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

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE *Rickettsia parkeri* (CEPA MATA ATLÂNTICA) EM *Cavia porcellus*

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Joice Magali Brustolin

Santa Maria, RS, Brasil

2014

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE *Rickettsia parkeri* (CEPA MATA ATLÂNTICA) EM *Cavia porcellus*

por

Joice Magali Brustolin

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 Antônio Sangioni, Dr.

Santa Maria, RS, Brasil

2014

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

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE *Rickettsia parkeri* (CEPA MATA ATLÂNTICA) EM *Cavia porcellus*

elaborada por
Joice Magali Brustolin

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

Comissão Examinadora:

_____
Luis Antônio Sangioni, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

_____
Fernanda S. F. Vogel, Dr. (UFSM)

_____
Maurício Horta, Dr. (UNIVASF)

Santa Maria, 28 de fevereiro de 2014.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e pelas graças que me foram dadas.

Agradeço e dedico este trabalho aos meus pais Milton e Inês que me possibilitaram alcançar este objetivo, me dando apoio emocional, financeiro e espiritual em todos os momentos.

Ao meu noivo Renan que me dedicou carinho e atenção durante esta jornada, não deixando que a distância fosse um empecilho para o nosso amor. Sua paciência nos meus momentos difíceis foi essencial para esta caminhada.

Minhas irmãs Josiane e Juliane as quais são minhas inspirações de dedicação, sabedoria, charme e paciência. Ao meu cunhado Rodrigo pelo carinho e questionamentos intrigantes. Amo vocês!!!

Ao meu orientador, professor Luis Antônio Sangioni, por dividir comigo seus conhecimentos. Muito obrigada pela oportunidade, atenção e paciência.

A professora Maristela Lovato, minha co-orientadora, pelos muitos ensinamentos e sonhos compartilhados. Sua dedicação para com as pessoas é de uma delicadeza impar. Obrigada por me ajudar a alcançar este sonho.

A professora Sônia A. Botton, minha co-orientadora, pelo incentivo e ensinamentos durante esta jornada. Obrigada de coração.

A professora Fernanda Vogel e a equipe do LADOPAR (Maiara, Giovana, Gustavo, Marta, Patricia, Luiza, Carol, Augusto, João, Giovani e Ana, Nayana, Jonas) pelo aprendizado compartilhado, pela parceria e ajuda no desenvolvimento deste trabalho. Agradeço por todos os momentos compartilhados com vocês.

A equipe do LCDPA pela ajuda na execução dos projetos e pelo companheirismo. Meu agradecimento com carinho a Ana Caroline, Giovana, Paulo, Gustavo, Lauren, Raquel, Talieli, Pauline, Rafael e Lilian.

Ao professor Paulo Pacheco do Departamento de Zootecnia da UFSM pelo auxilio na estatística dos experimentos.

Ao professor Marcelo Labruna e sua equipe da USP pela oportunidade de aprender e conhecer novas realidades. Agradeço em especial ao meu amigo Felipe por ter dedicado seu tempo para me repassar seus conhecimentos.

Em especial agradeço aos meus amigos da antiga, Fernanda, Fábio, Gisele e Tassiana que foram capazes de aguentar meus lamentos por todos os percalços enfrentados até o começo desta empreitada. Vocês são muito importantes para mim.

Especial também é meu agradecimento às amigas Maria Amélia, Liane, Patrícia e Maria José por alegrarem meus dias, me incentivando e ajudando em todos os momentos. Adoro muito vocês!!!! Sem vocês a vida seria menos colorida.

“A persistência é o menor caminho do êxito”.

(Charles Chaplin)

RESUMO

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

INFECÇÃO EXPERIMENTAL DE *Rickettsia parkeri* (CEPA MATA ATLÂNTICA) EM *Cavia porcellus.*

AUTOR: JOICE MAGALI BRUSTOLIN
ORIENTADOR: LUIS ANTÔNIO SANGIONI
Santa Maria, 28 de fevereiro de 2014.

Este estudo teve como objetivos avaliar a capacidade de ninfas de *Amblyomma ovale* naturalmente infectadas com *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica) em transmiti-la para *Cavia porcellus* (cobaios) e, analisar a infecção nestes animais. Utilizou-se 26 cobaios divididos em três grupos: G1 - 10 cobaios infestados com ninfas de *A. ovale* não infectadas, G2 - 10 cobaios infestados com ninfas de *A. ovale* naturalmente infectadas com *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) e G3 - 6 cobaios não infestados. Foi fixada uma câmara de infestação de carrapatos nos animais onde foram colocadas 25 ninfas de *A. ovale* infectadas ou não, de acordo com o grupo. No primeiro estudo foi avaliado a competência vetorial de ninfas de *A. ovale* na transmissão de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) para *C. porcellus* (animais do G1 e G2). Após o período do parasitismo**,** as ninfas ingurgitadas foram coletadas e armazenadas em estufa B.O.D. Para a pesquisa de anticorpos anti-*Rickettsia* spp., coletou-se soros sanguíneos aos 7, 14, 21 e 28 dias pós infestação (DPI) sendo avaliados por meio de reação de imunofluorescência indireta (RIFI). Para a identificação da multiplicação desta riquétsia nos tecidos dos cobaios foi realizada a reação em cadeia da polimerase aos 7, 10, 14 e 28 DPI. Para verificar a competência vetorial das ninfas, analisaram-se os períodos parasitários, o percentual de ecdise, a sobrevivência transestadial e a RIFI. O período médio de parasitismo no G1 foi de 6,6 dias e, de 6 dias no G2. O percentual médio de ecdise (ninfa para adulto) foi de 95%. No G2, a sobrevivência desta riquétsia de forma transestadial foi confirmada em 100% (PCR) e 80% (teste de hemolinfa) dos adultos. Na análise sorológica, 100% dos animais do G1 foram soronegativos e 80% do G2 soropositivos. Não foi detectado o DNA riquetsial nos tecidos dos animais. No segundo estudo, avaliou-se o perfil da infecção experimental causada por esta riquétsia nos cobaios (animais do G1, G2 e G3), buscando identificar as alterações clínicas, perfil hematológico e histopatológico. As coletas sanguíneas para análises hematológicas foram realizadas nos mesmos períodos do estudo anterior e, as coletas de tecidos para análises histopatológicas, ocorreram aos 10 e 28 DPI. Na sorologia, os animais do G1 e G3 fora

negativos e, 80% dos animais do G2 positivos. Os resultados hematológicos observados foram: G1 - leucopenia aos 7 DPI, aumento de proteínas plasmáticas totais (PPT) e diminuição de plaquetas aos 7, 14 e 21 DPI; G2: leucocitose, neutrofilia e monocitose aos 7 DPI, aumento de plaquetas aos 14 DPI e diminuição de PPT aos 21 DPI. Na análise histopatológica observou-se: G1 - hemossiderose difusa esplênica aos 28 DPI (20%); G2 - hemossiderose difusa esplênica aos 10 DPI (10%), congestão difusa pulmonar aos 10 e 28 DPI (30%) e hiperplasia folicular multifocal esplênica aos 28 DPI (20%); G3 - congestão difusa pulmonar aos 10 DPI (33%). Concluiu-se que ninfas de *A. ovale* apresentaram competência vetorial na transmissão de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) para cobaios, sendo possível determinar uma infecção aguda de caráter subclínico nestes hospedeiros.

Palavras-chave: Febre Maculosa Brasileira, infecção, cobaio.

ABSTRACT

EXPERIMENTAL INFECTION OF *Rickettsia parkeri* (STRAIN ATLANTIC RAINFOREST) IN *Cavia porcellus*.

