% de recuperação	40%	80%	40%	20%	40%

Das onze ninfas recuperadas após a Terceira Infestação, apenas nove delas mudaram com sucesso para a fase de adulto.

As ninfas de carrapatos *A. aureolatum* recuperadas na segunda e terceira infestação, quando submetidas à análise por PCR para os genes citrato sintase (*glfA*) e *htrL* de *Rickettsia sp* e do gene *ompA* de *Rickettsia sp* específico para o grupo da Febre

Maculosa, apresentaram os resultados negativos para todas as amostras e em todos os genes.

4.4 Avaliação de Infecção Sistêmica em aves do gênero *Turdus sp* por *R. rickettsii* através de coletas de sangue

Foram realizadas quatro coletas de sangue de cada uma das cinco aves de acordo com o dia experimental conforme tabela 7, abaixo.

Tabela 7- Coleta de sangue das aves *Turdus rufiventris* e *Turdus flavipes* de acordo com o dia experimental

Coleta de Sangue das Aves <i>Turdus sp</i>				
	Coleta 1	Coleta 2	Coleta 3	Coleta 4
Dias após I Infestação	D3	D8	D15	D22

O resultado da análise por PCR para os genes citrato sintase (*gltA*) e *htrL* de *Rickettsia sp* e do gene *ompA* de *Rickettsia sp* específico para o grupo da Febre Maculosa foram todos negativos para todas as amostras e em todos os genes.

4.5 Inoculação em cobaias (*Cavia porcellus*) dos adultos de carrapatos *A. aureolatum* recuperadas após infestações como ninfas.

32 ninfas de *A. aureolatum* foram recuperadas após as três infestações nos cinco sabiás, como demonstrado nas figuras 3, 4, 5, 6 e 7.

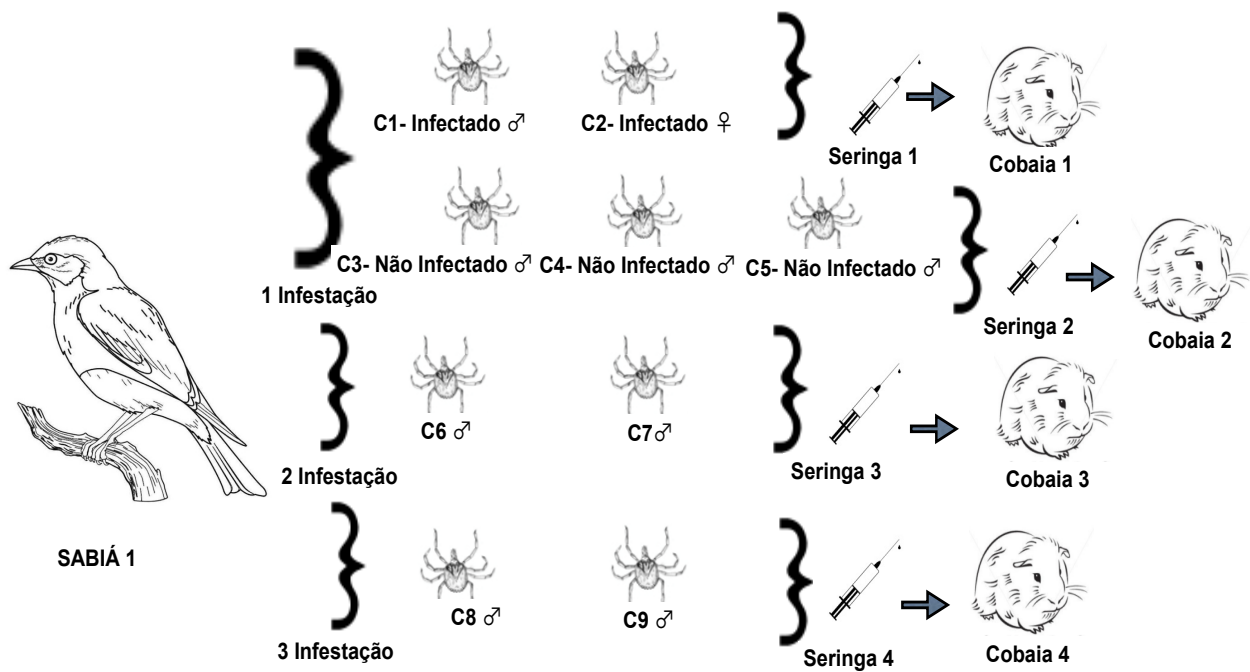


Figura 3 - Esquema de inoculação intraperitoneal em cobaias (*Cavia porcellus*) dos carrapato *A. aureolatum* recuperadas após infestações experimentais no Sabiá 1 (*Turdus flavipes*.)

