

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Rickettsia* spp.
EM GALINHAS DE CRIAÇÃO EXTENSIVA DE UMA
REGIÃO ENDÊMICA DO ESTADO DO RIO GRANDE
DO SUL E INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR
*Rickettsia parkeri***

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Jonas Fernandes Maciel

Santa Maria, RS, Brasil

2013

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Rickettsia* spp. EM GALINHAS DE CRIAÇÃO EXTENSIVA DE UMA REGIÃO ENDÊMICA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL E INFECCÃO EXPERIMENTAL POR *Rickettsia parkeri*.

por

Jonas Fernandes Maciel

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**

Orientador: Luis Antonio Sangioni, Dr.

Santa Maria, RS, Brasil

2013

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Departamento de Medicina Veterinária Preventiva

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Rickettsia* spp. EM GALINHAS DE CRIAÇÃO
EXTENSIVA DE UMA REGIÃO ENDÊMICA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO
SUL E INFECCÃO EXPERIMENTAL POR *Rickettsia parkeri*.**

elaborada por

Jonas Fernandes Maciel

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

Comissão Examinadora:

Luis Antonio Sangioni, Dr. (UFSM)
(Presidente)

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr. (UFSM)

Adriano Pinter dos Santos, Dr. (SUCEN-SP)

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2013.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, o meu porto seguro, aquele que me dá força e coragem quando estou com medo, que me conforta quando estou triste e que me guia a cada passo e a cada escolha que faço em minha vida.

Aos meus pais, Nilda e Olavo, pelo carinho e amor incondicional, por todo o apoio que me foi dado nestes dois anos de caminhada. Sem vocês eu nada seria, nada!

Aos meus irmãos, Jean e Cita, pelo apoio nessa minha escolha, e por entenderem minha ausência em muitos momentos familiares. Amo vocês!

Ao meu orientador, professor Dr. Luis Antonio Sangioni, por todo o apoio e ensinamentos a mim passados. Hoje, sou mais maduro e devo muito isso ao senhor! O meu muito obrigado.

À professora Dra. Fernanda Silveira Flores Vogel, minha co-orientadora por todos os conhecimentos a mim passados e pelo incentivo no início dessa caminhada.

À professora Dra. Sônia de Avila Botton, minha co-orientadora por toda a ajuda, conselhos e explicações a mim transmitidos.

À toda equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) pelo companheirismo, trabalho duro, apoio, risadas, choros, “pixuruns” e mates intermináveis. Aqui todo o meu carinho e sincero agradecimento a vocês, Ana, Giovana, Pati, Gustavo, Maiara, Carol, Felipe, Fabrício, Thiago, Luiza, Joice, Augusto, Martinha, Ivan (*in memoriam*), Andressa (*in memoriam*), Camila, João, Ananda e a nossa Valdete por terem feito os meus dias mais agradáveis durante o mestrado e ter a certeza de que conquistei amigos!

Ao Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal da FMVZ-USP em especial ao professor Dr. Marcelo Bahia Labruna e ao doutorando Felipe Krawczak pela ajuda e orientação.

À Secretaria de Saúde e Meio Ambiente de Cerro Largo-RS, especialmente ao secretário Ranieri Tonim e à agente de saúde Francine Schwertner.

Ao Laboratório Central de Diagnóstico e Patologias Aviárias (LCDPA), em especial à Professora Dra. Maristela Lovato e às residentes Maria Amélia e Lilian pelos auxílios profissionais do experimento.

À Universidade Federal de Santa Maria (UFSM) e ao Programa de Pós Graduação em Medicina Veterinária (PPGMV) pela oportunidade da realização do mestrado e ainda à CAPES e ao CNPq pelo fomento dessa pesquisa.

À secretária Maria do PPGMV pela eficiência e profissionalismo.

E a todos aqueles que de alguma forma tornaram essa realização possível, o meu
muito obrigado!

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria

DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-*Rickettsia* spp. EM GALINHAS DE CRIAÇÃO EXTENSIVA DE UMA REGIÃO ENDÊMICA DO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL E INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR *Rickettsia parkeri*.

AUTOR: JONAS FERNANDES MACIEL

ORIENTADOR: LUIS ANTONIO SANGIONI

Santa Maria, 27 de fevereiro de 2013.

Este estudo teve como objetivo avaliar a infecção natural de galinhas de criação extensiva de uma área considerada endêmica para a febre maculosa no estado do Rio Grande do Sul através de pesquisa sorológica, bem como realizar a infecção experimental por *Rickettsia parkeri* nessas aves. No primeiro estudo, foram coletadas 300 amostras de sangue e os soros foram testados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para identificar a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. A ocorrência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. observada foi de 1,33% (4/300), com títulos variando de 64 a 256 para *R. parkeri*, *Rickettsia rickettsii* e/ou *Rickettsia bellii*. Na segunda etapa, foi realizada a infecção experimental por *R. parkeri*, o qual foram utilizadas 64 galinhas caipiras divididas em oito grupos, onde foram inoculadas diferentes quantidades do agente por diversas vias de administração. Grupo 1 (G1) - inoculado com $2,5 \times 10^5$ células Vero infectadas por *R. parkeri* (1 ml) via intramuscular (IM); G2 - $5,0 \times 10^5$ células Vero infectadas por *R. parkeri* (2 ml) via IM; G3 - 1 ml do inóculo via subcutânea (SC); G4 - 2 ml de inóculo via SC; G5 - 1 ml do inóculo via intraperitoneal (IP); G6 - 2 ml de inóculo via IP, e o G7 e G8 - 1 e 2 ml de meio de cultivo de células Vero via IM respectivamente (grupos controles negativos). Os soros das aves foram avaliados aos 3, 7, 14 e 21 dias pós infecção (PI) por meio de RIFI, para avaliar a dinâmica de anticorpos em infecção aguda e crônica. Para identificar a multiplicação de *R. parkeri* nos tecidos, no mesmo período PI, foi realizado o PCR a partir de fragmentos de baço e pulmão colhidos das galinhas eutanasiadas. As aves do G4 e G3, em ordem de importância, apresentaram as maiores médias de anticorpos apresentando os níveis mais elevados aos sete e 14 dias PI. Os grupos G2, G4 e G6 apresentaram médias de anticorpos superiores comparado ao G1, G3 e G5 respectivamente, sendo considerada a infecção dose-dependente. Não foi detectado DNA rickettsial nos tecidos avaliados. Os resultados de ambos os estudos sugerem que as galinhas de criação extensiva da área endêmica pesquisada não participaram como reservatório e/ou hospedeiro amplificador na epidemiologia da febre maculosa na região e baseado na infecção experimental, verificou-se que as aves soroconverteram

mediante o desafio por *R. parkeri*, porém não houve a multiplicação do agente nos tecidos analisados, bem como a presença de rickettsemia.

Palavras-chave: aves, *R. parkeri*, anticorpos, febre maculosa, reação de imunofluorescência indireta, reação em cadeia da polimerase.

ABSTRACT

Master's Dissertation

Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária

Universidade Federal de Santa Maria

DETECTION OF ANTI-*Rickettsia* spp. ANTIBODIES IN CHICKENS OF EXTENSIVE BREEDING FROM A ENDEMIC REGION OF THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL AND EXPERIMENTAL INFECTION BY *Rickettsia parkeri*.

AUTHOR: JONAS FERNANDES MACIEL

ADVISER: LUIS ANTONIO SANGIONI

Santa Maria, February, 27th, 2013.

The aim of this study was to evaluate the natural infection of chickens of extensive breeding of an area considered endemic for spotted fever in the state of Rio Grande do Sul through serological survey, as well as to perform the experimental infection by *Rickettsia parkeri* these birds. In the first study, 300 blood samples were collected and the sera were tested by indirect immunofluorescence assay (IFA) to identify the presence of anti-*Rickettsia* spp. antibodies. The occurrence of anti-*Rickettsia* spp. antibodies observed was 1.33% (4/300), with titers ranging from 64 to 256 for *R. parkeri*, *Rickettsia rickettsii* and/or *Rickettsia bellii*. In the second step, was performed the experimental infection by *R. parkeri*. 64 chickens were used divided into eight groups which were inoculated with different amounts of the agent by several routes of administration. Group 1 (G1) - inoculated with $2,5 \times 10^5$ Vero cells infected with *R. parkeri* (1 ml) intramuscular (IM); G2 - $5,0 \times 10^5$ Vero cells infected with *R. parkeri* (2 ml) IM, G3 - 1 ml of inoculum subcutaneously (SC); G4 - 2 ml of inoculum SC; G5 - 1 ml of the inoculum intraperitoneally (IP); G6 - 2 ml of inoculum IP, and G7 and G8 - 1 ml and 2 ml of culture medium Vero cells IM respectively (negative control groups). The sera of chickens were evaluated at 3, 7, 14 and 21 days post infection (PI) by IFA, to verify the dynamics of antibodies in acute and chronic infection. To identify the multiplication of *R. parkeri* in tissues during the same period PI, PCR was performed from fragments of spleen and lung of chickens euthanized. Birds of G4 and G3, in order of importance, had the highest average antibody showing the highest levels at seven and 14 days PI. G2, G4 and G6 showed higher mean antibody compared to G1, G3 and G5 respectively, considering the infection dose-dependent. Rickettsial DNA was not detected in the tissues evaluated. The results of both studies suggest that chickens of extensive breeding from

endemic area searched do not participate as a reservoir and/or amplifier host in the epidemiology of spotted fever of region and based in the experimental infection, it was verified that birds seroconverted by the challenge by *R. parkeri*, but no replication of the agent in the tissues analyzed, nor the presence of rickettsemia.

Keywords: birds, *R. parkeri*, antibodies, spotted fever, indirect immunofluorescence assay, polymerase chain reaction.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

FIGURA 1: Análise comparativa dos níveis de Anticorpos anti-*R. parkeri* obtidas na infecção experimental de *R. parkeri* de galinhas de criação extensiva, nos dias 3, 7, 14 e 21 PI. Letras distintas entre grupos representa diferença estatística ($P \leq 0,05$). (a) 3 dias PI, (b) 7 dias PI, (c) 14 dias PI e (d) 21 dias PI. Dados normalizados através da formula $\text{Log}(X + 10)$, onde X é o valor da titulação obtida para cada indivíduo.....49

FIGURA 2: Dinâmica de anticorpos anti-*R. parkeri* em galinhas de criação extensiva de acordo com as médias de títulos detectados entre as aves dos oito grupos experimentais. G1: $2,5 \times 10^5$ células infectadas por *R. parkeri* (1 ml de inóculo) via intramuscular (IM). G2: $5,0 \times 10^5$ células infectadas por *R. parkeri* (2 ml de inóculo) via IM. G3: 1 ml de inóculo via subcutânea (SC). G4: 2ml de inóculo via SC. G5: 1ml de inóculo via intraperitoneal (IP). G6: 2 ml de inóculo via IP. G7 e G8: 1ml e 2 ml de meio via IM respectivamente (grupos controle negativos).....50

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO I

TABELA 1. Títulos de anticorpos anti- <i>Rickettsia</i> em quatro galinhas de criação extensiva soropositivas para <i>R. rickettsii</i> e/ou <i>R. parkeri</i>	30
--	----

CAPÍTULO II

TABELA 1. Níveis médios e desvio padrão de anticorpos anti- <i>R. parkeri</i> de cada grupo experimental em diferentes períodos Pós Infecção (PI), pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).....	48
---	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. CAPÍTULO I. DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-<i>Rickettsia</i> spp. EM GALINHAS DOMÉSTICAS DE CRIAÇÃO EXTENSIVA NUMA ÁREA ENDÊMICA PARA FEBRE MACULOSA NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL.....	18
Resumo.....	18
Abstract.....	19
Introdução.....	20
Materiais e métodos.....	22
Resultados e Discussão.....	23
Conclusão.....	26
Comitê de ética e biossegurança.....	26
Referências.....	26
3. CAPÍTULO II. AVALIAÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR <i>Rickettsia parkeri</i> EM GALINHAS DOMÉSTICAS (<i>Gallus gallus domesticus</i>).....	31
Resumo.....	31
Abstract.....	32
Introdução.....	33
Materiais e métodos.....	34
Resultados.....	39
Discussão.....	40
Conclusão.....	43
Comitê de ética e biossegurança.....	44
Referências.....	44
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	51
5. CONCLUSÕES.....	54
6. REFERÊNCIAS.....	55

1. INTRODUÇÃO

O gênero *Rickettsia* é constituído por bactérias intracelulares obrigatórias, causadoras de doenças exantemáticas, transmitida por artrópodes vetores ao homem e a outros vertebrados (PAROLA et al., 2005). Esse gênero é composto basicamente por três grupos: o Grupo do Tifo (GT) que inclui duas espécies, *Rickettsia prowazekii* e *R. typhi*, cujos vetores são piolhos e pulgas respectivamente e o Grupo da Febre Maculosa (GFM) com grande número de espécies tendo o carrapato como o principal vetor. As exceções desse último grupo são *R. felis* que tem como vetores as pulgas e *R. akari* os ácaros. *R. bellii*, *R. canadensis* e *R. monteiroi* apresentam particularidades genéticas e antigênicas que não permitiram serem incluídas em nenhum dos grupos anteriores, sendo constituintes do Grupo de Transição ou Ancestral (AZAD & BEARD, 1998; PAROLA et al., 2005).