AUTOR: JOICE MAGALI BRUSTOLIN
ADVISOR PROFESSOR: LUIS ANTÔNIO SANGIONI
Santa Maria, February 28th, 2014.

This study aimed to evaluate the ability of nymphs of *Amblyomma ovale* naturally infected with *Rickettsia parkeri* (Atlantic Forrest strain) in transmitting it to *Cavia porcellus* (guinea pigs), and analyze the infection in these animals. A total of 26 guinea pigs divided into three groups were used: G1 - 10 guinea pigs infested with nymphs of uninfected *A. ovale*; G2 - 10 guinea pigs infested with nymphs of *A. ovale* naturally infected with *R. parkeri* (Atlantic Forrest strain) and G3 - 6 uninfected guinea pigs. A tick infestation chamber was fixated on the animals, where 25 nymphs of *A. ovale*, either infected or not, were placed. In the first study, the vector competence of *A. ovale* nymphs in the transmission of *R. parkeri* (Atlantic Forrest strain) for *C. porcellus* (animals of G1 and G2) was evaluated. After the period of parasitism, engorged nymphs were collected and stored in a B.O.D incubator. To assess the *anti-Rickettsia* spp antibodies, blood was collected at 7, 14, 21 and 28 days post infestation (DPI) being evaluated by indirect immunofluorescence assay (IFA). To identify the multiplication of *Rickettsia* in the tissue from guinea pigs a polymerase chain reaction was carried out at 7, 10, 14 and 28 DPI. To verify the vector competence of nymphs, parasite periods, the percentage of molting, transstadial survival and IFA were analyzed. The average period of parasitism in G1 was 6.6 days and 6 days in G2. The average percentage of molting (nymph to adult) was 95%. In G2, the survival of transstadial *Rickettsia* was confirmed in 100% (PCR) and 80% (hemolymph test) of adults. In serological analysis, 100% of G1 animals were seronegative and 80% were seropositive in G2. No riquetsial DNA was detected in the tissues of animals. In the second study, the profile of experimental infection caused by rickettsia in guinea pigs (animals from G1, G2 and G3) were analyzed, seeking to identify the clinical, histopathological and hematological profile. Blood samples for hematological analyzes were performed in the same periods of the previous study and the collection of tissue for histopathological analyzes, occurred at 10 and 28 DPI. In serology, animals from G1 and G3 were negative and 80% of the G2 positive. The observed hematological results were: G1 - leukopenia at 7 DPI, increased total plasma proteins (TPP) and decreased platelets at 7, 14 and 21 DPI, G2: leukocytosis, neutrophilia and monocytosis at 7 DPI, increased platelets at 14 DPI and decreased PPT at 21 DPI. Histopathology observed: G1 - diffuse splenic

hemosiderosis at 28 DPI (20%), G2 - diffuse splenic hemosiderosis at 10 DPI (10%), diffuse pulmonary congestion at 10 and 28 DPI (30%) and multifocal splenic follicular hyperplasia at 28 DPI (20%); G3 - diffuse pulmonary congestion at 10 DPI (33%). It was concluded that nymphs of *A. ovale* presented vector competence in the transmission of *R. parkeri* (Atlantic Forrest strain) to guinea pigs, being possible to determine an acute infection of subclinical character in these hosts.

Keywords: Brazilian Spotted Fever. Infection. Guinea pigs.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

FIGURA 1. a) Cobaio com câmara de infestação fixada na região dorsal. b) Ninfas de *A. ovale* no interior da câmara de infestação, no dia da realização da infestação experimental. c) Ninfas ingurgitadas dentro da câmara de infestação, após repasto sanguíneo. d) Escaras cutâneas no local de fixação das ninfas de *A. ovale*.....63

LISTA DE QUADROS

CAPÍTULO I

QUADRO 1. Distribuição das frequências do período parasitário das ninfas, do percentual de realização de ecdise de ninfa para adulto e da avaliação da transmissão transestadial de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica).....41

QUADRO 2. Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*R. parkeri* dos cobaios (*C. porcellus*) infestado com ninfas infectadas com *R. parkeri* (cepa Mata Altântica), nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias pós infecção (DPI), por meio de reação de imunofluorescência indireta (RIFI).....42

CAPÍTULO II

QUADRO 1. Avaliação hematológica: demonstração da média e desvio padrão dos resultados do leucograma dos cobaios de todos os grupos tratamentos nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias pós infestação (DPI).....60

QUADRO 2. Avaliação hematológica: demonstração da média e desvio padrão dos resultados do eritrograma dos cobaios de todos os grupos tratamentos nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias pós infestação (DPI).....61

QUADRO 3. Análise histopatológica de tecidos (pulmão e baço) dos cobaios de todos os grupos tratamentos, nos períodos de 7, 10, 14 e 28 dias pós infestação (DPI).....62

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO…..... 15

2. REVISÃO IBLIOGRÁFICA..... 17

2.1 Etiologia..... 17

2.2 Histórico e epidemiologia..... 18

2.3 Vetores..... 19

2.4 Hospedeiros..... 19

2.5 Transmissão..... 20

2.6 Patogenia e aspectos clínicos..... 20

2.7 Diagnóstico..... 21

2.8 Tratamento..... 22

2.9 Modelo experimental..... 22

3. CAPÍTULO I. **Competência vetorial de ninfas de *Amblyomma ovale* na transmissão de *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica) para *Cavia porcellus***..... 24

Abstract..... 25

Resumo..... 26

Introdução..... 27

Material e método..... 28

Resultados..... 32

Discussão..... 33

Conclusão..... 36

Referências..... 36

4. CAPÍTULO II. Infecção experimental de *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica) em *Cavia porcellus* 43

Abstract 44

Resumo 45

Introdução 46

Material e método 47

Resultados 50

Discussão 51

Conclusão 55

Referências 55

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS 64

6. CONCLUSÕES 66

7. REFERÊNCIAS 67

1. INTRODUÇÃO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é uma zoonose de caráter endêmico, causada por bactérias do gênero *Rickettsia* (Raoult, Parola & Paddock 2005), transmitida por artrópodes vetores ao homem e a outros vertebrados (Parola, Davoust & Raoult 2005). Esta enfermidade é considerada como reemergente no Brasil, apresentando grande impacto para a saúde pública, devido à dificuldade de diagnóstico e à letalidade em casos humanos não tratados precocemente (Greca, Langoni & Souza 2008).

As riquétsias foram diagnosticadas em todos os continentes, apresentando ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais. No Brasil, a ocorrência da bactéria em humanos foi verificada nos estados do Espírito Santo, Mato Grosso, Minas Gerais, Bahia, São Paulo, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul, entretanto, observa-se uma maior ocorrência de óbitos em humanos nos estados de Minas Gerais e São Paulo (Galvão & Ribeiro 1993, Horta 2002, Madeira 2004). O índice de letalidade pode variar entre 25 e 80% em casos não tratados, tratados tardiamente ou ainda tratados com antimicrobianos não específicos (Walker 2002).

A maioria destas bactérias é transmitida por artrópodes (carrapatos, piolhos e pulgas) aos vertebrados, os quais são considerados reservatórios (Fournier & Raoult 2009). Os mamíferos são referidos como os hospedeiros da maior parte das espécies de carrapatos (Padilha 2010).