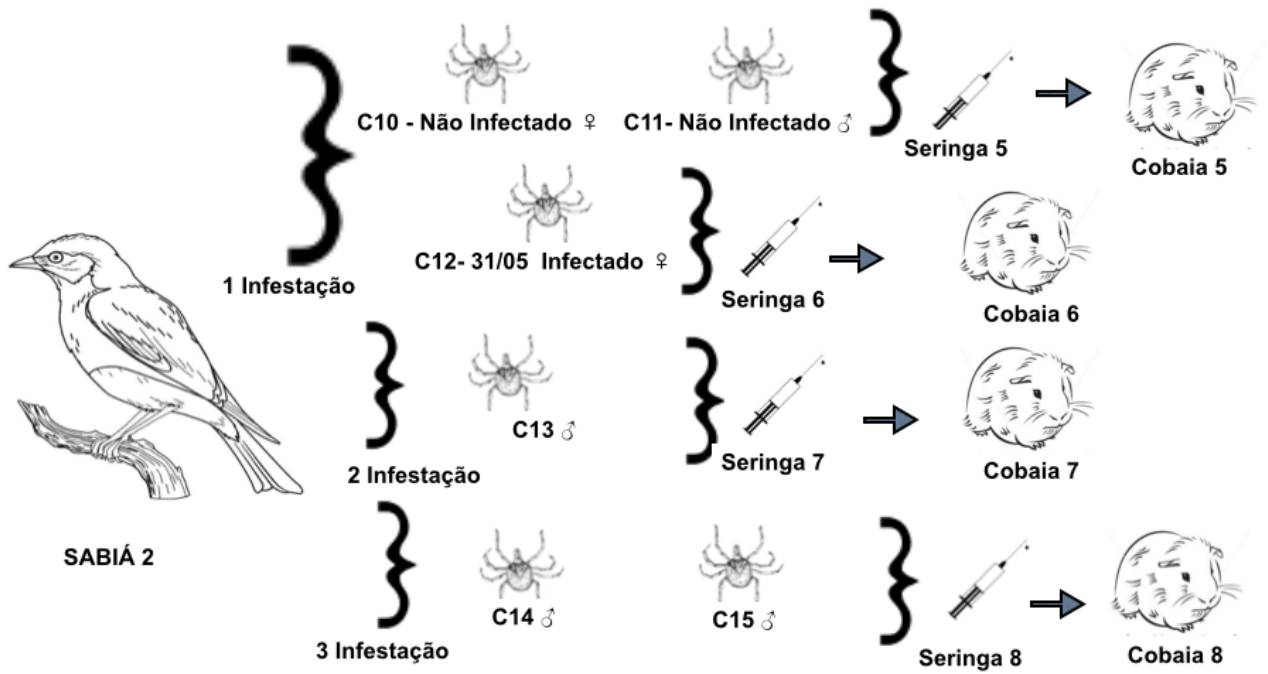


Figura 4 - Esquema de inoculação intraperitoneal em cobaias (*Cavia porcellus*) dos carrapato *A. aureolatum* recuperadas após infestações experimentais no Sabiá 2 (*Turdus rufiventris*).

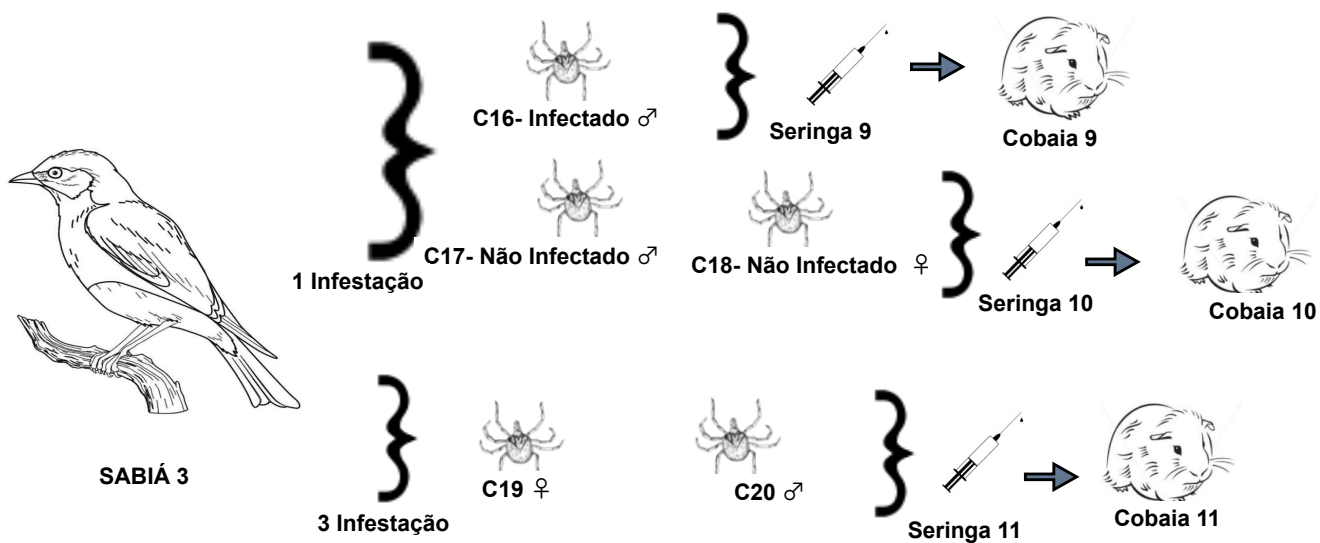


Figura 5 - Esquema de inoculação intraperitoneal em cobaias (*Cavia porcellus*) dos carrapato *A. aureolatum* recuperadas após infestações experimentais no Sabiá 3 (*Turdus rufiventris*).

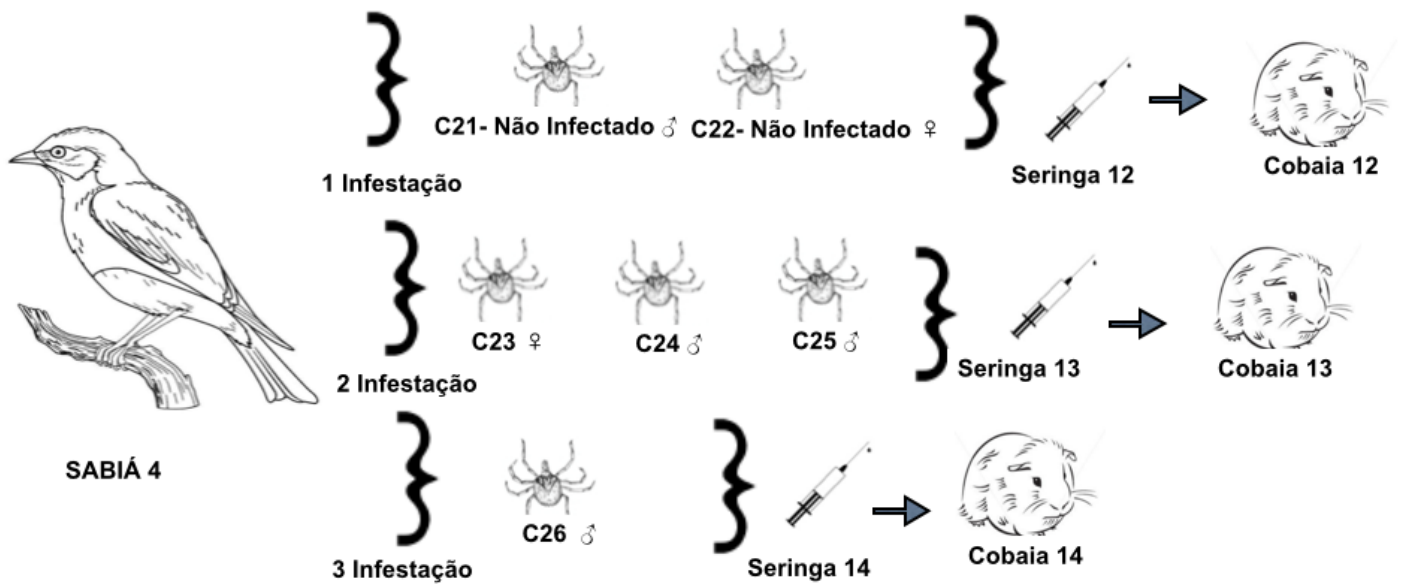


Figura 6 - Esquema de inoculação intraperitoneal em cobaias (*Cavia porcellus*) dos carrapato *A. aureolatum* recuperadas após infestações experimentais no Sabiá 4 (*Turdus rufiventris*).