O GFM são as espécies que compõem os agentes etiológicos de zoonoses classificadas como Febre Maculosa. As espécies que tradicionalmente fazem parte desse grupo são microorganismos cosmopolitas, na qual a doença ocasionada recebe nomes diferentes em virtude da sua localização geográfica. Nas Américas, *Rickettsia rickettsii* é o agente etiológico da Febre Maculosa das Montanhas Rochosas (*Rocky Mountain Spotted Fever*), especificamente nos Estados Unidos da América (EUA) e, da Febre Maculosa Brasileira (FMB) no Brasil. No continente europeu, *R. conorii* é conhecida como o agente causador da Febre Botonosa ou Febre Maculosa do Mediterrâneo, enquanto que as espécies *R. mongolotimonae*, *R. slovaca* e *R. helvetica* estão envolvidas na etiologia da Rickettsiose europeia. Na África, *R. africae* é a espécie implicada na causa da Febre da Picada do Carrapato, enquanto que na Oceania, *R. australis* e *R. honei* são agentes do Tifo do Carrapato de Queensland e do Tifo da Ilha de Flinders respectivamente. Já no continente asiático, as

espécies incriminadas como causadoras de rickettsioses são *R. sibirica*, agente do Tifo Siberiano ou do Norte da Ásia e *R. japonica* agente da Febre Maculosa Oriental. (BEATI & RAOULT, 1998; FOURNIER et al., 2000; LABRUNA et al., 2001; SANGIONI, 2003).

R. rickettsii é o principal agente etiológico da Febre Maculosa, sendo a espécie mais estudada dentre as do GFM, considerada a espécie mais patogênica para seres humanos e alguns animais. No Brasil, outras espécies com capacidade de causar a doença foram descritas: *R. parkeri* (SILVEIRA et al., 2007) e *R. felis* (RAOULT et al., 2001; HORTA et al., 2006). Existem ainda outras espécies circulantes no país como *R. amblyommii*, *R. rhipicephali*, *R. bellii*, e *R. monteiroi* com patogenicidade desconhecida para humanos (LABRUNA et al., 2004a; 2005; PAROLA et al., 2005; LABRUNA et al., 2006; PINTER & LABRUNA, 2006; LABRUNA et al., 2007, LABRUNA et al., 2011).

Os reservatórios naturais de *R. rickettsii* incluem os carrapatos da família Ixodidae de vários gêneros e espécies (AZAD & BEARD, 1998). No Brasil, os carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. são os principais vetores que transmitem a FMB ao homem e a muitos outros mamíferos e aves (BALASHOV, 1972; GALVÃO & RIBEIRO, 1993; MCDADE & NEWHOUSE, 1986; ESTRADA et al., 2006). *Amblyomma cajennense* apresenta alta afinidade por seres humanos (PAROLA & RAOULT, 2001), onde equinos e capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) estão entre os hospedeiros primários mais importantes de todos os estágios parasitários do carrapato (VIEIRA et al., 2004; GUEDES et al., 2005).

Além do *A. cajennense*, outras espécies de carrapatos relatados no Brasil foram apontados sendo infectados por rickettsias, como *A. aureolatum*, *A. dubitatum*, *A. nodosum*, *A. coelebs*, *A. longirostre*, *A. geayi*, *A. triste*, *A. ovale*, *A. oblongoguttatum*, *A. scalpturatum*, *A. humerale*, *A. rotundatum*, *A. incisum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis juxtakochi* e *Ixodes loricatus* (LABRUNA et al., 2011). Desses, *A. aureolatum*, comumente

conhecido no Brasil como “carrapato amarelo-do-cão”, tem sido implicado também como vetor de *R. rickettsii* no Brasil (PINTER & LABRUNA, 2006).

A FMB tem sido relatada principalmente na região sudeste do Brasil, que inclui os estados de Minas Gerais, São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo. Nesses estados, a ocorrência da doença tem sido sempre acompanhada por muitos casos clínicos em seres humanos que culminaram em morte, devido à ausência ou demora no tratamento com terapia anti-rickettsial efetiva, como as tetraciclina e o cloranfenicol (GUEDES et al., 2005; NASCIMENTO et al., 2005; PINTER & LABRUNA, 2006). O estado de Minas Gerais apresenta o maior número de casos registrados da doença sendo que, em algumas áreas, o número de óbitos é elevado (VRANJAC, 2003).

A situação das rickettsioses no estado do Rio Grande do Sul concentra-se na região noroeste (região das Missões), na cidade de Cerro Largo. No ano de 2005 foi relatado o primeiro caso humano provável de rickettsiose associado ao GFM, seguido de outro caso confirmado no ano de 2007, ambos não fatais. Estudos na região através de amostras de soro provenientes de equinos, caninos e humanos de propriedades rurais locais testadas por imunofluorescência indireta, apresentaram sororeatividade com títulos variando de 64 a 2048 contra pelo menos um dos cinco antígenos rickettsiais testados que circulam no país (*R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. amblyommii*, *R. bellii* e *R. rhipicephali*). Amostras de cães apresentaram títulos finais para *R. parkeri* pelo menos quatro vezes superior aos títulos das demais espécies de *Rickettsia* testadas, sugerindo *R. parkeri* como o possível agente etiológico que infectam seres humanos e animais na região (SANGIONI et al., 2011).

R. parkeri foi considerada não patogênica por mais de 60 anos, sendo recentemente documentada causando infecções em seres humanos nos Estados Unidos (PADDOCK et al., 2004), Uruguai (CONTI-DIAZ et al., 2009), Argentina (ROMER et al., 2012) e no momento, associada a transmissão por carrapatos (*A. longirostre* e *A. ovale*) e casos da doença clínica

em seres humanos no Brasil (SILVEIRA et al., 2007; SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011, MEDEIROS et al., 2011).

Os eqüinos e caninos são considerados animais sentinelas na epidemiologia da FM ocasionada por *R. rickettsii* (SANGIONI et a., 2011), entretanto o papel de muitos animais como reservatórios ainda não está bem definido (WOLBACH, 1919; BOZEMAN et al., 1967; AZAD & BEARD, 1998;). Atualmente, as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) e os gambás (*Didelphis aurita*) são considerados hospedeiros amplificadores da espécie *R. rickettsii* para carrapatos *Amblyomma* spp. em condições experimentais, sendo apontados como fonte de infecção para várias espécies de carrapatos da fauna brasileira (SOUZA et al., 2009; HORTA et al., 2009).

As aves são hospedeiros essenciais de vários ectoparasitas, dentre eles os carrapatos do gênero *Amblyomma*, que infectam e transmitem doenças ao homem (CLIFFORD et al., 1969; OGRZEWALSKA et al., 2010). Os carrapatos, principalmente as formas imaturas, espoliam as aves e difundem-se geograficamente em virtude da mobilidade destas. Esta difusão se constitui em um problema sério se os carrapatos transportados albergam e são vetores de agentes infecciosos (ARZUA et al., 2003, EVANS et al., 2000, BARROS-BATTESTI, 2006, OGRZEWALSKA et al., 2010).

Poucos relatos a respeito da infecção de agentes transmitidos por carrapatos em aves têm disponível em literatura. As rickettsias têm sido detectadas em carrapatos de vida parasitária, no velho continente, desde 1969 (CLIFFORD et al., 1969), porém os papéis de muitas aves como reservatórios da FMB ainda permanecem desconhecidos. No Brasil já foram identificados carrapatos, parasitando aves silvestres, infectados com rickettsias do GFM (OGRZEWALSKA et al., 2010; 2011; 2012). Carrapatos dos gêneros *Ixodes* spp., *Hyalomma* spp., *Rhipicephalus* spp., *Argas* spp., oriundos de aves migratórias, infectados com rickettsias, detectados através de PCR, foram identificados na Alemanha, Inglaterra, Portugal

e EUA (REEVES et al., 2006; SANTOS SILVA et al., 2006; HILDEBRANDT et al., 2010; GRAHAM, et al., 2010).

O diagnóstico de rickettsioses em vertebrados (humanos e animais) pode ser realizado por testes imunológicos como o ELISA e a imunofluorescência indireta, considerado o padrão ouro dos testes sorológicos para rickettsioses; e também por métodos microbiológicos (isolamento), imunohistoquímicos e moleculares (PCR). Artrópodes potencialmente infectados podem ser confirmados principalmente pela presença de DNA rickettsial através de PCR e também no caso de carrapatos, pelo teste de hemolinfa baseado na coloração de Gimenez, normalmente empregado para triagem dos vetores infectados (BURGDORFER et al., 1962; CHAPMAN et al., 2006).

A detecção molecular de DNA rickettsial tanto em vertebrados quanto em artrópodes vetores baseia-se na amplificação de um fragmento específico do gene *gltA*, conservado em todas as espécies do gênero *Rickettsia* spp. e da amplificação de fragmentos dos genes *ompA* e *ompB* que codificam proteínas externas de membrana de 190 kDa e 120 kDa respectivamente (LABRUNA et al., 2004b; REGNERY et al., 1991, EREMEEVA et al., 1994).

Considerando a problemática de não existir relatos demonstrando o papel das aves como reservatório e hospedeiro amplificador de rickettsias, sendo apenas incriminadas como transportadoras de carrapatos infectados por rickettsias do GFM, justifica-se este estudo com o intuito de elucidar o papel destas aves no ciclo desta rickettsiose.

Dessa forma, esta pesquisa visa contribuir para o estudo da participação das aves, representadas por galinhas, na epidemiologia da FMB, sendo constituído por dois capítulos. O primeiro, através de uma pesquisa sorológica em galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) de criação extensiva, em área considerada endêmica para a FMB no estado do Rio Grande do Sul e dessa forma avaliar a situação da infecção natural nesta espécie e sua importância no local estudado. O segundo capítulo tem como objetivo estabelecer como *R.*

parkeri se comporta em infecção experimental em galinhas domésticas, verificando a dinâmica de anticorpos e a detecção de DNA rickettsial tecidual em diferentes períodos de tempo, doses de inóculo e vias de administração, bem como quaisquer alterações clínicas.