Entre as diferentes espécies desta bactéria que causam a FMB aos humanos, a *Rickettsia rickettsii* é considerada a mais patogênica (Parola, Davoust & Raoult 2005). No Brasil, o carrapato *Amblyomma cajennense* sempre foi considerado o principal vetor deste agente (Guedes et al. 2005), sendo que outros carrapatos já foram descritos como transmissores desta bactéria. As fases de larva e ninfa destes ixodideos acidentalmente parasitam os humanos, devido à alta taxa de infestação no meio ambiente. O estágio adulto também pode realizar o parasitismo, todavia, causa um grande desconforto quando inserem seu aparelho bucal no local de fixação do carrapato, sendo consequentemente removidos do corpo do hospedeiro (Sangioni et al. 2005, Pacheco et al. 2007).

Casos humanos que ocorreram na região sul do país não tiveram registros de óbitos. Contudo, a doença manifestou sintomatologia distinta da forma clássica, ocasionadas por *R. ricketsii*, que ocorre comumente na região sudeste. Neste sentido, há evidências que o agente

etiológico causador da enfermidade no sul do Brasil possa ser outro (Madeira 2004, Calic et al. 2005, Angerami et al. 2006).

No estado de São Paulo, Spolidorio et al. (2010) demonstraram a presença de uma nova cepa causadora de riquetsiose humana, pertencente ao Grupo da Febre Maculosa (GFM), diferente das demais riquetsioses conhecidas mundialmente, sendo denominada de Febre Maculosa da Mata Atlântica. Sabatini et al. (2010) sugeriram que o carrapato *A. ovale* possa ser um importante vetor desta nova cepa (*Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica)) em regiões de Mata Atlântica.

Rehacek, Urvolgyi & Kocianova (1992) demonstraram a susceptibilidade de várias espécies de roedores a diferentes espécies de riquétsias do GFM e, nos Estados Unidos estas espécies vem sendo incriminadas como hospedeiros amplificadores de *R. rickettsii*. Porém, a participação desses animais no ciclo epidemiológico das riquetsioses no Brasil ainda não foi determinado (Padilha 2010).

A partir da descoberta desta nova cepa, tornam-se necessários estudos que venham a elucidar a epidemiologia do *A. ovale* na transmissão deste agente, visto que este artrópodo foi incriminado como principal transmissor desta nova riquétsia. Neste contexto, este trabalho visa contribuir no esclarecimento da competência vetorial de ninfas de *A. ovale,* na fase de vida parasitária, na transmissão da *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) para *Cavia porcellus*. Além disso, avaliou-se a infecção experimental em *C. porcellus* através das avaliações hematológicas, histopatológicas e manifestações clinicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Etiologia

Rickettsia spp. são bactérias (cocobacilos), pertencentes à ordem Rickettsiales e da família Rickettsiaceae (Raoult & Roux 1997). São micro-organismos intracelulares obrigatórios, Gram negativas, pleomórficas e de pequenas dimensões (0,8 a 2µm de comprimento e 0,3 a 0,5µm de diâmetro) (La Scola & Raoult 1997). A parede celular é composta por peptidoglicano e lipopolissacáridos (LPS) (McDade & Newhouse 1986), as quais podem originar reações imunitárias cruzadas entre as riquétsias do GFM (Bacellar 1996).

Entre 1984 e 2004, nove novas espécies ou subespécies de riquétsias foram isoladas ao qual foram realizadas caracterizações microbiológicas e moleculares dos agentes (Raoult & Parola 2009). Weinert et al. (2009), através da análise multigênica, sugeriram uma nova filogenia para o gênero *Rickettsia*, sendo determinado os seguintes grupos: i) grupo do tifo (GT), composto pelas espécies *R. prowazekii* e *R. typhi*; ii) grupo da febre maculosa (GFM), representado por mais de vinte espécies; iii) grupo de transição, onde estão inseridas *R. akari*, *R. felis* e *R. australis*; iv) grupo Canadensis, constituído pela espécie *R. canadensis*; v) grupo *Bellii*, representado pela espécie *R. bellii* e outros genótipos encontrados em outros vetores.

As riquétsias que causam infecções no homem nos diversos continentes compreendem 22 espécies: *R. rickettsii, R. prowazekii, R. typhi, R. conorii subsp. conorii, R. conorii subsp. israelensis, R. conorii subsp. caspia, R. conorii subsp. indica, R. sibirica subsp sibirica, R. sibirica subsp. mongolotimonae, R. heilogjiangensis, R. slovaca, R. marmionii, R. raoutii, R. africae, R. parkeri, R. australis, R. honei, R. japonica, R. massiliae, R. aeschlimannii, R. akari* e *R. felis* (Merhej & Raoult 2011).

R. parkeri foi identificada em 1939 nos Estados Unidos, sendo reconhecida como patogênica para seres humanos somente em 2004 (Paddock et al. 2004). Relatos recentes no Brasil indicam a presença de uma nova cepa de riquétsia, a qual foi denominada de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica), devido a sua similaridade filogenética com *R. parkeri*. Esta nova cepa foi isolada a partir de amostra de pele do local da picada do carrapato, de um paciente com uma doença febril exantemática em área de Mata Atlântica no município de Peruíbe, SP (Spolidorio et al. 2010).

Szabó et al. (2012) conseguiram isolar esta nova cepa em cultivo celular oriundas de carrapatos *A. ovale* coletados de cães neste mesmo município. Sabatini et al. (2010)

descreveram a presença desta nova cepa em 13% dos carrapatos *A. ovale* coletados no Parque Nacional da Serra do Mar, município de Cubatão, SP. Medeiros et al. (2011), relataram a presença desta riquétsia no estado de Santa Catarina, infectando *A. ovale* e *A. aureolatum* coletados de cães em área de Mata Atlântica.

2.2 Histórico e Epidemiologia

Os primeiros relatos de surtos de FMB no Brasil ocorreram no estado de São Paulo, no período de outubro de 1929 a setembro de 1933, onde foram registrados 88 casos da doença em seres humanos (Monteiro 1933). Atualmente esta enfermidade apresenta um grande impacto na saúde pública devido à dificuldade de diagnóstico. Este fato está relacionado a diversos agentes etiológicos que manifestam os mesmos sinais clínicos da doença, e também, à alta mortalidade em casos humanos não tratados precocemente (Greca, Langoni & Souza 2008). Este crescente aumento do número de casos da doença registrados nos indicadores epidemiológicos nacionais, pode ser parcialmente atribuído à notificação obrigatória desta riquetsiose no ano de 2001 (Labruna 2009).

Vários relatos da doença no Brasil foram registrados principalmente na região sudeste, onde foram constatados óbitos (Pinter & Labruna 2006). A incidência da enfermidade no homem está relacionada, dentre outros fatores, à disponibilidade, densidade e a distribuição geográfica do vetor no meio ambiente (Lemos et al. 1996).

Casos humanos de FMB apresentam caráter sazonal, com a grande maioria de ocorrências da doença no segundo semestre do ano, onde há um predomínio das fases de ninfa de *A. cajennense* (Labruna 2002). Sangioni (2003) constatou que na região sudeste do país, especialmente nos estados de SP e MG, apresentaram uma maior incidência de casos da riquetsiose no segundo semestre do ano. Na região sul, a doença em humanos foi registrada no Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul (Madeira 2004). Devido às diferenças epidemiológicas do ciclo das riquetsioses incluindo as condições climáticas, ambientais e a sintomatologia mais branda da doença em humanos, suspeita-se que o agente causador da infecção nesses locais seja de espécie distinta da *R. rickettsii* (Fortes 2010).