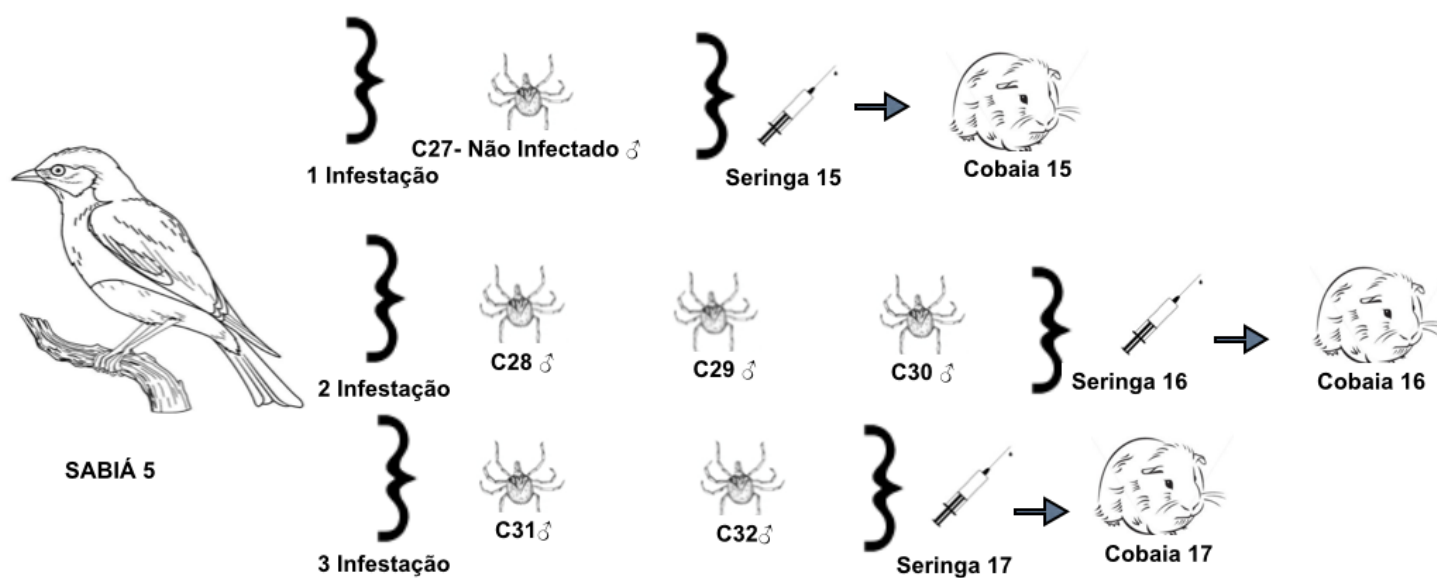


Figura 7 - Esquema de inoculação intraperitoneal em cobaias (*Cavia porcellus*) dos carrapatos *A. aureolatum* recuperadas após infestações experimentais no Sabiá 5 (*Turdus rufiventris*).

4.6 Monitoramento dos sinais clínicos e hipertermia das cobaias inoculadas

O monitoramento da temperatura retal das cobaias está representada na tabela 8, abaixo.

Tabela 8 - Monitoramento da temperatura real das cobaias (*Cavia porcellus*) inoculadas com macerado de ninfas de carrapato *Amblyomma aureolatum*

Temperatura retal das Cobaias inoculadas																						
	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15	C16	C17	C18	C19	C20	C21	
	0										5					7						
																(1)						
D0	37	36,9	37,4	38,2	36,7	36,2	37,2	38,1	38	37,2	37,1	39,1	37,1	37,8	37,2	36,9	39	38,3	37,9	38,9	38,1	
D1	37,9	37,1	37,8	37,2	37,4	36,9	37,6	38	37,4	37,4	37,1	37,8	37,4	38,2	37,1	37,7	37,6	37,7	38,3	38,4	38,5	
D2	38	36,8	38,2	37,8	36,2	37,5	37,9	38,1	37,3	38,1	37,8	37,1	36,2	37,1	36,3	37,8	37,4	38,3	38,4	38,8	38,6	
D3	37,3	34,4	37,4	37,8	38,3	37,1	38,2	38,1	37,9	37,9	37,5	37,1	36,5	37	36,9	38	37,4	38,1	38,1	38,5	38,7	
D4	37,6	†	37,1	38,2	37	37,9	38,4	38,2	38,6	38,5	38,5	38,6	37,2	37,4	37,7	37,8	38,3	37,9	38,4	39,1	38,9	
D5	36,9		34,5	37,4	35,4	38	37,6	37,4	38,7	37,6	38,5	37,2	37,2	37,5	37,2	37,5	37,6	38,1	38	†	†	
D6	†		†	38,5	38,9	40	38,6	38,3	39,4	38,4	38,6	37,6	38,3	38,2	37,9	37,9	38,9	39	38,3			
D7				37,6	38	39,4	38,6	38,5	39,5	38,6	38,3	37,9	38,2	38,7	38,9	38	38,2	39	38,6			
D8				38,1	38,2	39,2	38,4	38	39,2	38,1	37,9	37,8	38	38,5	38,2	38,1	38,5	38,7	38,9			
D9				38	38	38,9	38,5	38,4	39	38,7	38,6	38	38,4	38,2	38,2	38,3	38,9	39,4	38,9			
D10				38,2	38,3	38,6	38,3	37,8	39,1	38,1	38,5	38,1	38,3	37,2	37,8	38,6	38,1	37,8	38,3			
D11				38,4	38,4	38,9	39,3	38,8	39,6	39,2	39,1	38,9	39,2	38,4	38,6	39,3	39,3	39,1	38,4			
D12				38,3	38,2	37,9	39	38,5	39	39	38,9	39,4	†	37	37,1	39,6	39,1	†	38,3			
D13				38,6	38,2	†	39,2	38,4	38,1	38,2	38,3	39,2		†	†	39	39,2		39,1			
D14				37,1	†		38,3	†	†	34,5	†	38,7				38,8	38,7		†			
D15				†			36,6			†		38,8				38,3	38,3					
D16							38,6					39,5				38,5	39					
D17							38,6					38,9				38,6	38,4					
D18							38,8					39,2				39,1	39,1					
D19							†					†				†	†					

*As cobaias denominadas C18, C19, C20 e C21 foram usadas em substituição às C1, C3, C6 e C11, respectivamente

** † morte das cobaias

4.7 Avaliação por PCR de fragmentos de baço e fígado necropsiados de cobaias após inoculação

O resultado da análise por PCR dos fragmentos de baço e fígado das cobaias inoculadas, para os genes citrato sintase (*gltA*) e *htrL* de *Rickettsia* sp e do gene *ompA* de *Rickettsia* sp específico para o grupo da Febre Maculosa estão representado pelas tabelas 9 e 10, abaixo.