2. CAPÍTULO I

Detecção de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em galinhas domésticas de criação extensiva numa área endêmica para febre maculosa no estado do Rio Grande do Sul, Brasil

Detection of antibodies anti- *Rickettsia* spp. in domestic chickens of extensive breeding in an endemic area for spotted fever in the state of Rio Grande do Sul, Brazil

Jonas Fernandes Maciel^{I*}, Felipe S. Krawczak^{II}, Caroline Sobotyck de Oliveira^I, Jonas Moraes-Filho^{II}, Marcelo B. Labruna^{II}, Sônia de Avila Botton^I, Fernanda Silveira Flores Vogel^I, Luis Antonio Sangioni^I

(Artigo submetido na revista científica Ciência Rural, 2013)

RESUMO

Este estudo teve como objetivo pesquisar anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em soros de galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) de criação extensiva provenientes de área considerada endêmica para febre maculosa no estado do Rio Grande do Sul. Foram coletadas

^I Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5149, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900. Telefone: (55) 3220 8071. E-mail: jonasfernandesmaciel@gmail.com. *Autor para correspondência.

^{II} Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil 05508-270.

300 amostras de sangue e os soros obtidos foram testados para anticorpos anti-*Rickettsia* spp. pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI). A ocorrência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. observada foi de 1,33% (4/300), com títulos variando de 64 a 256 para *Rickettsia rickettsii*, *Rickettsia parkeri* e/ou *Rickettsia bellii*. Os resultados sugerem que estas galinhas de criação extensiva não participam como reservatório e/ou hospedeiro amplificador na epidemiologia da febre maculosa na área endêmica. O presente estudo consiste na primeira pesquisa sorológica em *Gallus gallus domesticus* para rickettsia do grupo da febre maculosa no Brasil.

Palavras-chave: Reação de Imunofluorescência Indireta, carrapatos, rickettsioses, aves.

ABSTRACT

The goal of this study was to investigate anti-*Rickettsia* spp. antibodies in sera of domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) of extensive breeding in Cerro Largo county, considered an endemic area for spotted fever in the State of Rio Grande do Sul, Brazil. Three hundred blood samples were collected and anti-*Rickettsia* spp. antibodies were evaluated by indirect immunofluorescence assay (IFA) in the sera obtained. The occurrence of anti-*Rickettsia* spp. antibodies detected in this study was 1.33% (4/300), with endpoint titers ranging from 64 to 256 for *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri* and/or *R. bellii*. The results suggest these chickens of extensive breeding do not participate as a reservoir and/or amplifying host in the epidemiology of spotted fever in that endemic area. The present study consists in the first serological survey in *Gallus gallus domesticus* to rickettsiae-spotted fever group in Brazil.

Key words: indirect immunofluorescence assay, ticks, rickettsiosis, birds.

INTRODUÇÃO

O gênero *Rickettsia*, pertencente à ordem Rickettsiales, é composto por diferentes espécies de bactérias intracelulares obrigatórias, dentre elas, os agentes etiológicos de doenças exantemáticas agudas transmitidas por carrapatos, globalmente chamadas de febre maculosa (PAROLA et al., 2005). No Brasil, o principal agente causador de febre Maculosa é *Rickettsia rickettsii*, considerada a espécie mais patogênica do gênero para humanos e alguns animais, transmitida no país pelos carrapatos *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma aureolatum* (PINTER & LABRUNA 2009; SOARES et al., 2012). A doença causada por *R. rickettsii* tem recebido o nome de febre maculosa brasileira, com ocorrência confirmada apenas nos estados da Região Sudeste, onde *R. rickettsii* foi isolada ou detectada por métodos moleculares em humanos, animais e carrapatos (LABRUNA et al., 2011).

Outros registros de rickettsias patogênicas transmitidas por carrapatos no Brasil referem-se à *Rickettsia parkeri*, agente etiológico de uma febre maculosa cutâneo ganglionar, associada a carrapatos da espécie *Amblyomma triste* no Brasil, Uruguai e Argentina (VENZAL et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007; NAVA et al., 2008), mas com casos humanos confirmados apenas nos últimos dois países (CONTI-DÍAZ et al., 2009; ROMER et al., 2011). Recentemente, casos humanos de uma nova cepa de *Rickettsia*, geneticamente associada a *R. parkeri*, foram diagnosticados nos estados de São Paulo e Bahia (SPOLIDORIO et al., 2010; SILVA et al., 2011). Esta nova cepa, inicialmente designada como cepa Mata Atlântica, está associada primariamente a carrapatos da espécie *Amblyomma ovale*, e secundariamente a *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* (SABATINI et al., 2010; MEDEIROS et al., 2011). Em outras partes do país, casos humanos de febre maculosa foram diagnosticados principalmente por métodos sorológicos indiretos, o que não permitiu a identificação da espécie de *Rickettsia*, uma vez que há reações cruzadas entre praticamente todas as espécies causadoras de febre maculosa. Por outro lado, o encontro

de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica em carrapatos de áreas endêmicas para febre maculosa no estado de Santa Catarina, onde dezenas de casos humanos têm sido confirmados apenas por sorologia, sugerem que a cepa Mata Atlântica seja o principal agente etiológico de febre maculosa neste estado (MEDEIROS et al., 2011).

Outras espécies de *Rickettsia*, consideradas não patogênicas ou de patogenicidade desconhecida, foram relatadas infectando carrapatos dos gêneros *Amblyomma*, *Haemaphysalis* e *Ixodes* no Brasil, dentre elas, *Rickettsia bellii*, *Rickettsia amblyommii*, *Rickettsia rhipicephali* e *Rickettsia monteiroi* (LABRUNA et al., 2011). Destas, apenas as espécies *R. bellii* e *R. monteiroi* não estão geneticamente e sorologicamente relacionadas às espécies pertencentes ao grupo das febres maculosas (PAROLA et al., 2005).

As aves estão entre os hospedeiros preferenciais das formas imaturas de muitas espécies de carrapatos do gênero *Amblyomma* no Brasil (ARZUA et al., 2003; OGRZEWALSKA et al., 2010; 2011; 2012; LUZ et al., 2012). Os carrapatos parasitam estes hospedeiros e aproveitam a sua mobilidade para a difusão geográfica. Esta propagação se torna ainda mais importante se os carrapatos transportados pelas aves são vetores e albergam agentes infecciosos (MOVILA et al., 2012). Estudos de prevalência de *Rickettsia* spp. em carrapatos de vida parasitária de aves têm sido realizados em diversos locais no mundo, inclusive no Brasil (LABRUNA et al., 2007; OGRZEWALSKA et al., 2010; 2011; LUZ et al., 2012). Todos esses estudos foram realizados em aves silvestres, especialmente da ordem Passeriformes. Por outro lado, há escassez nos estudos sorológicos das rickettsioses em aves, sejam silvestres ou domésticas, havendo ainda lacunas quanto à demonstração do seu papel como reservatório ou hospedeiro amplificador na epidemiologia de doenças como a febre maculosa (OGRZEWALSKA et al., 2012).

O objetivo deste trabalho foi detectar anticorpos anti-*Rickettsia* spp. em galinhas de domésticas (*Gallus gallus domesticus*) de criação extensiva provenientes de propriedades

rurais de uma área considerada endêmica para febre maculosa no estado do Rio Grande do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

Local do estudo

A pesquisa foi realizada em 29 propriedades rurais do município de Cerro Largo, noroeste do Rio Grande do Sul (28°08'49"S, 54°44'17"W), no período de maio a novembro de 2011. Casos humanos de febre maculosa foram recentemente relatados na área rural deste município, porém a espécie de *Rickettsia* não foi determinada (SANGIONI et al., 2011). As propriedades amostradas eram de pequeno porte, caracterizadas por mão-de-obra familiar, criação de diversas espécies animais, incluindo galinhas domésticas de forma extensiva, e eram localizadas adjacentes a fragmentos de mata nativa.

Amostragem

Das propriedades rurais amostras, foi coletado um total de 300 amostras de sangue de galinhas (*Gallus gallus domesticus*), de criação extensiva, potencialmente expostas ao parasitismo por carrapatos. A coleta do sangue foi realizada por punção da veia ulnar e as amostras foram acondicionadas em tubos de ensaio e mantidas refrigeradas. As amostras foram encaminhadas ao laboratório para a extração do soro sanguíneo, o qual foi mantido congelado a -20°C até o momento do teste sorológico.

Reação de Imunofluorescência Indireta

Os soros das galinhas foram testados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) frente a antígenos brutos de diferentes espécies de *Rickettsia*, conforme descrito previamente (HORTA et al., 2004). Para tal, cada soro foi inicialmente testado na diluição 1:64 em PBS para os antígenos de *R. rickettsii* (cepa Taiacu) e *R. parkeri* (cepa At24), espécies comprovadamente patogênicas e de transmissão por carrapatos no Brasil. Caso

alguma amostra de soro desse reatividade a pelo menos um desses dois antígenos, na diluição 1:64, as titulações eram feitas para os dois antígenos e também para outras espécies de ocorrência no Brasil, tais como *R. amblyommii* (cepa Ac37), *R. rhipicephali* (cepa HJ5), *R. felis* (cepa Pedreira) e *R. bellii* (cepa Mogi), com a finalidade de inferir, pela diferença de títulos finais, o possível antígeno envolvido nos casos soropositivos, conforme previamente estabelecido (HORTA et al., 2004; 2010; PIRANDA et al., 2008). Em todas as reações, foram utilizados soros controle positivo e controle negativo. O soro controle negativo foi obtido de uma galinha SPF. Para obtenção do controle positivo, essa mesma galinha foi inoculada pela via intramuscular com um inóculo constituído de aproximadamente 500.000 células Vero infectadas com *R. rickettsii*, e observada quanto a alterações clínicas e temperatura retal até o vigésimo primeiro dia após inoculação, quando a galinha foi sangrada para obtenção do soro que serviu como controle positivo. Em todas as reações, o conjugado utilizado foi anticorpo secundário anti-IgY de galinha, produzido em coelho e marcado com isotiocianato de fluoresceína (Sigma Diagnostics, St. Luis, Mo) na diluição de 1:3000, previamente determinada na titulação do soro controle positivo.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A galinha SPF inoculada com *R. rickettsii* apresentou-se clinicamente normal, sem aumento da temperatura retal durante os 21 dias de observação. O título de anticorpos do soro controle positivo, obtido 21 dias após inoculação desta galinha, foi de 4096 tanto para *R. rickettsii* como para *R. parkeri*. Esse soro foi utilizado na diluição 1:64 como controle positivo em todas as reações com soros de aves de campo. O soro desta mesma galinha SPF, colhido antes de sua inoculação com *Rickettsia*, não apresentou qualquer reação aos antígenos de *Rickettsia* testados, e foi usado como controle negativo nas reações.

Das 300 amostras de galinhas, testadas inicialmente para as espécies *R. rickettsii* e *R. parkeri* através da RIFI, apenas quatro aves (1,3%) foram reativas para *R. rickettsii* e/ou *R. parkeri*. Quando essas quatro amostras foram tituladas para as diferentes espécies de *Rickettsia*, os títulos finais para *R. rickettsii* e *R. parkeri* foram 64 a 128; nenhuma amostra foi sororeativa a *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* ou *R. felis*, ao passo que uma única amostra apresentou título final de 256 para *R. bellii* (Tabela 1).