Freitas (2007) relatou que no PR, houve a ocorrência de um caso da doença em humanos, em abril de 2005, divergindo do período de ocorrência registrado na região sudeste. Além disso, ao analisar a frequência de anticorpos anti-*Rickettsia* spp. pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), em equinos e cães presentes nesta área, encontrou animais soropositivos, tanto para *R. rickettsii* como para *R. parkeri*. Sangioni et al. (2011) também descreveu a presença de anticorpos anti-*Rickettsia* spp., destas mesmas espécies, em amostras de soros de cães, equinos e humanos, analisadas pela mesma técnica, no estado do RS.

Observou ainda que, ocorreram casos clínicos em fevereiro de 2005, no mesmo período do ano identificado por Freitas (2007), corroborando com situações epidemiológicas similares do agente etiológico ocorridos no sul do país.

2.3 Vetores

Os principais transmissores de riquétsias do GFM a animais vertebrados são os carrapatos da família Ixodidae (Raoult, Parola e Paddock 2005). No Brasil, os carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. foram descritos como sendo a principal espécie transmissoras de FMB (Pinter & Labruna 2006), sendo o *A. cajennense* considerado o principal vetor que transmite a doença ao homem e animais, seguido de *A. aureolatum*, *A. ovale* e *Rhipicephalus sanguineus* (Galvão & Ribeiro 1993).

Contudo, outras espécies de *Amblyomma* foram diagnosticadas infectadas por diversas espécies de riquétsias, tais 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*, e demais carrapatos como *Rhipicephalus sanguineus*, *Haemaphysalis juxtakochi* e *Ixodes loricatus* (Labruna et al. 2011).

Os carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. possuem ciclo trioxeno, apresentam baixa especificidade parasitária de hospedeiros, principalmente nas fases imaturas (Labruna et al. 2007, Labruna et al. 2009). As larvas e ninfas deste ixodideo utilizam preferencialmente como hospedeiros para realizarem o repasto sanguíneo, pequenos roedores, marsupiais e carnívoros (Martins, Moura & Labruna 2012, Saraiva et al. 2012). Nos estágios adultos, os hospedeiros preferenciais são os carnívoros de diferentes famílias (Labruna et al. 2005), apresentando acentuado caráter antropofílico (Guglielmone et al. 2006), o que releva a importância destes vetores na transmissão da doença. Sabatini et al. (2010), identificaram o carrapato *A. ovale* como transmissor primário desta nova cepa de riquétsia para vertebrados, bem como *A. aureolatum* e *R. sanguineus* considerados como transmissores secundários.

2.4 Hospedeiros

Equinos e cães são considerados animais sentinelas para FMB, atuando também como amplificadores da população de carrapatos (Freitas et al. 2010). Sangioni et al. (2011) relataram que estes animais participaram no ciclo da riquetsiose ocasionada por *R. parkeri*, como sentinelas da doença porém, não se conhece ainda os animais reservatórios que auxiliam na manutenção (Azad & Beard 1998).

Labruna (2006) citou cinco características que devem ser consideradas em um animal vertebrado, para que seja considerado um hospedeiro amplificador da bactéria: (1) ser abundante em área endêmica para febre maculosa; (2) ser um bom hospedeiro natural do

carrapato vetor; (3) ser susceptível à infecção por *R. rickettsii*; (4) manter níveis circulantes da bactéria na corrente sanguínea (riquetsemia) suficientes para causar infecção de carrapatos que nele se alimentem; e (5) ter elevada taxa de renovação populacional.

De acordo com Pereira & Labruna (1998), as capivaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) são consideradas animais reservatórios de *Rickettsia* spp., pois possuíam a capacidade de manter o agente circulante no organismo. Horta et al. (2009) e Souza et al. (2009) descreveram as capivaras (*H. hydrochaeris*) e os gambás (*Didelphis aurita*) como hospedeiros amplificadores da espécie *R. rickettsii* para carrapatos *Amblyomma* spp. em condições experimentais, sendo caracterizados como fonte de infecção para várias espécies de carrapatos da fauna brasileira.

Na América do Norte, McDade & Newhouse (1986) e Burgdorfer (1988) constataram algumas espécies de pequenos roedores como amplificadores destas bactérias, sendo eles: *Microtus pensilvanicus*, *Pitymus pinetorum*, *Peromyscus leucopus* e *Sigmodon hispidus*. Além desses animais, o cão doméstico (*Canis familiaris*); o cachorro do mato (*Dusicyon* sp., sin. *Canis brasiliensis*); o coelho do mato (*Sylvilagus brasiliensis*, sin. *Sylvilagus minensis*); o preá (*Cavia aperea*); e a cutia (*Dasyprocta azarae*) (Moreira e Magalhães 1935) foram incluídos como reservatórios naturais.

Padilha (2010) relatou que nas riquetsioses do GFM, os pequenos mamíferos, entre eles os roedores, participaram mais ativamente na manutenção da bactéria na natureza, por serem hospedeiros primários dos vetores e por estarem em abundância na natureza.

2.5 Transmissão

Carrapatos infectados com riquétsias do GFM apresentam uma grande quantidade de bactérias em sua hemolinfa e fezes (Raoult & Parola 2009). A transmissão do patógeno riquetsial pode ocorrer no ato do repasto sanguíneo. Para que ocorra a infecção no humano, faz-se necessária uma fixação do carrapato no hospedeiro de aproximadamente 4 a 6 horas para que ocorra a multiplicação e a penetração da bactéria regurgitada pelo artrópode (Camargo-Neves et al. 2004). A transmissão também pode ocorrer por remoção errônea do artrópode fixado na pele do hospedeiro, quando há uma pressão digital excessiva causando ruptura, expondo assim o hospedeiro ao contato com os fluídos contaminados (Raoult & Parola 2009).

2.6 Patogenia e Aspectos clínicos

Nos animais vertebrados, o agente etiológico multiplica-se nas células endoteliais (Greene & Breitschwerdt 2006). A bactéria em contato com a membrana da célula parasitada causa alterações nas proteínas externas de membrana (Weller et al. 1998).

A doença clínica no humano causada por *R. rickettsii* inicia de 4 a 10 dias após inoculação do agente e caracteriza-se por apresentar febre alta, mialgia, artralgia e exantema típico, geralmente associado a um quadro clínico severo, com disfunção de vários órgãos (Angerami et al. 2006), podendo haver evolução desfavorável do quadro clínico levando o paciente ao óbito. No local do parasitismo pelo artrópode pode-se observar uma lesão papular típica de "escara de inoculação". Esta lesão é geralmente constatada em infecções humanas por diferentes espécies de riquétsias do GFM, sendo extremamente rara no caso de *R. rickettsii* (Spolidorio et al. 2010).

A sintomatologia pode variar de acordo com a espécie de riquétsia envolvida e com a carga de bactéria inoculada. Observam-se lesões vasculares que se manifestam como petéquias e/ou equimoses na palma da mão e sola dos pés, que se espalham nos membros, tórax e abdômen (Barci & Nogueira 2006).

A infecção humana causada pela *R. parkeri* é descrita como sendo de sintomatologia mais branda, sem letalidade, quando comparada à infecção por *R. rickettsii*. Angerami et al. (2009) sugeriram que *R. parkeri* seja o agente de casos da doença no estado de Santa Catarina. Provavelmente, muitos casos de riquetsioses humanas causadas pela *R. parkeri* foram atribuídas a casos brandos de infecção por *R. rickettsii* (Paddock 2009).

Spolidório et al. (2010) observaram sinais de febre mediana, dores articulares e musculares e escaras cutâneas, em um caso clínico ocorrido em humano no estado de SP. O agente etiológico isolado apresentou similaridade gênica a *R. parkeri, R. africae* e *R. sibirica* sendo denominado *Rickettsia* sp. (cepa Mata Atlântica).