Tabela 9- Resultado da análise por PCR dos fígados de cobaias necropsiados

Resultado de PCR para os fígados das cobaias investigados																			
	F2	F4	F5	F6	F7	F8	F9	F10	F11	F12	F13	F14	F15	F16	F17	F18	F19	F20	F21
								0	1							(1)	(3)	0	(11)
																		(6)	
<i>gltA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>htrL</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>ompA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

*A identificação das amostras de fígado (F2-F21) é correspondente à identificação de cada cobaias (C2-C21)

Tabela 10- Resultado da análise por PCR dos baços de cobaias necropsiados

Resultado de PCR para os baços das cobaias investigados																			
	B2	B4	B5	B6	B7	B8	B9	B10	B11	B12	B13	B14	B15	B16	B17	B18	B19	B20	B21
														6	7	8	9	0	1
																	(1)	(3)	(6)
																	(1)	(1)	(1)
<i>gltA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>htrL</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ompA</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

*A identificação das amostras de baço (F2-F21) é correspondente à identificação de cada cobaias (C2-C21)

5. Discussão

Aves silvestres são sabidamente importantes hospedeiros para fases imaturas de algumas espécies de carrapatos, entre elas, *A. aureolatum*. Para essa espécie de carrapato, em áreas onde a Febre Maculosa Brasileira é endêmica, os índices de infecção por *R. rickettsii* é de 1% (Pinter e Labruna, 2006)

As fases imaturas de *A. aureolatum*, além de parasitar aves silvestres, especialmente as do gênero *Turdus*, também parasitam alguns pequenos roedores (Gluglielmone et al., 2003). No entanto, o relato de parasitismo dessas fases nesses mamíferos é bem reduzida. Ademais, Pinter (2007) relata a captura de 121 roedores da família Cricetidae em área de ocorrência de *A. aureolatum* e nenhum deles foi encontrado parasitado. Mostrando que, possivelmente, aves sejam hospedeiros mais importantes para as fases imaturas de *A. aureolatum*.

Labruna et al. (2011b) demonstraram que imaturos de *A. aureolatum* tem capacidade próxima de 100% de infectar-se quando alimentados em hospedeiros riquetsêmicos, credenciando esta espécie de carrapato como ótima para utilização para xenodiagnóstico, assim nesse estudo foram recuperadas 10 ninfas de carrapato *A. aureolatum* alimentadas na infestação controle permitindo que cada uma das cinco aves fosse avaliada quanto a seu status prévio de infecção por *R. rickettsii*. Quando analisadas por PCR nenhuma das ninfas apresentou resultado positivo para qualquer um dos genes testados

Antes da infestação controle havia evidência laboratorial que essas ninfas pertenciam a uma colônia mantida em laboratório livre de *R. rickettsii*, deste modo, consideramos que não havia infecção prévia nas aves,.

Na infestação realizada no dia zero do experimento, com ninfas sabidamente infectadas e susceptíveis, concomitantemente, foram recuperadas 4 ninfas do grupo infectadas e 11 ninfas do grupo não infectadas. Em três, das cinco aves foram recuperadas ninfas do grupo infectadas e do grupo não infectadas que se alimentaram concomitantemente no mesmo animal permitindo a avaliação de transmissão de *R. rickettsii* por co-alimentação.

O fenômeno de transmissão de bactérias e vírus por co-alimentação para carrapatos tem sido relatado com frequência quando o hospedeiro é um mamífero. Ainda

assim, jamais foi descrito para carrapatos *A. aureolatum* ou para *R. rickettsii*. Em aves já foram relatadas evidências da transmissão via co-alimentação de *Ehrlichia sp* em carrapatos da espécie *Ixodes ricinus* (Alekseev *et al.*, 2001). No entanto, o gênero *Ixodes* apresenta como característica o hábito de se alimentar em cluster, onde vários carrapatos compartilham, fisicamente próximos, o mesmo sítio de fixação. Já carrapatos do gênero *Amblyomma* apresentam a característica de se alimentar isoladamente, cada indivíduo em seu próprio sítio de fixação. Esse hábito alimentar de *Amblyomma* dificulta que ocorra o fenômeno da co-alimentação, de fato, durante o processo de alimentação observado nas aves deste estudo, não foi observado ninfas se alimentando próximas umas das outras, embora todas estivessem fixadas na cabeça da ave em torno dos olhos, não havia qualquer sinal de compartilhamento de sítio de alimentação em nenhuma das aves.

Somado ao hábito alimentar, quando submetidas à análise por PCR, as ninfas de *A. aureolatum* com status prévio de infecção negativo apresentaram resultados negativos para todos os genes testados. Assim sendo, a amplificação horizontal de *R. rickettsii* através do fenômeno da co-alimentação não foi evidenciado para carrapatos *A. aureolatum* quando parasitam seu hospedeiro natural, *Turdus sp*.

As ninfas de *A. aureolatum* originárias da colônia não infectada, recuperadas das duas outras aves também apresentaram resultado negativos para todos os genes quando submetidas à análise por PCR. Apesar de não terem sido recuperadas ninfas da colônia infectada alimentadas nessas aves, não se pode ter certeza de que não houve alimentação. Sendo assim, os resultados obtidos na experimentação nesses animais não foram considerados para refutar a hipótese de transmissão por co-alimentação, mas certamente esses resultados não suportam esta hipótese.

Quando submetidas à análise molecular, as ninfas de *A. aureolatum* recuperadas na segunda e terceira infestação não de mostraram positivas à PCR para nenhum dos genes avaliados. Mostrando que não houve infecção e sugerindo que não houve transmissão sistêmica de *R. rickettsii* nas aves. Estes dados corroboram os resultados da técnica do isolamento realizada em cobaias que são animais consagradamente suscetíveis à infecção pela bactéria *R. rickettsii* (Labruna *et al.*, 2011b), sendo que o parasitismo por apenas uma ninfa infectada é suficiente para o desencadeamento do estado mórbido da doença nestes animais.

Todas as cobaias foram inoculadas com o macerado das ninfas de *A. aureolatum* recuperadas nas infestações experimentais e tiveram temperatura monitorada

diariamente. Para as cobaias inoculadas com ninfas com status prévio de infecção sabidamente negativo, nenhuma delas apresentou um pico febril ou outro sinal característico de infecção por *R. rickettsii*, como edema ou necrose de extremidades e escroto. Fragmentos de baço e fígado dessas cobaias também foram avaliados por PCR e os resultados também foram negativos, corroborando os resultados acima.