O município de Cerro Largo-RS foi escolhido como área-alvo para a presente pesquisa, pois neste local foi confirmado um caso humano de febre maculosa em 2007, precedido de um caso provável em 2005 (SANGIONI et al., 2011). Subsequentemente, um estudo epidemiológico demonstrou que 16 (51.6%) de 31 equinos, seis de 27 (22.3%) cães e oito de 27 (29.6%) humanos, todos saudáveis, mostraram anticorpos reagentes (título ≥ 64) para *R. rickettsii* e para *R. parkeri*, com títulos finais de até 512, 1024, e 2048 para equinos, cães e humanos, respectivamente. Dois dos cães sororeativos mostraram títulos finais para *R. parkeri* no mínimo quatro vezes maior que os títulos para as demais espécies de *Rickettsia* testadas, sugerindo que *R. parkeri* ou um genótipo próximo estava circulando na região (SANGIONI et al., 2011). Este estudo prévio indicou a área rural de Cerro Largo como endêmica para febre maculosa, motivando o presente estudo.

Galinhas criadas extensivamente apresentam livre circulação na área rural. Por esta razão, estão potencialmente expostas a carrapatos, e conseqüentemente, à infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa. *Amblyomma ovale* é espécie de carrapato predominante na região de Cerro Largo, com relatos de parasitismo inclusive em humanos (SANGIONI et al., 2011). Essa espécie, principalmente larvas e ninfas, tem como hospedeiros principais as aves e pequenos mamíferos (SZABÓ et al., 2012). SZABÓ et al. (2013) identificaram este ácaro infectado por *R. parkeri* e *R. bellii* em regiões da mata atlântica. As galinhas da presente pesquisa apresentaram sororeatividade para ambas as espécies de

rickettsias associadas a *A. ovale*, sugerindo que essas aves poderiam ter sido parasitas por essa espécie de carrapato.

Além disso, as galinhas neste sistema de criação apresentam uma alimentação diversificada, incluindo diversos invertebrados como artrópodes e anelídeos, dos quais diversas espécies já foram relatadas infectadas por rickettsias geneticamente próximas a *R. bellii* (KIKUCHI & FUKATSU, 2005; WEINERT et al., 2009). No entanto, no presente estudo, apenas 1,3% das galinhas foram sororeativas a rickettsias do grupo da febre maculosa, com títulos finais (máximo 128) bem abaixo dos títulos previamente encontrados em equinos, cães e humanos na mesma região (SANGIONI et al., 2011). Esses achados sugerem que as galinhas não apresentam importância epidemiológica na história natural da febre maculosa em Cerro Largo, seja por uma possível refratariedade à infecção, ou simplesmente porque não são parasitadas por carrapatos vetores de febre maculosa. Essas duas possibilidades precisam ser testadas em futuros estudos. Embora a galinha inoculada com *R. rickettsii* no presente estudo não apresentou alterações clínicas, ela soroconverteu com altos títulos, sugerindo susceptibilidade à infecção. LUNDGREN et al. (1966) inocularam *R. rickettsii* em diferentes espécies de aves, incluindo galinhas. Os autores não detectaram títulos de anticorpos pelo teste de fixação do complemento em galinhas, no entanto, foi demonstrado rickettsemia nessas aves.

No presente trabalho, uma única galinha de campo apresentou título final de 256 a *R. bellii*, espécie não pertencente ao grupo da febre maculosa. Embora *R. bellii* tenha sido relatada infectando uma grande variedade de carrapatos no Brasil (LABRUNA et al., 2011), espécies geneticamente próximas de *R. bellii* têm sido reportadas infectando uma variedade de invertebrados de vida livre no solo (KIKUCHI & FUKATSU, 2005; WEINERT et al., 2009). Desta forma, o presente achado de uma galinha com título (256) para *R. bellii*, pelo menos quatro vezes mais alto que os títulos para rickettsias do grupo da febre maculosa

(máximo 64; Tabela 1), sugere que esta galinha possa ter se infectado através de contatos com outras fontes diferentes de carrapatos, como por exemplo, através da ingestão de algum invertebrado infectado por uma genótipo próximo de *R. bellii*.

CONCLUSÃO

O presente trabalho consiste no primeiro inquérito sorológico de galinhas domésticas de criação extensiva para rickettsias do grupo da febre maculosa. Os resultados sugerem que estas galinhas não apresentam importância epidemiológica como reservatório e/ou hospedeiro amplificador do agente etiológico da febre maculosa em Cerro Largo.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), com o parecer número: 009/2011.

REFERÊNCIAS

ARZUA, M. et al. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae) on birds in the southern Brazil, with notes on their ecology. **Experimental and Applied Acarology**, v. 31, p.283-296, 2003.

CONTI-DÍAZ, I. A. et al. Serological evidence of *Rickettsia parkeri* as etiological agent of rickettsiosis in Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p.337-339, 2009.

HORTA, M. C. et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted

fever group *Rickettsia*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71(1), p.93-97, 2004.

HORTA, M. C. et al. Experimental Infection of the Opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia bellii*, and *Rickettsia parkeri* and Evaluation of the transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, p.959-967, 2010.

KIKUCHI, Y.; FUKATSU, T. Rickettsia infection in natural leech populations. **Microbial Ecology**, v. 49 (2), p.265-271, 2005.

LABRUNA, M. B. et al. Ticks collected on birds in the state of São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, p.147-160, 2007.

LABRUNA, M. B. et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, p.2435–2457, 2011.

LUNDGREN, D. L. et al. Infectious diseases in wild animals in Utah. VI. Experimental infection of birds with *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Bacteriology**, v. 91 (3), p. 963-966, 1966.

LUZ, H. R. et al. Bird ticks in an area of the Cerrado of Minas Gerais State, southeast Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 58 (1), p.89-99, 2012.

MEDEIROS, A. P. et al. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p.926-930, 2011.

MOVILA, A. et al. Detection of tick-borne pathogens in ticks from migratory birds in the Baltic region of Russia. **Medical and veterinary entomology**. Aug 27, 2012.

NAVA, S. et al. *Rickettsia parkeri* in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p.1894-1897, 2008.

OGRZEWALSKA, M. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. **Parasitology Research**, v. 4, p.809-816, 2010.

OGRZEWALSKA, M. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the Atlantic Forest in northeastern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. **Parasitology Research**, v. 108, p.665-670, 2011.

OGRZEWALSKA, M. et al. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 139, p.1283-1300, 2012.

PAROLA, P. et al. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Veterinary Research**, v.36, p. 469-492, 2005.

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**, v.1078, p. 523-530, 2006.

PIRANDA, E. M. et al. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p. 696-701, 2008.

ROMER, Y. et al. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p.1169-1173, 2011.

SABATINI, G. S. et al. Survey of ticks (Acari: Ixodidae) and their rickettsia in an Atlantic rain forest reserve in the State of São Paulo, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v. 47, p.913-916, 2010.

SANGIONI, L. A. et al. Rickettsial infection in Cerro Largo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p.511-514, 2011.

SILVA, N. et al. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p.275-278, 2011.

SILVEIRA, I. et al. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p. 1111-1113, 2007.

SOARES, J. F. et al. Experimental infection of the tick *Amblyomma cajennense*, Cayenne tick, with *Rickettsia rickettsii*, the agent of Rocky Mountain spotted fever. **Medical and Veterinary Entomology**, v. 26 (2), p.139-151, 2012.

SPOLIDORIO, M. G. et al. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, p.521-523, 2010.

SZABÓ, M. P. J. et al. A surrogate life cycle of *Amblyomma ovale* Koch, 1844. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v.3, p. 262-264, 2012.

SZABÓ, M. P. J. et al. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. **Parasitology**, Jan 30: 1-10, 2013.

VENZAL, J. M. et al. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p.1493-1495, 2004.

WEINERT, L. A. et al. Evolution and diversity of Rickettsia bacteria. **BMC Biology**, v. 7:6, 2009.

TABELA 1. Títulos de anticorpos anti-*Rickettsia* em quatro galinhas de criação extensiva soropositivas para *R. rickettsii* e/ou *R. parkeri*.

Espécie	Amostra A	Amostra B	Amostra C	Amostra D
<i>R. rickettsii</i>	128	64	--	128
<i>R. parkeri</i>	64	--	64	64
<i>R. felis</i>	--	--	--	--
<i>R. bellii</i>	--	256	--	--
<i>R. amblyommii</i>	--	--	--	--
<i>R. rhipicephali</i>	--	--	--	--

--: soro não reagente a um título ≥ 64

3. CAPÍTULO II

Avaliação da infecção experimental por *Rickettsia parkeri* em galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*)

Evaluation of experimental infection by *Rickettsia parkeri* in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*)

Jonas Fernandes Maciel^{I*}, Joice Magali Brustolin^I, Felipe Krawczak^{II}, Marta Elena Machado Alves^I, Felipe Lamberti Pivoto^I, Jonas Moraes-Filho^{II}, Marcelo Bahia Labruna^{II}, Maristela Lovato^I, Sonia de Ávila Botton^I, Fernanda Silveira Flores Vogel^I, Luis Antonio Sangioni^I

(Artigo a ser submetido na revista científica Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 2013)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a infecção experimental por *Rickettsia parkeri* em galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) e investigar a dinâmica de anticorpos nessas aves. Para tanto, foram utilizadas 64 galinhas caipiras divididas em oito grupos, constituídos por: Grupo 1 (G1) - inoculado com $2,5 \times 10^5$ células Vero (1 ml) infectadas por *R. parkeri* via intramuscular (IM); G2 – $5,0 \times 10^5$ células Vero (2 ml) infectadas por *R. parkeri* via IM; G3 - 1 ml do inóculo via subcutânea (SC); G4 - 2 ml de inóculo via SC; G5 - 1 ml do inóculo via

^I Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5149, Camobi, Santa Maria, RS, Brasil. 97105-900. Telefone: (55) 3220 8071. E-mail: jonasfernandesmaciel@gmail.com. *Autor para correspondência.

^{II} Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, Brasil 05508-270.

intraperitoneal (IP); G6 - 2 ml de inóculo via IP, e G7 e G8 - 1 e 2 ml de meio de cultivo de células Vero via IM respectivamente (grupos controles negativos). Os soros das aves foram coletados aos 3, 7, 14 e 21 dias pós infecção (PI) e testadas por reação de imunofluorescência indireta (RIFI) para avaliar a dinâmica de anticorpos na infecção aguda e crônica. A identificação da multiplicação de *R. parkeri* nos tecidos, no mesmo período PI, foi realizada por PCR, para o gene *gltA*, em fragmentos de baço e pulmão provenientes das galinhas eutanasiadas. As aves do G4 e G3 apresentaram respectivamente as maiores médias de anticorpos obtendo os níveis mais elevados aos sete e 14 dias PI. Os grupos G2, G4 e G6 apresentaram médias de anticorpos superiores comparado ao G1, G3 e G5 respectivamente, sendo considerada a infecção dose-dependente. Não foi detectado DNA rickettsial nos tecidos avaliados. No presente trabalho foi possível demonstrar que as aves soroconverteram mediante o desafio da inoculação por *R. parkeri*, todavia não houve a identificação do agente nos tecidos analisados, bem como a presença de rickettsemia.