2.7 Diagnóstico

O diagnóstico clínico da FMB é difícil, especialmente em áreas não endêmicas de ocorrência da doença. A sorologia é o método auxiliar mais utilizado para realizar o diagnóstico principalmente em estudos epidemiológicos, embora os títulos de anticorpos apareçam somente de 7 a 10 dias após o início da doença (Fonseca & Martins 2007).

Apesar dos sintomas serem característicos e indicativos da infecção, esta doença pode ser confundida com diversas doenças febris e exantemáticas como: dengue, leptospirose, sarampo, febre tifóide, mononucleose infecciosa, febre amarela, meningococcemia e infecções por enterovírus, dentre outras (Dumler et al. 1990). Neste sentido, existe a necessidade de confirmação por meio de exames laboratoriais para a determinação do diagnóstico diferencial (Melles, Colombo & Silva 1999).

Para o diagnóstico da doença em seres humanos, o teste padrão ouro recomendado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) é a reação de imunofluorescência indireta (RIFI).

Esta técnica possui sensibilidade superior a 94% (Chen & Sexton 2008); no entanto pode ocorrer reações cruzadas entre as diversas espécies de riquétsias do GFM, não sendo possível, desta forma, a distinção entre elas.

Outros métodos sorológicos empregados para o diagnóstico das riquetsioses são: aglutinação em látex, imunoensaio enzimático, hemaglutinação indireta, microaglutinação, fixação de complemento, dentre outros (Walker 1989, Jeffrey & Silber 1996, Kostman 1996, Chen & Sexton 2008).

Técnicas de biologia molecular, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) também tem sido utilizadas para o diagnóstico. A PCR e o sequenciamento gênico apresentam alta sensibilidade e são empregados para diagnosticar e identificar as riquétsias a partir de amostras de sangue, pele e**,** inclusive, dos carrapatos. A detecção molecular de DNA riquetsial baseia-se na amplificação de um fragmento específico do gene citrato sintase (*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 (Labruna et al. 2004). A detecção das riquétsias baseia-se no reconhecimento das sequências dos diferentes genes, os quais apresentam pesos moleculares distintos (Sousa et al. 2008). A PCR fornece resultados rápidos e é a prova de eleição para um diagnóstico precoce (La Scola & Raoult 1997).

2.8 Tratamento

O sucesso do tratamento da FMB está diretamente ligado à precocidade do emprego do antimicrobiano, de forma empírica, mesmo antes da confirmação diagnóstica (Raoult, Parola e Paddock 2005). Casos fatais desta enfermidade foram associados ao atraso no diagnóstico laboratorial e emprego tardio do antimicrobiano. Se o paciente é tratado nos primeiros dias da evolução da doença, a febre geralmente regride dentro de 24 a 72 horas, após o uso do fármaco apropriado (Padilha 2010).

Os antimicrobianos de eleição são as tetraciclinas, doxiciclina e cloranfenicol (Raoult, Parola e Paddock 2005, Greene & Breitschwerdt 2006). Holman et al. (2001) justificaram a utilização da doxiciclina em pacientes com sinais e sintomas clínicos de riquetsioses, pois apresenta uma ampla margem de segurança.

2.9 Modelo experimental

Os cobaios (*Cavia porcellus*) pertecem a Classe Mammalia, Ordem Rodentia (Cooper & Schiller 1975, Storer et al. 1998) e comumente são utilizados como modelo experimental para estudar infecções por riquétsias (Weiss & Moulder 1984, Yu & Walker 2003, Piranda 2008). Além disso, estes animais são utilizados como modelo experimental para diversas

linhas de pesquisa, como infecções por agentes virais (Araújo et al. 2013), bacterianas (Mota 2008) e parasitárias (Alves et al. 2007).

Estes animais são considerados adequados para pesquisas experimentais, pois apresentam características zootécnicas ideais para mantença em laboratório (Björkman et al. 1981). Além disto, os roedores constituem um grupo ecologicamente importante, tanto do ponto de vista da abundância e diversidade de espécies na natureza, quanto por serem caracterizados como reservatórios de riquétsias do GFM (Reis et al. 2008).

Padilha (2010) relatou que pequenos roedores são sensíveis à infecção por riquétsias e desenvolvem riquetsemia suficiente para infectar os ectoparasitos durante o repasto sanguíneo, embora apenas num curto período de tempo. Rehacek, Urvolgyi & Kocianova (1992) demostraram a susceptibilidade de várias espécies de roedores a diferentes espécies de riquétsias do GFM. Moura et al. (2012) ao avaliarem a biologia do *A. ovale* através de infestações experimentais concluíram que cobaios são hospedeiros naturais para as fases imaturas deste carrapato.

3. CAPÍTULO I

Competência vetorial de ninfas de *Amblyomma ovale* na transmissão de *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica) para *Cavia porcellus* (cobaio)

Joice M. Brustolin*, Felipe S. Krawczak, Marta H. Machado, Maria A. A. Weiller, Camila L. de Souza, Marcelo B. Labruna, Fernanda S. F. Vogel, Sônia A. Botton, Maristela Lovato, Luis A. Sangioni

(Artigo a ser submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira – ISSN 1678 -5150 versão on-line / disponível em http://www.pvb.com.br/)

Competência vetorial de ninfas de *Amblyomma ovale* na transmissão de *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica) para *Cavia porcellus*

Joice M. Brustolin[2*], Felipe S. Krawczak[3], Marta H. Machado[2], Maria A. A. Weiller[2], Camila L. de Souza[2], Marcelo B. Labruna[3], Fernanda S. F. Vogel[2], Sônia A. Botton[2], Maristela Lovato[2], Luis A. Sangioni[2]

ABSTRACT - Brustolin J.M., Krawczak F., Machado M.H., Weiller M.A.A., Souza L.S., Labruna M.B., Vogel F.S.F., Botton S.A., Lovato M. & Sangioni L.A. 2014. [**Vector competence of *Amblyomma ovale* nymphs in transmitting *Rickettsia parkeri* (strain atlantic rainforest) to *Cavia porcellus*.**] Competência vetorial de ninfas de *Amblyomma ovale* na transmissão de *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica) para *Cavia porcellus. Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00*. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5149, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil. 97105-900. Telefone: (55) 3220 8071. E-mail: joicebrustolin@yahoo.com.br

The aim of this study was to verify the vector competence of *Amblyomma ovale* nymphs naturally infected with *Rickettsia parkeri* (strain Atlantic rainforest) to transmit this agent to guinea pigs (*Cavia porcellus*). In addition, the capacity of multiplication of *R. parkeri* (strain Atlantic rainforest) in tissues of infected animals was also evaluated. A total of 20 guinea pigs seronegative to *Rickettsia spp.*, previously tested by indirect immunofluorescence assay (IFA) were divided into two groups. G1: 10 guinea pigs infested with 25 nymphs of uninfected *A. ovale* (negative control), and G2: 10 guinea pigs infected with 25 nymphs of *A. ovale* infected with *R. parkeri* (strain Atlantic rainforest). In order to determine the average period of parasitism, the engorged ticks were collected from the infestation chamber on each animal. Subsequently, these mites were stored in a refrigerated BOD incubator at 25 °C and

---

[1] Recebido em .....
Aceito para publicação em .....
[2] Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5149, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: lasangioni@gmail.com.
[3] Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, 05508-270, Brasil.