As cobaias inoculadas com macerado de adultos provenientes de ninfas da colônia infectada, utilizadas na infestação do dia zero do experimento, apresentaram sinais de hipertermia (acima de 39,4°C) em algum momento nos primeiros 10 dias após a inoculação, as cobaias C6 e C9 apresentaram pico febril, embora nenhum outro sinal característico de infecção por *R. rickettsii* tenha sido observado. A cobaia C1 apresentou quadro mórbido e morte precoce, sendo que sangue deste animal foi colhido e inoculado na cobaia C18, este animal morreu 11 dias após a inoculação e um fragmento de fígado desse animal se mostraram positivo para presença de *Rickettsia* sp na PCR. As manifestações clínicas das cobaias não se mostraram típicas, mas é possível que isso tenha ocorrido devido a uma pequena carga infectante presente nos adultos de *A. aureolatum*. Outras duas cobaias apresentaram hipertermia, as cobaias C16 e C12, no entanto o quadro aconteceu após o 12º dia de infecção, sugerindo que não tenham sido causados pela infecção da bactéria *R. rickettsii*.

Apesar do parasitismo por *A. aureolatum* em aves do gênero *Turdus* ser relatado com certa frequência é importante ressaltar que outras espécies de aves também são parasitadas por esse carrapato. Pinter, 2007 relata parasitismo de fases imaturas de *A. aureolatum* em aves da espécie *Pyrgilena leucoptera*. Arzua *et al.* (2005) sugeriram mais 13 espécies como hospedeiros de *A. aureolatum*: *Conopophaga lineata*; *Craniouleuca obsoleta*; *Craniouleuca pallida*; *Furnarius rufus*; *Poospiza lateralis*; *Saltator similis*; *Synallaxis cinerascens*; *Synallaxis ruficapilla*; *Tachyphonus coronatus*; *Thamnophilus caerulescens*; *Thamnophilus ruficapillus*; *Troglodytes aedon* e *Zonotrichia capensis*.

É possível que as fases imaturas de *A. aureolatum* não tenham preferência de parasitismo por espécies de aves mas sim por um grupo específico uma vez que todas as outras aves parasitadas pertencem a ordem Passeriformes que têm hábitos de frequentar o chão a procura de insetos e que habitam os estratos mais baixos da floresta. Ainda sim, é possível que as aves *Turdus* sp não sejam amplificadores eficientes de *R. rickettsii*, mas que outras aves o sejam, já que as respostas frente à uma infecção não necessariamente sejam iguais entre as espécies.

Outra hipótese para a ausência de evidências de riquetsemia é a preferência de *R. rickettsii* por temperaturas mais amenas para sua multiplicação. A interação entre a riquetsia e da célula hospedeira envolve vários passos, incluindo o reconhecimento de entrada, fuga do fagossoma, crescimento, motilidade à base de actina, disseminação célula-a-célula e lise celular

Depois da entrada da riquetsia na derme, esta é disseminada pelo sangue. A bactéria tem preferência em infectar células endoteliais dos vasos sanguíneos principalmente, aqueles localizados na superfície da pele e dos pulmões, provavelmente pela temperatura mais amenas nessas regiões. Além disso, é sabido que riquetsias do Grupo da Febre Maculosa têm temperatura ótima de crescimento em 34°C. As aves, no entanto, apresentam temperatura corporal média variando entre 40 e 42°C, podendo criar um ambiente inóspito para a multiplicação de *R. rickettsii*.

As amostras de sangue das aves coletadas após cada infestação apresentaram resultados negativos quando submetidas à PCR para todos os genes analisados, sugerindo que não houve infecção sistêmica em *Turdus*. Os resultados da análise das ninfas recuperadas e o da técnica de isolamento corroboram a ausência de evidências para infecção sistêmica por *R. rickettsii*, no entanto, para uma verificação mais precisa, seria recomendado, apesar da dificuldade técnica, a coleta de amostras de sangue diária, durante o período das infestações.

É sabido que que a circulação e proliferação de *R. rickettsii* no endotélio vascular em certos hospedeiros vertebrados pode ser suficiente para infectar carrapatos, enquanto que, em outros hospedeiros, pode ser muito baixo. Vários vertebrados pode apresentar riquetsemia por períodos curtos e, nesse caso, carrapatos não são capazes de adquirir a infecção por riquetsias por ingestão de tecido endotelial de seus hospedeiros. Alternativamente, também foi reportada riquetsemia intermitente para algumas espécies de riquetsias (Lundgren *et al.*, 1966).

. Apesar de poucos relatos na literatura de riquetsemia em aves, nos que ela ocorre o número de animais avaliados é consideravelmente grande. Um estudo mostrou que 3% de 131 amostras de sangue de aves foram PCR positivos para *Rickettsia spp* (Ioannou *et al.*, 2009). Outro, mostra evidências de riquetsemia de *R. helvetica* em 128 amostras de sangue (Hornok *et al.*, 2014).

No entanto, Souza (2009) mostrou que a capivara quando infectada pela bactéria *R. rickettsii*, apresenta riquetsemia e se torna uma importante fonte de infecção da bactéria utilizando apenas 2 animais por grupo. O mesmo ocorreu com no estudo de

Horta *et al* (2009) que demonstrou que o gambá (*D. aurita*) atua como fonte de infecção para carrapatos *A. cajennense* mas de forma pouco eficiente utilizando apenas 5 animais no grupo exposto a carrapatos. Levin e Ross (2004) estudaram a competência de camundongos como amplificadores para *Anaplasma phagocytophilum* e utilizaram seis animais para conduzir o experimento e Moraru *et al.* (2013) estudaram a competência de camundongos silvestres e codornas como amplificadores de *R. parkeri* tendo sido utilizados cinco animais de cada espécie.

Segundo Labruna (2006), para que um vertebrado seja considerado bom hospedeiro amplificador de *R. rickettsii* na natureza, este deve preencher alguns requisitos como: ser susceptível à infecção; manter a bactéria circulante em níveis plasmáticos suficientes para infectar vetores; ter alta taxa de renovação populacional; ser abundante na área endêmica e ser bom hospedeiro do carrapato vetor em condições naturais. Levando em conta esses fatores, os carnívoros seriam outro grupo de vertebrados com possível relevância para a amplificação de *R. rickettsii* quando o vetor é *A. aureolatum*

Em condições naturais, estágios adultos de *A. aureolatum* apresentam alta especificidade por carnívoros selvagens. Em áreas rurais, onde animais domésticos têm acesso às áreas de florestas, cães e gatos domésticos são frequentemente parasitados pelas formas adultas dessa espécie (Pinter *et al.*, 2004).