Palavras-chave: Reação de imunofluorescência indireta, reação em cadeia da polimerase, aves, inoculação, pós infecção, febre maculosa.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the experimental infection by *R. parkeri* in domestic chickens (*Gallus gallus domesticus*) and investigate the dynamics of antibodies in acute and chronic infection in these birds. It was used 64 chickens divided into eight groups including: Group 1 (G1) - inoculated with $2,5 \times 10^5$ Vero cells (1 ml) infected with *R. parkeri* intramuscularly (IM); G2 - $5,0 \times 10^5$ Vero cells (2 ml) infected with *R. parkeri* IM, G3 - 1 ml of inoculum subcutaneously (SC); G4 - 2 ml of inoculum SC; G5 - 1 ml of the inoculum intraperitoneally (IP); G6 - 2 ml of inoculum IP, G7 and G8 - 1 and 2 ml of culture medium VERO cells IM respectively (both were the negative control groups). Sera of chickens were

collected at 3, 7, 14 and 21 days post infection (PI) by immunofluorescence assay (IFA) in order to assess the dynamics of antibodies in acute and chronic infection. To identify the replication of *R. parkeri* in tissues, during the same period PI, PCR was performed for the *gltA* gene of spleen and lung fragments from chickens euthanized. Birds from G4 and G3 showed the highest average antibodies with the maximum levels at seven and 14 days PI. The groups G2, G4 and G6 showed higher mean antibody compared to G1, G3 and G5 respectively, being the infection considered dose-dependent. Rickettsial DNA not detected in both tissues evaluated. In this study it was possible to demonstrate that the birds seroconverted after the challenge inoculation with *R. parkeri*, however there was no replication of the agent in the tissues analyzed, nor the presence of rickettsemia.

Keywords: Indirect immunofluorescence assay, polymerase chain reaction, birds, inoculation, post infection, spotted fever.

INTRODUÇÃO

Rickettsia parkeri é uma bactéria intracelular obrigatória que pertence ao Grupo da Febre Maculosa (GFM). Desde 2004 foi reconhecida nos Estados Unidos como causadora de doença clínica em seres humanos (PADDOCK et al., 2004). Na América do Sul, apenas no Uruguai e na Argentina foi confirmada essa espécie de bactéria como causa de rickettsiose em humanos (CONTÍ-DIAZ et al., 2009; ROMER et al., 2011). No Brasil, casos suspeitos de doença rickettsial associada às escaras, possivelmente com envolvimento de *R. parkeri*, foram relatados; porém, ainda não foi realizado o isolamento da bactéria (SANGIONI, et al., 2011; SILVA et al., 2011).

Rickettsia rickettsii é considerada a espécie mais patogênica do GFM de ocorrência em vários estados brasileiros; entretanto, em muitas áreas onde a febre maculosa é endêmica, outras espécies de rickettsias também foram identificadas em carrapatos transmissores da

doença (PHILIP & CASPER, 1981). *R. parkeri* tem sido identificada em carrapatos *Amblyomma triste* em países do Mercosul como: Brasil, Uruguai e Argentina (VENZAL et al., 2004; SILVEIRA et al., 2007; NAVA et al., 2008).

Muitas pesquisas envolvendo aves e sua participação na epidemiologia das rickettsioses vem sendo desenvolvidas ao redor do mundo. Entretanto, estes estudos têm como foco principal a detecção de rickettsias do GFM, em carrapatos de vida parasitária, capturados de diversas espécies de aves na natureza, nos mais diferentes nichos ecológicos (ELFVING et al., 2010; GRAHAM et al., 2010; HILDEBRANDT et al., 2010; OGRZEWALSKA et al., 2010).

R. rickettsii é a única espécie na qual há relatos envolvendo estudos de infecção experimental em diversas espécies de aves, incluindo galinhas domésticas (LUNDGREN et al., 1966). No Brasil, foram realizados estudos de infecção experimental com *R. parkeri* em gambás (*Didelphis aurita*) (HORTA et al., 2010); no entanto, não há informação sobre esta infecção em galinhas domésticas.

Diante disso, procedeu-se a infecção experimental em galinhas domésticas com *R. parkeri*, a fim de verificar a infecção nessa espécie e avaliar a sua participação no ciclo das rickettsioses.

MATERIAIS E MÉTODOS

Inóculo bacteriano

A cepa AT24 de *R. parkeri*, originalmente isolada a partir de um carrapato *A. triste* no município de Paulicéia, São Paulo (SILVEIRA et al., 2007); foi utilizada para preparar o inóculo do agente usado neste estudo. Com o propósito de isolamento do agente, os autores realizaram a inoculação de tecidos de carrapatos infectados com *R. parkeri* em monocamadas de células Vero, mantidas em garrafas de cultivo celular e incubadas em estufa

microbiológica a 28°C, sendo realizadas três passagens em monocamadas celulares. O nível de infecção celular foi monitorado por identificação do agente, através da coloração de Gimenez nas células desprendidas de cada monocamada inoculada.

A partir da última passagem em monocamadas de células Vero infectadas, o tapete celular foi desprendido através de um *scraper* e, juntamente com o meio de cultivo (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*® - DMEM, Life Technologies Corporation, Carlsbad, Ca), foi transferido para tubos Falcon® estéreis com capacidade para 50 ml, na concentração final de $2,5 \times 10^5$ células Vero infectadas/ml.

Infecção experimental em galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*)

Foram utilizadas 64 galinhas domésticas (*Gallus gallus domesticus*) com 45 dias de idade provenientes de um criatório comercial da cidade de Carazinho, Rio Grande do Sul. As aves foram identificadas individualmente e mantidas no biotério do Laboratório Central de Diagnóstico e Patologias Aviárias (LCDPA), localizado no Hospital Veterinário Universitário (HVU) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM). As aves foram recebidas aos 21 dias de idade, onde foram alimentadas com ração isenta de antibióticos, fornecido água *ad libitum* e mantidas em ambiente em condições controladas de ventilação e temperatura até o início do experimento.

Os soros de todas as aves foram coletados e submetidos à reação de imunofluorescência indireta (RIFI) previamente à realização do experimento para verificação de anticorpos reagentes à bactéria do gênero *Rickettsia* spp., sendo caracterizadas como livres de infecção pelo patógeno.

As 64 galinhas foram divididas em oito grupos com um total de oito aves em cada grupo. Para a inoculação experimental de cada ave utilizou-se seringas e agulhas descartáveis. O inóculo, mantido na temperatura de 28°C, foi agitado constantemente em vórtex para garantir a homogeneidade da suspensão, imediatamente antes da inoculação.

O grupo 1 (G1) e o grupo 2 (G2) foram constituídos por galinhas que receberam $2,5 \times 10^5$ e $5,0 \times 10^5$ células Vero infectadas por *R. parkeri* (1 ml e 2 ml) pela via intramuscular (IM) respectivamente. As galinhas do G3 e G4 foram submetidas à inoculação com 1 ml e 2 ml do inóculo por via subcutânea (SC) respectivamente. O G5 e o G6 receberam por via intraperitoneal (IP) 1 ml e 2 ml de inóculo respectivamente. Os grupos controles, G7 e G8 receberam 1 ml e 2 ml, apenas do meio de cultivo (DMEM[®]) livre de *R. parkeri*, por via IM, respectivamente.

As aves foram monitoradas clinicamente durante o experimento, sendo avaliados principalmente os seguintes parâmetros: temperatura, grau de desidratação, frequência respiratória, apetite e prostração.

Soro sanguíneo

Amostras de sangue das aves dos oito grupos experimentais foram obtidas assepticamente por punção da veia ulnar nos dias 3, 7, 14 e 21 pós infecção (PI). Posteriormente, as amostras foram encaminhadas ao Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da UFSM e centrifugadas para obtenção do soro sanguíneo. As amostras de soro foram estocadas a -20°C até a realização dos testes sorológicos.

Amostras de tecidos

A fim de verificar a multiplicação da *R. parkeri* nos tecidos, duas aves de cada grupo experimental foram eutanasiadas nos dias 3, 7, 14 e 21 PI, por meio de deslocamento cervical, seguindo as normas preconizadas pelos comitês de bioética e bem-estar animal. Em seguida as aves foram necropsiadas para coleta de amostras de tecidos, sendo eleitos os pulmões e o baço para a pesquisa de DNA rickettsial, por serem órgãos altamente vascularizados. Um total de 128 amostras foi obtido, sendo 64 provenientes de pulmões e 64 de baços. As amostras dos tecidos foram submetidas à extração de DNA e à técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

Os soros sanguíneos obtidos das galinhas inoculadas foram submetidos à RIFI no LADOPAR, a partir de lâminas sensibilizadas com antígenos brutos de *R. parkeri* (cepa At24) conforme a descrição de HORTA et al. (2004). Os soros foram diluídos a partir de 1:64 em PBS. Em seguida 15µL dos soros diluídos foram depositados sobre cada poço das lâminas de RIFI e incubados em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. As lâminas foram lavadas com solução de lavagem (*washing buffer* - *WB*) e mantidas em cuba com a mesma solução durante 10 minutos, por duas vezes. Após a secagem, foram incubadas a 37°C por 30 minutos com imunoglobulina Y anti-galinha conjugada com isotiocianato de fluoresceína (Sigma Diagnostics, St. Luis, Mo) na diluição de 1:400. Posteriormente, as lâminas foram novamente lavadas em *WB*, adicionado o corante azul de Evans a 0,2% e mantidas em câmara escura por 10 minutos, por duas vezes. Controles positivo e negativo foram utilizados em cada lâmina. Após as lâminas estarem secas, foram cobertas com glicerina tamponada e inserida a lamínula para realizar a leitura em microscópio com luz ultravioleta (Olympus BX60, Japan) com objetiva de 40X.

As amostras de soros reagentes foram submetidas à titulação a fim de estabelecer os níveis de anticorpos produzidos em cada período PI.

Extração de DNA

Amostras de tecido esplênico e pulmonar das 64 aves inoculadas foram submetidas à extração de DNA utilizando Wizard® Genomic DNA Purification kit (Promega, Fitchburg, Wi, USA) conforme as recomendações do fabricante. As amostras de DNA foram estocadas a -20°C até a realização da técnica de PCR.

Reação em cadeia da polimerase (PCR)

As amostras de DNA extraídas foram submetidas à PCR, utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores denominados CS-78 senso (5'-

GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3') e CS-323 anti-senso (5'-GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT'-3'), que amplificam um fragmento de 401 pares de bases (pb) do gene citrato sintase (*gltA*) localizado na matriz mitocondrial, que expressa uma enzima que participa da primeira etapa do ciclo do ácido cítrico e está presente em todas as espécies do gênero *Rickettsia* spp. Caso apresentasse resultado positivo, a amostra de DNA seria submetida à outra técnica de PCR para caracterizar bactérias pertencentes ao GFM, utilizando-se os oligonucleotídeos Rr190.70 senso (5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3') e Rr190.602 anti-senso (5'-AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT-3'), que amplificam um fragmento de 530 pb do gene de uma proteína externa de membrana de 190 kDa (*ompA*) (LABRUNA et al., 2004; REGNERY et al., 1991).

As reações foram efetuadas no termociclador (T100TM Thermal Cycler, Bio-Rad), nas seguintes condições: 1 ciclo inicial a 95°C por 3 min; 40 ciclos de 15 s a 95°C, 30 s a 48°C, 30 s a 72°C; e 1 ciclo final a 72°C por 7 min. Para cada reação, controle negativo (água) e controle positivo (células Vero infectadas por *R. parkeri*) foram incluídos. Após, 10 µl dos produtos amplificados na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% previamente corado por SYBR[®] Safe DNA Gel Stain (Life Technologies Corporation, Carlsbad, Ca, USA), sob 120 volts por 30 minutos e, posteriormente visualizados em transluminador na presença de luz ultravioleta.

Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA), com comparação entre grupos pelo teste *Tukey* com significância de 95%, onde os valores da titulação foram submetidos à fórmula " $\text{Log}_{10} (X + 10)$ " no intuito de normalizar os resultados, sendo "X" a titulação de anticorpos anti-*R. parkeri*. Para isso fez-se uso do programa estatístico GraphPadPrism 5[®].