RH >95%, to quantify the percentage of the occurrence of transestadial ecdysis transmission by hemolymph and polymerase chain reaction (PCR) testing. To assess the dynamics of infection antibody, guinea pig blood serum sera was collected at 7, 14, 21 and 28 days after infestation (IP) and tested by IFAT, to identify the multiplication of *A. parkeri* (strain Atlantic rainforest) in tissues, PCR was performed using fragments from spleen, lung, brain, and liver collected from guinea pigs euthanized on 7, 10, 14 and 28 days PI. The average period of parasitism was 6,6 days in the G1 and 6 days in G2. The percentage of molt nymph to adult was 95%. The transestadial transmission was absent in G1 and observed in 100% of ticks in G2. In serological analysis it was found that 100% (10/10) of the guinea pigs were seronegative G1 and 80% (8/10) of the animals in G2 were seropositive. In this group, 40% (4/10) and 40% (4/10) of the guinea pigs seroconverted at 14 and 21 days PI, respectively. In this study it was not possible to detect riquetsial DNA in tissues of animals evaluated in both groups. This study proved the vector competence of *R. parkeri* (strain Atlantic rainforest) transmission by *A. ovale* nymphs to *C. porcellus*. Other studies should be conducted in order to clarify the involvement of these rodents as reservoirs of bacteria from the Brazilian Spotted Fever group.

INDEX TERMS: *Amblyomma ovale*, guinea pigs, rickettsial, Brazilian Spotted Fever, olymerase chain reaction.

RESUMO - O objetivo deste estudo foi verificar a competência vetorial de ninfas de *Amblyomma ovale* naturalmente infectadas com *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica) em transmitir este agente para cobaios (*Cavia porcellus*). Adicionalmente, foi avaliada a capacidade de multiplicação de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) nos tecidos dos animais infectados. Utilizou-se 20 cobaios soronegativos para *Rickettsia* spp., previamente testados pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI) divididos em dois grupos: G1: 10 cobaios infestados com 25 ninfas de *A. ovale* não infectadas (controle negativo); e G2: 10 cobaios infestados com 25 ninfas de *A. ovale* infectados com *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica). A fim de verificar o período médio de parasitismo, os ixodideos ingurgitados foram coletados da câmara de infestação de cada animal. Posteriormente, estes ácaros foram armazenados em estufa incubadora refrigerada tipo B.O.D. a 25°C e UR> 95%, para quantificar o percentual de ecdise e a ocorrência de transmissão transestadial, por meio dos testes de hemolinfa e reação em cadeia da polimerase (PCR). Para avaliar a dinâmica de anticorpos na infecção, os soros sanguíneos dos cobaios foram coletados aos 7, 14, 21 e 28 dias pós infestação (PI) e testados

por meio da RIFI, Para identificar a multiplicação de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) nos tecidos, foi realizada a PCR a partir de fragmentos de baço, pulmão, cérebro e fígado colhidos dos cobaios eutanasiados nos períodos de 7, 10, 14 e 28 dias PI. O período médio de parasitismo foi de 6,6 dias no G1 e de 6 dias no G2. O percentual de ecdise de ninfa para adulto foi de 95%. A transmissão transestadial foi ausente no G1 e constatada em 100% dos carrapatos no G2. Na análise sorológica verificou-se que 100% (10/10) dos cobaios do G1 foram soronegativos e 80% (8/10) dos animais no G2 foram sororreagentes. Neste grupo, 40% (4/10) e 40% (4/10) dos cobaios soroconverteram aos 14 e 21 dias PI, respectivamente. Neste estudo não foi possível detectar o DNA riquetsial nos tecidos dos animais avaliados de ambos os grupos. Nesta pesquisa, comprovou-se a competência vetorial das ninfas de *A. ovale* na transmissão de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) para *C. porcellus.* Demais estudos devem ser conduzidos com o intuito de esclarecer a participação destes roedores como reservatórios de bactérias do grupo da Febre Maculosa Brasileira.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Ambyomma ovale*, cobaios, riquétsias, Febre Maculosa Brasileira, Reação em cadeia de polimerase.

INTRODUÇÃO

A Febre Maculosa Brasileira (FMB) é considerada uma das mais importantes doenças zoonóticas produzidas por riquétsias do Grupo da Febre Maculosa (GFM) (Horta et al. 2004). As espécies do gênero *Rickettsia* spp. são cosmopolitas e causam agravos à saúde humana e animal, sendo o principal agente etiológico a *Rickettsia rickettsii* (Paddock et al. 2002).

As bactérias do GFM podem acometer os seres humanos na forma de surtos endêmicos ou epidêmicos, esporádicos e sazonais (Parola & Raoult 2001). Os micro-organismos são mantidos na natureza por artrópodes vetores e por vertebrados amplificadores e/ou reservatórios. No Brasil foram identificadas e isoladas as seguintes espécies: *R. rickettsii*, *R. parkeri*, *R. belli*, *R. amblyommii*, *R. rhipicephali* e *R. felis*, provenientes de carrapatos e pulgas de diferentes regiões geográficas (Horta et al. 2004, Labruna et al. 2004, Sangioni et al. 2005, Silveira et al. 2007, Pacheco et al. 2011).

R. parkeri foi identificada em 1939 nos Estados Unidos, sendo reconhecida como patogênica para seres humanos somente em 2004 (Paddock et al. 2004). Esta riquétsia foi confirmada como agente etiológico da doença em humanos, nos Estados Unidos e no Uruguai (Paddock et al. 2004, Pacheco et al. 2011). A enfermidade caracteriza-se por apresentar uma

sintomatologia mais branda, sem letalidade, quando comparada à infecção ocasionada por *R. rickettsii*. Angerami et al. (2009) e Sangioni et al. (2011) registraram a circulação de *R. parkeri* em humanos no estado de Santa Catarina e em animais e humanos no noroeste do Rio Grande do Sul, respectivamente.

Spolidorio et al. (2010), relataram a presença de uma nova cepa de riquétsia em humanos no estado de SP. Esta bactéria demonstrou similaridade filogenética com *R. parkeri*, sendo denominada de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica).

Na região sudeste do Brasil, os carrapatos do gênero *Amblyomma cajennense* são os principais vetores que transmitem a FMB aos hospedeiros (Galvão & Ribeiro 1993), sendo que eventualmente estes ixodideos podem parasitar de forma acidental os seres humanos. Entretanto, outras espécies deste gênero, tais como: *A. aureolatum, A. brasiliense, A. cooperi* e *A. ovale* também foram incluídos como potenciais vetores da FMB para humanos (Labruna et al. 2004).

O carrapato *A. ovale* pertence à família Ixodidae, subfamília Amblyomminae, apresentando ciclo de vida trioxeno (Labruna 2009). Estudos epidemiológicos realizados no estado de SP, sugerem que *A. ovale* seja o principal vetor de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica), relacionados na transmissibilidade da doença para seres humanos (Szabó et al. 2012). Todavia, no litoral sul do Brasil foram identificados *A. ovale, A. aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* infectados por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) (Medeiros et al. 2011).

Os cobaios (*Cavia porcellus*) são empregados como modelos experimentais em pesquisas com riquétsias (Weiss & Moulder 1984, Yu & Walker 2003, Piranda 2008), sendo considerados animais adequados para a utilização em pesquisas científicas, por apresentarem características biológicas e zootécnicas ideais que facilitam a sua manipulação, manutenção em biotérios, além de serem susceptíveis à infecção (Björkman et al. 1981). Moura et al. (2012) ao avaliarem a biologia do carrapato *A. ovale,* por meio de infestações experimentais, concluíram que estes cobaios são hospedeiros naturais para as fases imaturas deste ácaro.

Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a competência vetorial de ninfas de *A. ovale* naturalmente infectadas com *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) na transmissão deste agente para cobaios. Adicionalmente, buscou-se verificar a multiplicação de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) nos tecidos dos animais.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de carrapatos

Ninfas de carrapatos *A. ovale* coletadas de cães no município de Peruíbe, SP, naturalmente infectadas com *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica), bem como exemplares deste ácaro não infectados, foram cedidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade de São Paulo (USP) para a realização deste experimento. A infecção dos ixodideos foi confirmada pela realização dos testes de hemolinfa, reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento de DNA, de acordo com Krawczak (2012). Estas colônias de carrapatos foram mantidas em estufa incubadora refrigerada tipo demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a 25°C e Umidade Relativa (UR) >95%, no Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), até o momento da infestação dos cobaios.

Modelo experimental

Foram utilizados 20 cobaios (*C. porcellus*), com idade entre um e dois anos, com peso médio de 700 gramas, provenientes de um biotério comercial de Santa Maria – RS. Os animais foram randomicamente distribuídos em dois grupos: G1: 10 cobaios infestados com ninfas de *A. ovale* não infectadas (controle negativo); e G2: 10 cobaios infestados com ninfas de *A. ovale* infectadas com *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica).

Os animais foram mantidos em caixas individuais no Biotério do Núcleo de Pesquisa em Animais Silvestres (NEPAS) em condições de isolamento. Ração para cobaios e água era fornecida *ad libitum* aos animais. As caixas de vivência eram higienizadas e inspecionadas duas vezes ao dia, durante todo o experimento.

Realizou-se previamente à infecção experimental, a pesquisa de anticorpos anti- *R. parkeri* pela reação de imunofluorescência indireta (RIFI), conforme a técnica descrita por Horta et al. (2007), sendo selecionado os animais soronegativos.

Infestação experimental com ninfas em cobaios

Cada cobaio recebeu uma câmara de infestação de carrapatos, em área tricotomizada na região dorsal. As câmaras foram afixadas com cola para tecidos (DunDun®) e procedeu-se a colocação de fitas dupla face nas caixas de vivência dos animais a fim de evitar a fuga das ninfas para o ambiente. Em cada câmara, foram colocadas 25 ninfas de *A. ovale* por animal, de acordo com o grupo. Os carrapatos foram mantidos nos cobaios até o momento de desprendimento total. Os ácaros ingurgitados foram coletados diariamente, sendo armazenados em tubos de ensaio devidamente identificados, fechados com algodão hidrófilo e levados para a estufa B.O.D a 25°C e UR >95%.

Transmissão transestadial

Para verificar se houve a transmissão da *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) de forma transestadial pelos ixodideos realizou-se os testes de hemolinfa e PCR em 10 ninfas recuperadas pós ecdise (adultos) de cada grupo.

Teste de hemolinfa

Procedeu-se a lavagem dos adultos em álcool 70° com posterior enxágue em água Milli-Q. Seccionou-se a porção distal de uma das patas do carrapato com uma lâmina estéril, para a obtenção de 25-50µL de hemolinfa. Este material foi aplicado em lâmina de vidro limpa e desengordurada, sendo seco em temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente, estas lâminas foram coradas pelo método de Giménez (1964) e examinadas ao microscópio óptico, num aumento de 1200X.

Extração de DNA total dos carrapatos adultos para a realização de PCR

A extração de DNA total dos adultos de ambos os grupos foi realizada a partir do tecido macerado oriundo de uma das metades de cada carrapato. O protocolo de extração de DNA total foi baseado no descrito por Sangioni et al. (2005).

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Após a infestação experimental das ninfas nos cobaios, procedeu-se a colheita de amostras de sangue dos animais, através de punção cardíaca, com anestesia geral prévia, empregando-se uma associação de ketamina 10% (2,2mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (12mg/kg), por via intra-muscular, Também foi administrado o analgésico morfina (2-5mg/kg) pela via subcutânea, no período pós colheita, afim de minimizar a dor do procedimento.

As coletas de sangue foram realizadas nos dias 7, 14, 21 e 28 pós-infestação (PI). Para a obtenção do soro sanguíneo, foi realizada a centrifugação das amostras, com retração do coágulo, sendo posteriormente armazenados a -20°C até o momento da realização do teste.

A pesquisa de anticorpos por RIFI foi realizada em lâminas previamente sensibilizadas com os antígenos de *R. parkeri* (cepa At 24) (Silveira et al. 2007), cedidas pelo laboratório de Doenças Parasitárias da USP. O soro teste foi diluído (1:64) em solução fosfatada e tamponada (PBS) e a seguir depositada sobre a lâmina. Após incubação em estufa (37ºC/30 minutos), a lâmina foi lavada com solução de lavagem (PBS acrescida de Triton 100X), ficando em repouso em temperatura ambiente por 2-4 horas para a secagem. A cada lâmina foi adicionado o conjugado específico – anti-imunoglobulina G (IgG) de *C. porcellus* marcado com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA®) – na diluição de 1:900. Em seguida foi realizada uma nova incubação, adicionando-se o corante azul de Evans (0,2%), seguida de

nova lavagem com solução de lavagem e secagem por 2-4 horas, sob temperatura ambiente e em câmara escura.

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico invertido (Olympus BX60, Japan) e consideraram-se as amostras positivas aquelas que reagiram na diluição de 1:64, conforme estabelecido por Horta et al. (2007). Em todas as RIFI foram utilizados controles positivos e negativos. As amostras de soros reagentes foram submetidas à titulação a fim de estabelecer os níveis de anticorpos produzidos em cada período PI.

Amostras de tecidos

Para a verificação da replicação da bactéria nos tecidos, procedeu-se a eutanásia dos cobaios dos dois grupos em diferentes dias PI, sendo realizada em um animal de cada grupo aos 7, 10, 14 e os demais aos 28 dias PI. Os animais foram eutanasiados com a utilização de agentes anestésicos injetáveis via intraperitoneal. Posteriormente realizou-se a necropsia para proceder à colheita dos órgãos (pulmão, baço, fígado e cérebro) para a pesquisa de DNA riquetsial. Os fragmentos dos órgãos foram macerados e acondicionados em tubos tipo *Eppendorf* (2,0ml), congelados em *freezer* a -20°C e após submetidos à extração de DNA total.

Extração de DNA dos tecidos e de cultura pura de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica)

As amostras dos tecidos dos cobaios selecionados foram submetidas à extração de DNA total utilizando *Wizard® Genomic DNA Purification kit* (Promega, Fitchburg, Wi, USA), conforme as recomendações do fabricante. O DNA total extraído foi estocado em *freezer* a -20°C até a realização da técnica de PCR.

Para avaliar o limiar de detecção do PCR, foi realizada a extração de DNA total de cultura pura de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) utilizando-se do mesmo *kit* citado anteriormente. Posteriormente foi verificada as concentrações deste DNA extraído por espectrofotometria (NanoDrop 1000, Thermo Scientific®), sendo então realizadas diluições seriada em água ultra pura (grade de PCR) em até 1000 vezes. As amostras foram submetidas à reação de PCR. O DNA total extraído de cada amostra de tecido coletado também foi quantificado e verificado sua pureza para posterior realização da PCR.

Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

Para a pesquisa de DNA riquetsial, 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,

expressando uma enzima que participa da primeira etapa do ciclo do ácido cítrico e está presente em todas as espécies do gênero *Rickettsia* spp. (Labruna et al. 2004, Regnery, Spruill & Plikaytis 1991).

As PCRs foram efetuadas em termociclador (T100TM *Thermal Cycler, Bio-Rad*) segundo técnica descrita por Labruna et al. 2004 e posteriormente adaptada por Maciel (2013). Utilizou-se controle positivo obtido através de células Vero infectadas com *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) e, controles negativos (água ultra pura) para cada reação.