Já é conhecido o importante papel epidemiológico do cão, devido ao seu papel de carrear carrapatos infectados para o ambiente doméstico. Sabe-se ainda ainda, que o risco de contato com o patógeno é mais elevado em cães do que em seres humanos, tendo em vista a maior exposição dos animais a carrapatos vetores competentes (Scorpio *et al.*, 2008).

O papel amplificador de cães já foi sugerido por Piranda *et al* (2008) quando detectaram 20% de carrapatos *R. sanguineus* infectados após alimentação em cães riquetsêmicos. Labruna *et al* (2009) também descreveram a doença clínica em cães, a partir da confirmação de FMB em dois animais procedentes do município de Itu, no Estado de São Paulo, onde, sabidamente, havia circulação do patógeno

Este trabalho sugere que, para a história natural de *R. rickettsii*, a amplificação da bactéria de forma horizontal na população de carrapatos não ocorra nas fases imaturas do ácaro, como é proposto por Cooksey *et al.* (1990). Nesse estudo os autores desenharam um modelo de amplificação para *R. rickettsii* com transmissão por carrapatos do gênero *Dermacentor* mostrando que a amplificação da bactéria deve necessariamente

ocorrer nas fases imaturas do carrapato. Além de *Dermacentor*, para *Amblyomma cajennense* (lato senso) este modelo também foi aceito por Souza et al. (2009). O presente estudo é o primeiro a sugerir que o modelo de Cooksey et al. (1990) pode não explicar o modelo de transmissão pelo carrapato *A. aureolatum*. Sendo os imaturos desse carrapato parasitos de aves e uma vez que os resultados aqui apresentados mostram que o principal hospedeiro natural, o passeriforme *Turdus* sp não é competente como amplificador da bactéria nem de forma sistêmica nem por co-alimentação, portanto não se enquadrando nos critérios de amplificador definidos por Labruna (2006), conclui-se que é necessário então que o amplificador seja o hospedeiro da fase adulta do carrapato.

Em condições naturais, o cachorro-do-mato é o hospedeiro principal, mas em todos os locais endêmicos para a Febre Maculos Brasileira transmitida por *A. aureolatum* o cão doméstico é o principal hospedeiro. E o cão doméstico potencialmente se enquadra nos critérios definidos por Labruna (2006) como potencial amplificador, exceto pelo fato ainda não testado cientificamente, de que se uma fêmea que venha a se infectar em um cão, tenha competência para transmitir a bactéria de forma transovariana.

Este estudo conclui portanto que o melhor conhecimento da competência de cães domésticos como fonte de infecção para fêmeas de *A. aureolatum* e o subsequente teste da capacidade de transmissão transovariana da bactéria *R. rickettsii* são hipóteses a serem testadas para completar o conhecimento sobre a história natural da bactéria o que seria potencialmente o primeiro estudo a refutar o modelo proposto por Cooksey et al., (1990)

6. Conclusão

O presente estudo refuta a hipótese de que aves do gênero *Turdus* desempenhem o papel de amplificadores da bactéria *Rickettsia rickettsii* para ninfas do carrapato *Amblyomma aureolatum*.

7. Referências

- Alekseev A. N., Dubinna H. V., Semenov A. V., Cazimir V., Bolshakov C. V. Evidence of ehrlichiosis agents found in ticks (Acari: Ixodidae) collected from migratory birds. *J. Med. Entomol.* 2001 38: 471–474.
- Aragão, H. B. Notas sobre ixodidas brasileiros. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1911 ; 3 (2): 145-195.
- Aragão, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns paizes limitrophes. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1936; 31: 759-843.
- Aragão, H.; Fonseca, F. Notas de Ixodologia. VIII Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1961; 59: 115-129.
- Arzua, M.; Barros-Battesti, D. M. Parasitism of *Ixodes (Multidentatus) auritulus* Neumann (Acari: Ixodidae) on birds from the city of Curitiba, State of Paraná, Southern Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 1999; 94 (9): 597-603.
- Arzua, M.; Silva, M. A. N.; Famadas, K. M.; Beati, L.; Barros-Battesti, D. M. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae) on birds in southern Brazil, with notes on their ecology. *Experimental and Applied Acarology.* 2003; 31 (3-4): 238-296.
- Arzua, M.; Onofrio, V. C.; Barros-Battesti, D. M. Catalogue of the tick collection (Acari, Ixodida) of the Museu de História Natural Capão da Imbuia, Curitiba, Paraná, Brazil. *Revista Brasileira de Zoologia.* 2005; 22 (3): 623-632.
- Barros-Battesti D. M.; Arzua, M.; Pichorim, M.; Keirans, J. K. *Ixodes (Multidentatus) paranaensis* n.sp. (Acari: Ixodidae) a parasite of *Streptoprocne biscutata* (Sclater 1865) (Apodiformes: Apodidae) birds in Brazil. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 2003; 98 (1): 93-102.
- Burgdorfer, W. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrub typhus. In: Walker, D. H., *Biology of rickettsial diseases.* [Boca Raton, FL.:CRC].1998; 33-50.
- Bustamante, M. E.; Varela G. Distribucion de las rickettsiasis en Mexico. *Revista Inst Salub y Enf Trops.* 1947; 8: 3-14.

Cooksey, L. M.; Haile, D. G.; Mount, G. A. Computer Simulation of Rocky Mountain Spotted Fever Transmission by the American Dog Tick (Acari:Ixodidae). J Med Entomol. 1990; 27: 671-680.

Dantas-Torres F., Onofrio V., Barros-Battesti D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. Syst. Appl. Acarol. 2009; 14: 30–46

Dantas-Torres F., Venzal J. M., Bernardi L. F., Ferreira R. L., Onofrio V. C., Marcili A., et al. (2012). Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. J. Parasitol. 2012; 98: 36–45.

Dias, E. & Martins, A. V. Spotted fever in Brazil. A summary. Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 1939; 19:103-108.

Evans, D. E.; Martins, J. R.; Guglielmone, A. A. A review of ticks (Acari: Ixodidia) of Brazil, their hosts and geographic distribution – 1. The state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2000; 95 (4): 453-470.

Gern, L. & Rais, O. Efficient transmission of *Borrelia burgdorferi* between cofeeding *Ixodes ricinus* ticks J Med Entomol.1996; 33:189-192.

Guedes, E.; Leite, R.C.; Prata, M.C.A.; Pacheco, R.C.; Walker, D.H.; Labruna, M.B. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever-endemic area in the state of Minas Gerais. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 2005; 100 (8): 841-845.