RESULTADOS

Avaliação da resposta sorológica anti-*R. parkeri* na infecção experimental de galinhas domésticas

Após a inoculação experimental das galinhas domésticas com *R. parkeri* ($2,5 \times 10^5$ e $5,0 \times 10^5$ células infectadas, 1 ml e 2 ml respectivamente) nas diferentes vias de administração, observou-se uma variação nos títulos de anticorpos tanto entre os grupos experimentais bem como entre os indivíduos dos mesmos grupos.

As médias dos títulos obtidos entre os grupos experimentais bem como a dinâmica de anticorpos estão demonstradas nas figuras 1 e 2, respectivamente.

O G1 ($2,5 \times 10^5$ células infectadas por *R. parkeri* via IM) não apresentou sororeatividade nos primeiros 3 dias PI. A soroconversão ocorreu a partir do dia 7 PI, com variação nos títulos de anticorpos de até 512 em uma das aves. Aos 14 dias PI, os títulos obtiveram queda (título máximo observado de 64), seguido de um aumento aos 21 dias PI (256). No G2 ($5,0 \times 10^5$ células infectadas por *R. parkeri* via IM), foi detectado anticorpos no dia 3 PI com título de até 512, sendo verificado títulos de até 1024 aos 7 e 14 dias PI, com diminuição nos níveis de anticorpos aos 21 dias PI (256).

O G3 ($2,5 \times 10^5$ células infectadas por *R. parkeri* via SC) apresentou produção de anticorpos a partir dos 3 dias PI com títulos baixos (64) em duas aves. Aos 7 dias PI observou-se títulos variáveis de 256 a 8192, sendo este último o maior título encontrado entre as aves. Nos 14 dias PI, verificou-se um decréscimo nos níveis de anticorpos, variando de 256 a 4096. Aos 21 dias PI, os títulos declinaram para 512. No G4 ($5,0 \times 10^5$ células infectadas por *R. parkeri* via SC) verificou-se soroconversão aos 3 dias PI (títulos de 64). No período subsequente, 7 dias PI, observou-se maiores níveis de anticorpos, obtendo-se títulos de 512 a 8192. Aos 14 dias PI os títulos de anticorpos permaneceram elevados atingindo 8192, com diminuição aos 21 dias PI (título de 1024).

O G5 ($2,5 \times 10^5$ células infectadas por *R. parkeri* via IP) obteve uma pequena variação, no dia 3 PI, com títulos de 64 a 128. Aos 7 dias PI, houve elevação nos níveis de anticorpos até o título de 1024. No período de 14 dias PI, os níveis diminuíram variando entre 128 e 256 com uma posterior soronegatividade aos 21 dias PI. O G6 ($5,0 \times 10^5$ células infectadas por *R. parkeri* via IP) apresentou reatividade sorológica em todos os períodos. No dia 3 PI, títulos de 64 a 128 foram detectados. Aos 7 e 14 dias PI verificou-se títulos de até 2048. Os títulos apresentaram diminuição aos 21 dias PI (128 a 256). As aves dos grupos G7 e G8 (1 ml e 2 ml de meio de cultivo isento de *R. parkeri* via IM, respectivamente) não apresentaram títulos de anticorpos detectáveis.

Não foram observadas alterações clínicas nas aves ao longo do experimento.

Avaliação da multiplicação da *R. parkeri* em tecidos de galinhas domésticas

Dos tecidos testados pela PCR não houve amplificação do fragmento de 401 pb para o gene *gltA* em nenhuma das amostras analisadas. Não foi realizada a PCR dos tecidos para a presença do gene *ompA*, uma vez que este gene está presente apenas em rickettsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM) (REGNERY et al., 1991).

DISCUSSÃO

Avaliação da resposta sorológica anti-*R. parkeri* na infecção experimental de galinhas domésticas

Neste experimento foi possível verificar sororreatividade de todas as aves em todos os grupos inoculados experimentalmente com *R. parkeri*. Ao analisar as diferenças entre os grupos experimentais observa-se que as médias de anticorpos durante todo o período do experimento foram mais elevadas entre os grupos infectados com uma maior quantidade de inóculo, na comparação com os grupos que receberam menor quantidade, considerando a via de administração em comum (G1 e G2: IM; G3 e G4: SC; G5 e G6: IP) (Tabela 1 e Figura 2).

LI & WALKER (1992) através de estudos *in vitro* demonstraram a teoria dose dependente da relação rickettsia-célula hospedeira pela técnica de citometria de fluxo. Cultivos celulares apresentaram uma taxa de infecção rickettsial superior quando as células foram expostas a uma maior quantidade de antígeno em comparação às demais avaliadas. Apesar das diferenças observadas quanto à resposta imune, favorecendo a relação dose-resposta entre os grupos com vias de administração em comum, observou-se significância estatística somente entre G5 e G6 no dia 21 PI (1 ml e 2 ml de inóculo respectivamente) (Figura 1d). Sendo assim, neste estudo *in vivo* constatou-se a comprovação da teoria dose-dependente, uma vez que houve um estímulo ao sistema imune mais intenso, quando desafiado a uma maior quantidade de antígeno inoculada.

Os grupos inoculados por via SC (G3 e G4) apresentaram média de anticorpos superiores aos demais (Tabela 1 e Figura 2). Esses resultados apontam para a via SC como sendo a de maior estímulo ao sistema imunológico das aves do presente experimento. O G3 apresentou valores significativos em relação ao G1 (via IM) e também ao G5 e G6 (ambos via IP) aos 21 dias PI (Figura 1d). O G4 foi o que apresentou maior superioridade nos níveis de anticorpos anti-*R. parkeri* em relação aos demais grupos, com diferença estatística significativa em relação ao G1 (via IM), G5 e G6 (ambos via IP) aos 7 dias PI (Figura 1b). No período de 14 PI houve diferença estatística do G4 quando comparado ao G1 (via IM) e G5 (via IP) (Figura 1c). Aos 21 dias PI a diferença estatística foi evidenciada com relação ao G1 e G2 (ambos via IM) e G5 e G6 (ambos via IP) (Figura 1d). VALBUENA et al. (2002) associaram o local inicial da infecção como importante fator para determinar o destino e a severidade da infecção rickettsial. Em seu ciclo natural, as rickettsias do GFM são inoculadas através da saliva de artrópodes na hipoderme e tecido subcutâneo do hospedeiro vertebrado. Além disso, as rickettsias consideradas de baixa patogenicidade, incluindo *R. parkeri*, têm como sítio de multiplicação preferencial o próprio local de inoculação do vetor e podendo

gerar lesões de escaras cutâneas. Este fato poderia justificar nossos resultados, onde as aves inoculadas pela via subcutânea demonstraram maiores títulos de anticorpos anti-*R. parkeri*, quando a inoculação foi realizada mimetizando um sítio natural de infecção.

A via de infecção rickettsial pode exercer um papel importante na resposta imunológica precoce ou tardia. VALBUENA et al. (2002) afirmaram que se a infecção seguir o caminho do endotélio linfático, levaria a uma infecção de células dendríticas, seguida de uma apresentação de antígeno mais eficiente e uma contenção da infecção através da resposta imune adaptativa mais precoce, fato que o período de 7 dias PI como um dos que apresentaram maior magnitude da resposta imunológica em algumas aves.

A queda da imunidade humoral na maioria dos grupos após os sete e/ou 14 dias PI (Figura 2) pode indicar a ausência ou inibição da replicação de *R. parkeri* nas galinhas experimentalmente infectadas. Para a manutenção dos níveis de anticorpos elevados aos 21 dias PI e também posterior a este período, há a necessidade do aumento de antígeno circulante. Este fato foi verificado por PIRANDA et al., 2008 em cães infectados experimentalmente com *Rickettsia rickettsii*, com o qual permaneceram com títulos elevados até os 180 dias PI.

O sistema de apresentação de antígeno em aves não está totalmente elucidado como em mamíferos (ZHIGUANG & KAISER, 2011), porém sabe-se que essas espécies contam com a participação de células dendríticas na participação da montagem da resposta imune, apesar de dificuldades no isolamento desses tipos celulares (CACHO et al., 2009). Em galinhas, células dendríticas já foram isoladas de tonsilas cecais, tecidos linfóides secundários e regiões linfóides difusas (HOSHI & MORI, 1973; OLAH & GLICK, 1979; BEFUS et al., 1980). Nesse estudo, a participação provável de células dendríticas foi compatível com os resultados (principalmente aos 7 dias PI), bem como a possibilidade da participação de outras células com atividade fagocítica (ZHIGUANG & KAISER, 2011). No G1 a resposta

imunológica foi mais tardia, provavelmente pelo menor período de exposição às células dendríticas.

Avaliação da multiplicação da *R. parkeri* em tecidos de galinhas domésticas

Neste estudo, não foi possível detectar a presença de *R. parkeri* nos tecidos avaliados. Este dado pode ser justificado pelo fato da bactéria inoculada, provavelmente, não ser capaz de multiplicar nos pulmões e baços de galinhas. Além disso, a quantidade de rickettsias presentes nesses órgãos poderia estar em níveis não detectáveis pela PCR como constatado em estudos relacionados por ORMSBEE et al. (1978) e KATO et al. (2013).

O modelo animal experimental deste estudo apresenta temperatura corporal ao redor de 42 °C o que pode ter resultado na limitação da multiplicação de *R. parkeri* e consequente disseminação bacteriana tecidual. LI & WALKER (1992), comprovaram que *Rickettsia conorii* teria alterada a sua habilidade de infectar células hospedeiras mediante aumento de temperatura em cultivo celular. Esse achado poderá ser um indício de que a infecção em aves por *R. parkeri* seja afetada negativamente pelo aumento de temperatura corporal, havendo a necessidade de comprovação experimental em outros estudos.

CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos nesse experimento, pode-se observar que as galinhas desafiadas pela infecção por *R. parkeri* soroconverteram, em altos títulos de anticorpos anti-*R. parkeri*, aos sete e 14 dias PI. A resposta imunológica de maior magnitude foi dose-dependente, bem como quando o inoculo foi administrado via SC, mimetizando a via de transmissão natural da bactéria por artrópodes. Não foi possível detectar a rickettsemia e a multiplicação das bactérias em baço e pulmões das aves. Novos estudos deverão ser conduzidos a fim de verificar o papel das galinhas domésticas como reservatório da *R. parkeri*.

COMITÊ DE ÉTICA E BIOSSEGURANÇA

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob protocolo número: 009/2011.

REFERÊNCIAS

BEFUS, A. D. et al. Gut-associated lymphoid tissue in the chicken. I. Morphology, ontogeny and some functional characteristics of Peyer's patches. **The Journal of Immunology**, v. 125, p.2626-2632, 1980.

CACHO, E. D. et al. Avian follicular and interdigitating dendritic cells: Isolation and morphologic, phenotypic, and functional analyses. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 129, p.66-75, 2009.

CONTI-DÍAZ, I. A. et al. Serological evidence of *Rickettsia parkeri* as etiological agent of rickettsiosis in Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p.337-339, 2009.

ELFVING, K. et al. Dissemination of spotted fever *Rickettsia* agents in Europe by migrating birds. **Plos One**, v. 5 (1), e8572, 2010.

GRAHAM, R. I. et al. Detection of spotted fever group *Rickettsia* spp. from bird ticks in the U.K. **Medical and Veterinary Entomology**, v.24, p. 340-343, 2010.

HILDEBRANDT, A. et al. The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v.1, p.105-107, 2010.

HORTA, M. C. et al. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in humans and domestic animals in a Brazilian spotted fever-endemic area in the state of São Paulo, Brazil: serologic evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted

fever group *Rickettsia*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.71, p. 93-97, 2004.