Guglielmone, A.A.; Estrada-Pena, A.; Mangold, A.J.; Barros-Battesti, D.M.; Labruna, M.B.; Martins, J.R.; Venzal, J.M.; Arzua, M.; Keirans, J.E. *Amblyomma aureolatum* (Pallas, 1772) and *Amblyomma ovale* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae): hosts, distribution and 16S rDNA sequences. Veterinary Parasitology. 2003; 113: 273–288.

Guglielmone, A.A.; Beati, L.; Barros-Battesti, D. M.; Labruna M. B.; Nava, S.; Venzal, J. M.; Mangold, A. J.; Szabó, M. P. J.; Martins, J. R.; Gonzales-Acuna, D.; Estrada-Pena, A. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. Experimental and Applied Acarology . 2006;

40: 83–100.

Guimarães, J.H.; Tucci, E.C.; Barros-Battesti, D.M. Ectoparasitos de importância veterinária. Editora Plêiade, São Paulo. 2001; 213.

Hornok S, Kováts D, Csörgő T, Meli ML, Gönczi E, Hadnagy Z, Takács N, Farkas R, Hofmann-Lehmann R: Birds as potential reservoirs of tick-borne pathogens: first evidence of bacteraemia with *Rickettsia helvetica*. *Parasit Vectors* 2014, 7:128.

Horta, M.C; Pinter, A.; Schumaker, T.T.S.; Labruna, M.B.. Natural Infection, Transovarial Transmission, and Transstadial Survival of *Rickettsia bellii* in the Tick *Ixodes loricatus* (Acari: Ixodidae) from Brazil. You have full text access to this content *Annals of the New York Academy of Sciences*. 2006; 1078 (1): 285-29.

Horta, M.C.; Moraes-Filho, J.; Casagrande, R. A.; Saito, T. B.; Rosa, S. C.; Ogrzewalska, M.; Matushima, E. R.; Labruna, M. B. Experimental Infection of opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Vector borne and zoonotic diseases*. 2009; 9(1): 109:117.

Ioannou I, Chochlakis D, Kasinis N, Anayiotos P, Lyssandrou A, Papadopoulos B, Tselentis Y, Psaroulaki A. Carriage of *Rickettsia* spp., *Coxiella burnetii* and *Anaplasma* spp. by endemic and migratory wild birds and their ectoparasites in Cyprus. *Clin Microbiol Infect*. 2009;7(Suppl 2):158–160.

Labuda, M.; Nuttal, P. A.; Kozuch, O.; Elecková, E.; Willians, T.; Zuffóva, E.; Sabó, A. Non-viremic transmission of tick-borne encephalitis virus: a mechanism for arbovirus survival in nature. *Experientia*. 1993; 49, 802-805.

Labruna, M.B.; Kerber, C.E.; Ferreira, F.; Faccini, J.L.; De Waal, D.T.; Gennari, S.M. Risk factors to tick infestations and their occurrence on horses in the state of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*. 2001; 97(1):1-14 .

Labruna, M.B.; McBride, J.W.; Bouyer D.H.; Camargo, L.M.A.; Camargo, E.P.; Walker, D.H. Molecular evidence for a Spotted Fever Group *Rickettsia* species in the ticks *Amblyomma longirostre* in Brazil. *Journal of Medical Entomology*. 2004a; 41 (3): 533-537.

Labruna, M.B.; Whitworth, T.; Horta, M.C.; Bouyer, D.H.; McBride, J.W.; Pinter, A.; Popov V.; Gennari, S.M.; Walker, D.H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the state of Sao Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. Journal of Clinical Microbiology. 2004b; 42: 90-98.

Labruna, M.B.; Whitworth, T.; Bouyer, D.H.; McBride, J.W.; Camargo, L.M.A.; CAMARGO, E.P.; Popov, V.; Walker, D.H. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. Journal of Medical Entomology. 2004c; 41 (6): 1073-1081.

Labruna, M.B.; Camargo, L.M.A.; Erney, P.; Camargo, E.P.; Walker, D.H. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia, Brazil. Veterinary Parasitology. 2005 127:169–174.

Labruna, M.B. Epidemiologia da Febre Maculosa no Brasil e nas Américas. In: I Simpósio Brasileiro de Acarologia, Viçosa-MG. Anais. 2006, 63-78.

Labruna, M.B.; Horta, M.C.; Cavalcante, D.M.G.T.; Pinter, A.; Gennari, S.M.; Camargo, L.M.A. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro Municipality, Western Amazon, Brazil. Vector-Borne and Zoonotic Diseases . 2007a; 7: 249-256.

Labruna MB et al. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from ticks *Haemaphysalis juxtakochi* in the state of São Paulo, Brazil. Appl Environ Microbiol 2007b; 73: 869-873.

Labruna, M. B.; Sanfilippo, L. F.; Demetrio, C.; Menezes, A. C.; Pinter, A.; Guglielmone, A. A.; Silveira, L. F. Ticks collected on birds in the state of São Paulo. Experimental and Applied Acarology. 2007c; 43 (2): 147-160.

Labruna M. B., Venzal J. M. (2009). *Carios fonsecai* sp. Nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. Acta Parasitol. 2009; 54: 355–363.

Labruna MB. Ecology of *Rickettsia* in South America. Rickettsiology and Rickettsial Disease - Fifth International Conference. Annals of the New York Academy of Sciences .

2009; 1166: 156-66.

Labruna M. B., Mattar S., Nava S., Bermudez S., Venzal J. M., Dolz G., et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. Rev. MVZ Córdoba. 2011a; 16:2435–2457.

Labruna, M. B.; Ogrzewalska, M.; SOARES, J. F.; Martins, T. F.; Soares, H. S.; Moraes-Filho, J.; Nieri-Bastos, F. A.; Almeida, A. P.; Pinter, A. Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. Emerging Infectious Diseases. 2011b; 17(5): 829-834.

Levin, M.; Ross, D. E. Acquisition of Different Isolates of *Anaplasma phagocytophilum* by *Ixodes scapularis* from a model animal. Vector-borne and Zoonotic Diseases, 2004; 4(1): 53-59

Lundgren, D. L., Thorpe, B. D., Haskell, C. D. Infectious Diseases in Wild Animals in Utah. VI- Experimental infection of birds with *Rickettsia rickettsii*. Journal of Bacteriology. 1966; 91(3):963-966.

McDade, J. E.; Newhouse, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. Annual Reviews Microbiology. 1986; 40: 287-309.

Melles, H. H. B.; Colombo, S.; Silva, M. V. Spotted fever: *Rickettsia* isolation in a skin biopsy sample, Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1992; 34 (1): 37-41.

Melles, H. H. B.; Colombo, S.; Lemos, E. R. S. Isolamento de *Rickettsia* em cultura de células vero. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 1999; 32 (5): 469-473.