HORTA, M. C. et al. Experimental Infection of the Opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia felis*, *Rickettsia belli*, and *Rickettsia parkeri* and Evaluation of the transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense* and *Amblyomma dubitatum*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 10, p.959-967, 2010.

HOSHI, H.; MORI, T. Identification of the bursa-dependent and thymus-dependent areas in the tonsilla caecalis of chickens. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 111, p.309-322, 1973.

KATO, C. Y. et al. Assessment of Real-Time PCR Assay for Detection of *Rickettsia* spp. and *Rickettsia rickettsii* in Banked Clinical Samples. **Journal of Clinical Microbiology**, v.51, p. 314-317, 2013.

LABRUNA, M. B. et al. *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**, v.42, p. 90-98, 2004.

LI, H.; WALKER, D. H. Characterization of rickettsial attachment to host cells by flow cytometry. **Infection and Immunity**, v.60, p. 2030-2035, 1992.

LUNDGREN, D. L. et al. Infectious diseases in wild animals in Utah. VI. Experimental infection of birds with *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Bacteriology**, v.91 (3), p. 963-966, 1966.

NAVA, S. et al. *Rickettsia parkeri* in Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 14, p.1894-1897, 2008.

OGRZEWALSKA, M. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. **Parasitology Research**, v. 4, p.809-816, 2010.

OLAH, I.; GLICK, B. Structure of the germinal centers in the chicken caecal tonsil: light and electron microscopic and autoradiographic studies. **Poultry Science**, v. 58, p.195-210, 1979.

ORMSBEE, R. et al. Limits of Rickettsial Infectivity. **Infection and Immunity**, v.19, p.239-245, 1978.

PADDOCK, C. D. et al. *Rickettsia parkeri*: A Newly Recognized Cause of Spotted Fever Rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p.805-811, 2004.

PHILIP, R. N.; CASPER, E. A. Serotypes of spotted fever group rickettsiae isolated from *Dermacentor andersoni* (Stiles) ticks in western Montana. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, p.230-238, 1981.

PIRANDA, E. M. et al. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.103, p. 696-701, 2008.

REGNERY, R. L. et al. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v.173, p. 1576-1589, 1991.

ROMER, Y. et al. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p.1169-1173, 2011.

SANGIONI, L. A. et al. Rickettsial infection in Cerro Largo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, p.511-514, 2011.

SILVA, N. et al. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p.275-278, 2011.

SILVEIRA, I. et al. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 13, p. 1111-1113, 2007.

VALBUENA, G. et al. Mechanisms of immunity against rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. **Microbes Infection**, v. 4, p. 625-633, 2002.

VENZAL, J. M. et al. *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma triste* from Uruguay. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, p.1493-1495, 2004.

ZHIGUANG, W.; KAISER, P. Antigen presenting cells in a non-mammalian model system, the chicken. **Immunobiology**, v. 216, p.1177-1183, 2011.

TABELA 1. Níveis médios e desvio padrão de anticorpos anti-*R. parkeri* de cada grupo experimental em diferentes períodos Pós Infecção (PI), pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI).

Grupo	3 dias PI	7 dias PI	14 dias PI	21 dias PI
G1	00 ±00,00	160 ±193,06	48 ±32,00	192 ±90,51
G2	88 ±177,55	309,33 ±391,22	448 ±424,53	256 ±0,00
G3	16 ±29,62	1834,67 ±3207,33	1408 ±1828,21	512 ±0,00
G4	24 ±33,12	3072 ±3020,37	3328 ±3278,40	1024 ±0,00
G5	56 ±41,02	362,67 ±513,07	160 ±122,55	00 ±00,00
G6	40 ±47,62	448 ±807,52	704 ±920,06	192 ±90,51
G7	00 ±00,00	00 ±00,00	00 ±00,00	00 ±00,00
G8	00 ±00,00	00 ±00,00	00 ±00,00	00 ±00,00

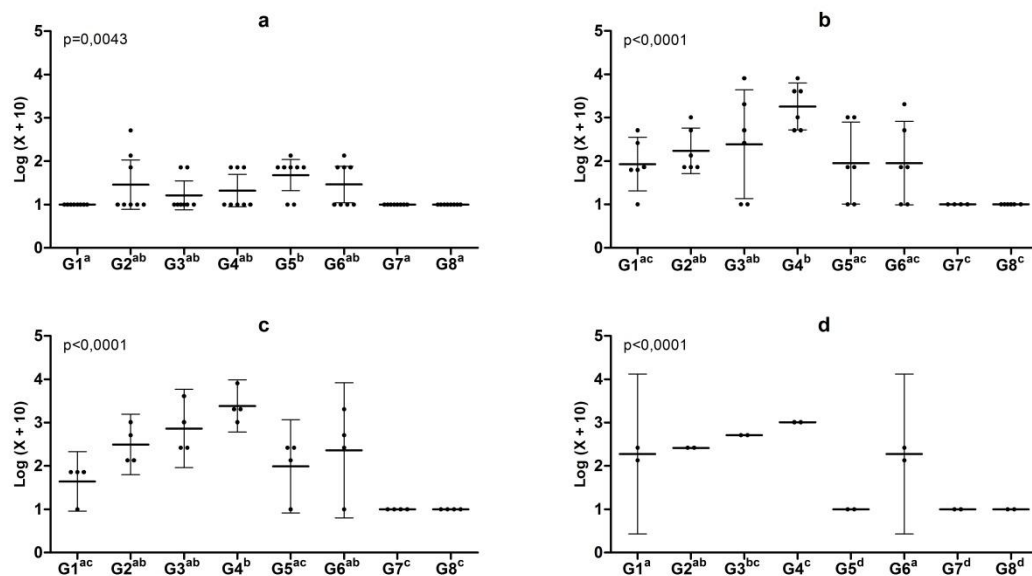


Figura 1. Análise comparativa dos níveis de Anticorpos anti-*R. parkeri* obtidas na infecção experimental de *R. parkeri* de galinhas de criação extensiva, nos dias 3, 7, 14 e 21 PI. Letras distintas entre grupos representa diferença estatística ($P \leq 0,05$). (a) 3 dias PI, (b) 7 dias PI, (c) 14 dias PI e (d) 21 dias PI. Dados normalizados através da fórmula $\text{Log}(X + 10)$, onde X é o valor da titulação obtida para cada indivíduo.

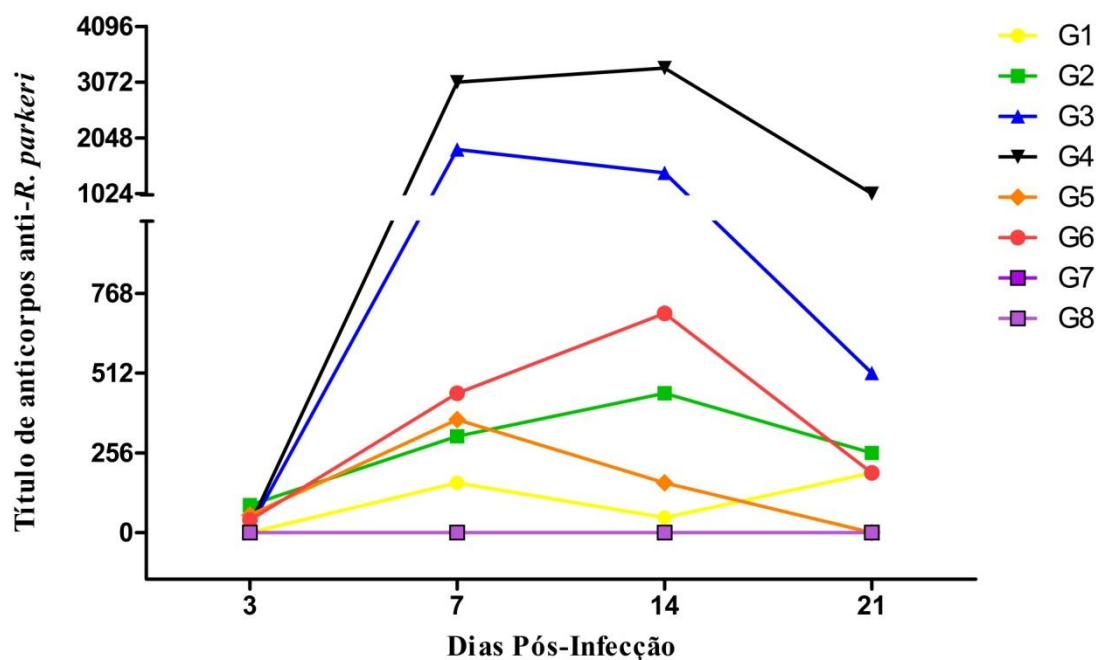


Figura 2. Dinâmica de anticorpos anti-*R. parkeri* em galinhas domésticas de acordo com as médias de títulos detectados entre as aves dos oito grupos experimentais. G1: $2,5 \times 10^5$ células infectadas por *R. parkeri* (1 ml de inóculo) via intramuscular (IM). G2: $5,0 \times 10^5$ células infectadas por *R. parkeri* (2 ml de inóculo) via IM. G3: 1 ml de inóculo via subcutânea (SC). G4: 2ml de inóculo via SC. G5: 1ml de inóculo via intraperitoneal (IP). G6: 2 ml de inóculo via IP. G7 e G8: 1ml e 2 ml de meio via IM respectivamente (grupos controle negativos).

4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os estudos referentes à participação das aves no ciclo das rickettsioses em quase todos os continentes estão, hoje, voltados principalmente para a detecção de carrapatos infectados com rickettsias do GFM e o consequente risco da sua dispersão propiciado pelo seu parasitismo, levando a disseminação de rickettsias de áreas consideradas endêmicas para áreas indenes (CLIFFORD et al., 1969; REEVES et al., 2006; SANTOS SILVA et al., 2006; GRAHAM, et al., 2010; HILDEBRANDT et al., 2010; OGRZEWALSKA et al., 2010; 2011; 2012). Dessa forma, as pesquisas com o intuito de elucidar o potencial das aves como reservatório e/ou hospedeiro amplificador de rickettsias e não somente como carreador de vetores potencialmente infectados apresentam poucos registros em literatura (LUDGREN et al., 1966).

O presente trabalho demonstrou em duas etapas a correlação da infecção natural e experimental em galinhas domésticas. Observou-se que na natureza, o desafio de galinhas de criação extensiva por bactérias do gênero *Rickettsia*, pesquisadas em região endêmica do estado do Rio Grande do Sul, seja pelo parasitismo por carrapatos ou por outra forma de infecção (KIKUCHI & FUKATSU, 2005; WEINERT et al., 2009), pode estar associado a uma carga bacteriana mais baixa, como observado neste estudo, com uma consequente resposta sorológica menos pronunciada em comparação à infecção experimental, na qual verificou-se altos títulos de anticorpos em algumas aves.

Apesar de uma ocorrência baixa de infecção por rickettsias, a verificação de quatro galinhas de criação extensiva soropositivas para *Rickettsia rickettsii*, *R. parkeri* e/ou *R. bellii* de um total de 300 aves pesquisadas na natureza (1,33%), sugere que essas aves não apenas

têm a capacidade de albergar carrapatos infectados, já que estão entre os hospedeiros preferenciais de formas imaturas de *Amblyomma* spp. (ARZUA et al., 2003; OGRZEWALSKA et al., 2010; 2011; 2012; LUZ et al., 2012), mas também de serem infectadas, o que pode comprovar a competência vetorial desses carrapatos em transmitir o agente a essas aves; fato este que deve ainda ser melhor pesquisado.

Ao relacionar a infecção natural de galinhas de criação extensiva pesquisadas na região endêmica de Cerro Largo-RS e a infecção experimental com *Rickettsia parkeri*, observou-se claramente o fator dose dependente. Aves expostas ao parasitismo na natureza recebem uma dose inoculante de seus vetores menor que em infecções induzidas, explicando a ocorrência de títulos baixos de até 256 na primeira pesquisa e títulos mais elevados de até 8192 na pesquisa posterior.