Moraru, G. M.; Goddard, J.; Paddock, C. D.; Stokes, A. V. Experimental infection of cotton rats and bobwhite quail with *Rickettsia parkeri*. Parasite and Vectors. 2013; 6:1-5

Moreira, J. A.; Magalhães, O. Thypho exanthematico em Minas Gerais. Brasil-Medico. 1937; 51 (21): 20-21.

Nava S., Venzal J. M., Terassini F. A., Mangold A. J., Camargo L. M., Labruna M. B.

Description of a new argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in Brazilian Amazon. J. Parasitol. 2010. 96: 1089–1101.

Niebylki, M.L; Peacock, M.G; Schwan, T.G. Lethal effect of *Rickettsia rickettsii* on its tick vector (*Dermacentor andersoni*). Applied Environmental Microbiology. 1999; 65:773–778.

Ogrzewalska, M.; Pacheco, R.; Uezu, A.; Ferreira, F.; Labruna, M. B. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in an Atlantic Forest area in the state of São Paulo, Brazil, with isolation of *Rickettsia* from the tick *Amblyomma longirostre*. Journal of Medical Entomology. 2008; 45: 770-774.

Ogrzewalska M., Saraiva D. G., Moraes-Filho J., Martins T. F., Costa F. B., Pinter A., et al. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. Parasitology.2012; 139: 1283–1300.

Patino, L.; Afafanador, A.; PAUL, J. H. A spotted fever in Tobia, Colombia. Preliminary report. Am J Trop Med. 1937; 17: 639-653.

Philp, R. N.; Casper, E. A.; Burgdorfer, W.; Gerloff, R. K.; Hughes, L. E.; Bell, E. J. Serologic typing of rickettsiae of the spotted fever group by microimmunofluorescence. J Immunol.1978; 121: 1961–1968.

Pinter, A.; Dias, R.A.; Gennari, S.M.; Labruna, M.B. Study of the seasonal dynamics, life cycle, and host specificity of *Amblyomma aureolatum* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology. 2004; 41: 324–332.

Pinter, A.; Labruna, M.B.; Faccini, J.H.L. The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari:Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. Veterinary Parasitology. 2002; 105:79-88.

Pinter, A. & Labruna, M.B. 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. 2006; 1078: 523-529.

Pinter, A. 2007. Aspectos ecológicos da Febre Maculosa Brasileira em foco endêmico no

Estado de São Paulo. Tese de doutorado.

Piranda Eliane M, Faccini João Luis H, Pinter Adriano, Saito Tais B, Pacheco Richard C, Hagiwara Mitika K et al . Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2008; 103(7): 696-701.

Piza, J. T. O carrapato como transmissor do Typho exanthemático de São Paulo. Boletim da Sociedade e Cirúrgica de São Paulo. 1932; 15 (12): 350.

Randolph, S. E.; Gern, L.; Nuttall, P. A. Co-feeding ticks: epidemiological significance for tick-borne pathogen transmission. Parasitology Today. 1996; 12:472-479.

Randolph, S. E. Ticks are not insects: Consequences of Contrasting Vector biology for Transmission potential. Parasitol. Today. 1998; 14: 186-192.

Ricketts, H. T. Some aspects of Rocky Mountain Spotted Fever as shown by recent investigations. Medical Record. 1909; 76: 843-855.

Rodaniche, E. C. Natural infection of the tick *Amblyomma cajennense* with *Rickettsia rickettsii* in Panama. Am J Trop Med Hyg. 1953; 2: 696-699.

Scorpio, D. G.; Wachtman, L. M.; Tunin, R. S.; Barat, N. C.; Garyu, J. W.; Dumler, J. S. Retrospective clinical and molecular analysis of conditioned laboratory dogs (*Canis familiaris*) with serologic reactions to *Ehrlichia canis*, *Borrelia burgdorferi*, and *Rickettsia rickettsii*. American Association for Laboratory Animal Science. 2008; 47(5): 23-28.

Silveira, I.; Pacheco, R.C.; Szabó, M.P.J.; Ramos, H.G.C.; Labruna, M.B. *Rickettsia parkeri* in Brazil. Emerging Infectious Diseases. 2007; 13 (7): 1111-1113.

Sonenshine, D. E.; Clifford, C. M. Contrastion incidence of Rocky Mountain Spotted Fever in ticks infesting wild birds in Eastern U.S. Piedmont and coastal areas, with notes on the ecology of these ticks. Journal of Medical Entomology,. 1973; 10 (5): 407-502.

Sonenshine, D. E. Biology of ticks. New York: Oxford University Press. 1993; 2: 465.

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. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. *Veterinary Parasitology*. 2009; 161: 116-121.

Spolidorio, M. G.; Labruna, M. B.; Mantovani, E.; Brandão, P. E.; Richtzenhain, L. J.; Yoshinari, N. H. Novel spotted fever group Rickettsiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*. 2010; 16 (3): 521-523.

Szabó, M. P. J.; Pascoli, G. V. T.; Marçal, O. Júnior; Alexandre Gabriel Franchin, A. G.; Torga, K. Brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* parasitizing the bird *Coereba flaveola* in the Brazilian cerrado. *Ciência Rural*. 2008; 38 (2): 543-545.

Szabó, M.P.J.; Labruna, M.B.; Garcia, M.V.; Plinter, A.; Castagnolli, K.C.; Pacheco, R.C.; Castro, M.B.; Veronez, V.A.; Magalhães, G.M.; Vogliotti, A.; Duarte, J.M.B. Ecological aspects of the free-living ticks (Acari: Ixodidae) on animal trails within Atlantic rainforest in south-eastern Brazil. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*. 2009; 103 (1): 57–72.

Travassos, J.; Vallejo, A. Comportamento de alguns cavídeos (*Cavia aperea* e *Hydrochoerus capybara*) às inoculações experimentais do vírus da febre maculosa. *Mem Inst Butantan*. 1942a; 15: 73-86.

Travassos, J.; Vallejo, A. Possibilidade de *Amblyomma cajennense* se infectar em *Hydrochoerus capybara* experimentalmente inoculado com o vírus da febre maculosa. *Mem do Inst Butantan*. 1942b; 16: 87-90.

Venzal, J.M.; Félix, M.L.; Olmos, A.; Mangold, A.J.; Guglielmone, A.A. A collection of ticks (Ixodidae) from wild birds in Uruguay. *Experimental and Applied Acarology*. 2005; 36: 325-331.

Zemtsova, G.; Killmaster, L.F.; Mumcuogiu, K.Y.; Levin, M.L. Co-feeding as a route for transmission of *Rickettsia conorii israelensis* between *Rhipicephalus sanguineus* ticks. *Exp Appl Acarol*. 2010; 52(4):383-392.