Um fator contribuinte à baixa ocorrência de galinhas soropositivas e com títulos baixos na população pesquisada no primeiro estudo pode ser a temperatura elevada das aves, que gira em torno de 42°C. Nesse caso, em decorrência dessa temperatura mais elevada, a infecção celular e multiplicação de bactérias do gênero *Rickettsia* se tornaria prejudicada, diminuindo a exposição do sistema imune desses animais a esses microorganismos (LI & WALKER, 1992). Esse fato também pôde ser verificado na infecção experimental, onde observou-se uma queda da imunidade humoral já aos 21 dias PI, pela diminuição da multiplicação bacteriana nas aves, com uma menor quantidade de antígeno circulante, não proporcionando a manutenção de títulos elevados.

O presente trabalho proporcionou avaliar a dinâmica de anticorpos em resposta à infecção experimental por *R. parkeri*. Os períodos que acarretaram uma maior resposta do sistema imune das aves foram aos sete e 14 dias PI, onde os grupos que receberam maior quantidade de inóculo foram os que manifestaram maior resposta humoral concordando com estudos *in vitro* realizados por LI & WALKER (1992). A via SC apresentou maior magnitude

na resposta imune, por ser o sítio de multiplicação preferencial de *R. parkeri* e a mais próxima da infecção natural (VALBUENA et al., 2002).

Existe a necessidade da realização de outros estudos com a finalidade de elucidar a participação das galinhas domésticas na epidemiologia das rickettsioses.

5. CONCLUSÕES

Com a realização deste trabalho podemos concluir que:

1. Os resultados sugerem que as galinhas de criação extensiva não participaram como reservatório e/ou hospedeiro amplificador na epidemiologia da febre maculosa na área endêmica pesquisada.
2. As galinhas desafiadas experimentalmente por *R. parkeri* soroconverteram, apresentando títulos elevados principalmente aos sete e 14 dias PI.
3. A via SC é a que suscita uma resposta imunológica de maior magnitude, mimetizando a via de transmissão natural da bactéria por artrópodes.
4. A resposta dose-dependente também ocorreu na infecção experimental destas aves, verificada pela sorologia.
5. Não foi possível detectar a replicação das bactérias nos tecidos pesquisados por PCR, bem como a rickettsemia.
6. Outros estudos devem ser conduzidos para elucidar a contribuição das aves na epidemiologia da febre maculosa.

6. REFERÊNCIAS

ARZUA, M. et al. *Amblyomma aureolatum* and *Ixodes auritulus* (Acari: Ixodidae) on birds in the southern Brazil, with notes on their ecology. **Experimental and Applied Acarology**, v. 31, p.283-296, 2003.

AZAD, A. F.; BEARD, C. B. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. **Emerging Infectious Diseases**, v.4, p. 179-186, 1998.

BALASHOV, Y. S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) - Vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous publications of the Entomological Societ of America**, n. 8, p. 160-376, 1972.

BARROS-BATTESTI, D. M. et al. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região Neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan. 2006, p. 1-2.

BEATI, L.; RAOULT, D. Mediterranean Spotted Fever and other Spotted Fever Group Rickettsiae. In: PALMER, S. R. et al. **Zoonoses**, Oxford: University Press, 1998, p. 217-240.

BOZEMAN, F. M. et al. Ecology of Rocky Mountain spotted fever. II. Natural infection of wild mammals and birds in Virginia and Maryland. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.16, p. 48-59, 1967.

BURGDORFER, W. et al. Ecology of Rocky Mountain Spotted Fever in Western Montana – I. Isolation of *Rickettsia rickettsii* from wild mammals. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 76, p. 293-301, 1962.

CHAPMAN, A. S. et al. Diagnosis and management of tickborne rickettsial diseases: Rocky Mountain spotted fever, ehrlichioses, and anaplasmosis—United States: a practical guide for physicians and other health-care and public health professionals. **MMWR Recommendations and Reports**, v.55, p. 1-27, 2006.

CLIFFORD, C. M. et al. Tests on Ticks from Wild Birds Collected in the Eastern United States for Rickettsiae and Viruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 18, p.1057-1061, 1969.

CONTI-DÍAZ, I. A. et al. Serological evidence of *Rickettsia parkeri* as etiological agent of rickettsiosis in Uruguay. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 51, p.337-339, 2009.

DANTAS-TORRES, F. Rocky Mountain Spotted Fever. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 7, p.724-732, 2007.

EREMEEVA, M. Differentiation among spotted fever group rickettsiae species by analysis of restriction fragment length polymorphism of PCR-amplified DNA. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, p.803-810, 1994.

ESTRADA, D. A. et al. Detecção de riquetsias em carrapatos do gênero *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) coletados em parque urbano do município de Campinas, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 39, p. 68-71, 2006.

EVANS, D. E. et al. A Review of the Ticks (Acari, Ixodida) of Brasil, Their Hosts and Geographic Distribution - 1. The State of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p.453-470, 2000.

FOURNIER, P. E. et al. Evidence of *Rickettsia helvetica* infection in humans, eastern France. **Emerging Infection diseases**, v.6, p. 289-392, 2000.

GALVÃO, M. A. M.; RIBEIRO, J. G. L. Febre Maculosa. In: PEDROSO, E. R. P. et al. **Clínica Médica; os princípios da prática ambulatorial**. São Paulo: Atheneu, 1993, p. 1374-1380.

GRAHAM, R. I. et al. Detection of spotted fever group *Rickettsia* spp. from bird ticks in the U.K. **Medical and Veterinary Entomology**, v.24, p. 340-343, 2010.

GUEDES, E. et al. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever endemic area in the state of Minas Gerais. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.100, p. 841-845, 2005.

HILDEBRANDT, A. et al. The potential role of migratory birds in transmission cycles of *Babesia* spp., *Anaplasma phagocytophilum*, and *Rickettsia* spp. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, p. 105-107, 2010.

HORTA, M. C. et al. Isolation of *Rickettsia felis* in the Mosquito Cell Line C6/36. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p.1705-1707, 2006.

HORTA, M. C. et al. Experimental Infection of Opossums *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and Evaluation of the Transmission of the Infection to Ticks *Amblyomma cajennense*. **Vector-Borne and Zoonotic Diseases**, v. 9, p.109-117, 2009.

KIKUCHI, Y.; FUKATSU, T. *Rickettsia* infection in natural leech populations. **Microbial Ecology**, v. 49 (2), p.265-271, 2005.

LABRUNA, M. B. et al. Identificação de *Rickettsia bellii* em carrapato *Amblyomma cooperi* do município de Pedreira. In: XV CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE PARASITOLOGIA, **Anais...** São Paulo, 2001, p. 33.

LABRUNA, M. B. et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia Amblyommii* in *Amblyomma* Ticks from the State of Rondonia, Western Amazon, Brazil. **Journal of Medical Entomology**, v.41, p.1073-1081, 2004a.

LABRUNA, M. B. et al. *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**, v.42, p. 90-98, 2004b.

LABRUNA, M. B. et al. Detection of a spotted fever group *Rickettsia* in the tick *Haemaphysalis juxtakochi* in Rondonia, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.127, p.169-174, 2005.

LABRUNA, M. B. et al. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p.869-873, 2006.

LABRUNA, M. B. et al. Prevalence of *Rickettsia* infection in dogs from the urban and rural areas of Monte Negro Municipality, western Amazon, Brazil. **Vector Borne and Zoonotic Diseases**, v.7, p.249-255, 2007.

LABRUNA, M. B. et al. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. **Revista MVZ Córdoba**, v. 16, p.2435–2457, 2011.

LI, H.; WALKER, D. H. Characterization of rickettsial attachment to host cells by flow cytometry. **Infection and Immunity**, v.60, p. 2030-2035, 1992.

LUNDGREN, D. L. et al. Infectious diseases in wild animals in Utah. VI. Experimental infection of birds with *Rickettsia rickettsii*. **Journal of Bacteriology**, v.91 (3), p. 963-966, 1966.

LUZ, H. R. et al. Bird ticks in an area of the Cerrado of Minas Gerais State, southeast Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 58 (1), p.89-99, 2012.

McDADE, E. J; NEWHOUSE, V. F. Natural history of *Rickettsia rickettsii*. **Annual Review of Microbiology**, n. 40, p. 287–309, 1986.

MEDEIROS, A. P. et al. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p.926-930, 2011.

NASCIMENTO, E. M. et al. Detection of Brazilian spotted fever infection by polymerase chain reaction in a patient from the state of São Paulo. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p.277-279, 2005.

OGRZEWALSKA, M. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the eastern Amazon, northern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. **Parasitology Research**, v. 4, p.809-816, 2010.

OGRZEWALSKA, M. et al. Ticks (Acari: Ixodidae) infesting wild birds in the Atlantic Forest in northeastern Brazil, with notes on rickettsial infection in ticks. **Parasitology Research**, v. 108, p.665-670, 2011.

OGRZEWALSKA, M. et al. Epidemiology of Brazilian spotted fever in the Atlantic Forest, state of São Paulo, Brazil. **Parasitology**, v. 139, p.1283-1300, 2012.

PADDOCK, C. D. et al. *Rickettsia parkeri*: A Newly Recognized Cause of Spotted Fever Rickettsiosis in the United States. **Clinical Infectious Diseases**, v. 38, p.805-811, 2004.

PAROLA, P. et al. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. **Veterinary Research**, v.36, p. 469-492, 2005.

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

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**, v.1078, p. 523-530, 2006.

RAOULT, D. et al. A Flea-Associated Rickettsia Pathogenic for Humans. **Emerging Infectious Diseases**, v.7, p.73-81, 2001.

REEVES, W. K. et al. *Borrelia*, *Coxiella*, and *Rickettsia* in *Carios capensis* (Acari: Argasidae) from a brown pelican (*Pelecanus occidentalis*) rookery in South Carolina, USA. **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, p.321-329, 2006.

REGNERY, R. L. et al. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v.173, p. 1576-1589, 1991.

ROMER, Y. et al. *Rickettsia parkeri* Rickettsiosis, Argentina. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p.1169-1173, 2011.

SANGIONI, L. A. **Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da Febre Maculosa em humanos, cães e eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em área endêmica e não endêmica do estado de São Paulo**. 2003. 86 f. Tese (Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2003.

SANTOS-SILVA, M. M. et al. Ticks parasitizing wild birds in Portugal: detection of *Rickettsia aeschlimannii*, *R. helvetica* and *R. massiliae*. **Experimental and Applied Acarology**, v.39, p.331-338, 2006.

SILVA, N. et al. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 17, p.275-278, 2011.

SILVEIRA, I. et al. *Rickettsia parkeri* in Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.13, p. 1111-1113, 2007.

SOUZA, C. E. et al. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by *Rickettsia rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. **Veterinary Parasitology**, v.161, p.116-121, 2009.

SPOLIDORIO, M. G. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v.16, p. 521-523, 2010.

VALBUENA, G. et al. Mechanisms of immunity against rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. **Microbes Infection**, v. 4, p. 625-633, 2002.

VRANJAC, A. Varicela, difteria e febre maculosa: aspectos epidemiológicos no Estado de São Paulo. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, n. 37, n. 6, p. 817-820, 2003.

WEINERT, L. A. et al. Evolution and diversity of Rickettsia bacteria. **BMC Biology**, v. 7:6, 2009.

WOLBACH, S. B. Studies on Rocky Mountain spotted fever. **The Journal of Medical Research**. v.41, p. 1-218, 1919.