Os produtos amplificados das reações de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 1% corados por SYBR® *Safe DNA Gel Stain* (*Life Technologies Corporation, Carlsbad, Ca*), em cuba horizontal, sob voltagem de 120 Volts por 40 minutos. Posteriormente, realizou-se a leitura dos produtos sob luz ultravioleta os quais foram fotodocumentados.

Comitê de ética e biossegurança

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o número 072/2013.

RESULTADOS

Avaliação do período parasitário de ninfas e transmissão de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) da fase de ninfa para adulto de *A. ovale*

Observou-se que a média do período parasitário das ninfas sobre os cobaios foi de 6,6 dias para o G1 e 6 dias para o G2. O número de ninfas ingurgitadas recuperadas variou de 20 a 25 por cobaio e o percentual de ecdise de ninfa para adulto foi aproximadamente de 95% (Quadro 1).

Nos testes de hemolinfa, verificou-se que 100% (10/10) de ácaros foram negativos no G1. Todavia 80% (8/10) das ninfas foram positivas no G2, sendo que 20% (2/10) dos ixodideos deste grupo foram classificados como inconclusivos por esta técnica. Na PCR de todos os carrapatos do G1 não houve amplificação de produtos do gene *gltA*. Entretanto, no G2 constatou-se 100% (10/10) de amplificação do gene citrato sintase (*gltA*).

Avaliação da resposta sorológica anti-*R parkeri* na infecção experimental de *C. porcellus*

Nas análises sorológicas dos cobaios do G1 constatou-se que 100% (10/10) dos animais não apresentaram anticorpos anti-*R parkeri*. No G2, verificou-se que 80% (8/10) dos animais soroconverteram, sendo que 40% (4/10) e 40% (4/10) dos animais apresentaram soropositividade aos dias 14 e 21 PI respectivamente. Dois animais não soroconverteram

resultando em 20% (2/10) de animais soronegativos. Observou-se uma diferença nos títulos de anticorpos entre os indivíduos do G2 com títulos que variaram entre 128 a 2048 (Quadro 2).

Avaliação do limiar de detecção de DNA de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) pela PCR

A concentração de DNA total obtida pela extração da cultura pura de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) resultou em 81,5ng/µL. A técnica de PCR convencional utilizada neste estudo foi capaz de detectar DNA desta riquétsia em uma diluição de até 8,15ng/µL (10^{-1}).

Avaliação da multiplicação da *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) nos tecidos de cobaios

Os produtos de extração tecidual que foram submetidas à espectrofotometria, demonstraram uma concentração de DNA superior a 120ng/µL e uma relação de absorbância superior a 1,8nm.

Pela análise da PCR, utilizando-se os oligonucleotídeos específicos para o gene *gltA*, não foi possível detectar a amplificação de DNA de *Rickettsia* spp. nos tecidos (baço, fígado, pulmão e cérebro) dos animais de ambos os grupos, nos diferentes dias PI (7, 10, 14 e 28 dias).

DISCUSSÃO

Carrapatos da espécie *A. ovale* foram identificados por Sabatini et al. (2010) como transmissores primários de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) para vertebrados. Normalmente os ixodideos de *A. ovale* nas fases imaturas (larvas e ninfas) realizam o repasto sanguíneo em pequenos roedores (Saraiva et al. 2012).

Neste estudo, optou-se pela utilização de ninfas de *A. ovale*, por apresentarem uma menor especificidade parasitária em relação aos hospedeiros. Além disso, o emprego das ninfas apresenta como vantagens uma melhor visualização e fácil manipulação das mesmas nas câmaras de infestação, quando comparadas às larvas. Adicionalmente, as ninfas promovem uma fixação menos dolorosa e por mais tempo no hospedeiro, quando comparadas aos adultos. Na transmissão das riquétsias do GFM é necessário que o ixodideo permaneça fixado por aproximadamente 4 a 20 horas no hospedeiro (Comer 1991). Sangioni (2003) destacou que casos humanos de FMB no sudeste brasileiro, apresentaram caráter sazonal, sendo detectada a maior ocorrência da doença no segundo semestre do ano, culminando com o período de parasitismo de ninfas.

O período médio parasitário das ninfas, a taxa de ecdise de ninfa para adulto e o percentual de transmissão transestadial, evidenciados neste estudo, concordaram com os

resultados obtidos em coelhos por Krawczak (2012), com uma média de 6,43 dias de parasitismo de ninfas de *A. ovale* e 100% de taxa de ecdise e de transmissão transestadial. Resultados similares também foram comprovados em infestação experimental de cobaios com *A. aureolatum* infectado por *R. rickettsii* durante 4 gerações consecutivas (Labruna et al. 2011).

Dumler & Walker (2005) constataram a importância dos carrapatos do gênero *Amblyomma* sp. como reservatórios de *R. rickettsi* na natureza. Os autores comprovaram a capacidade do ixodideo na transmissão da bactéria pelas vias transovariana e transestadial, possibilitando a sobrevivência do agente nas sucessivas gerações e favorecendo a disseminação do micro-organismo para outros hospedeiros susceptíveis.

Krawczak (2012) demostrou que *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) apresentou uma taxa de 100% de transmissão transovariana em *A. ovale*, verificando entretanto, um efeito deletério da bactéria sobre as fêmeas infectadas. Este fato poderia explicar as ocorrências relativamente baixas de *A. ovale* naturalmente infectados na natureza (Barbieri 2012, Szabó et al. 2012). Desta forma, em áreas endêmicas as populações de *A. ovale* podem ser ineficientes na manutenção desta riquétsia, sendo necessária a participação de hospedeiros amplificadores da bactéria (Krawczak 2012).

O teste de hemolinfa revelou que 80% (8/10) das ninfas ingurgitadas do G2 permaneceram infectadas por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica). Entretanto, 20% (2/10) foram considerados como inconclusivos. Sangioni (2003) ressaltou que carrapatos considerados negativos ou inconclusivos no teste de hemolinfa devem passar por teste confirmatório.

Neste sentido, a PCR pode ser considerada um teste de maior sensibilidade e especificidade para detecção de DNA riquetsial nos ixodideos (Freitas 2007), corroborando com nossos resultados, onde obtivemos 100% (10/10) dos carrapatos adultos do G2 positivos para *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) pela PCR.

A RIFI é considerada o teste padrão para o diagnóstico sorológico da doença, tanto em animais como em humanos (Galvão et al. 2005). Calic (2004) ressaltou que algumas espécies de riquétsias compartilham antígenos de superfície podendo ocasionar reações cruzadas entre as bactérias. Neste estudo, *R. parkeri* (cepa At 24) foi empregado como antígeno na RIFI, uma vez que ambas as cepas de *R. parkeri* podem compartilhar sítios antigênicos. Este fato ocorre devido à composição de suas paredes celulares por peptidoglicano e lipopolissacarídeo (LPS), os quais são capazes de originar reações imunológicas cruzadas entre as riquétsias do GFM (Bacellar 1996).

Os resultados encontrados nas RIFI, evidenciaram a capacidade das ninfas de *A. ovale* transmitirem *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) para *C. porcellus.* Este fato pode ser constatado na soroconversão de 80% (8/10) dos animais infestados com ninfas infectadas (G2) (Quadro 1). Krawczak (2012) também comprovou que ninfas de *A. ovale* são altamente eficientes na transmissão de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) para coelhos (*Oryctolagus cunicullus*). Nieri (2012) relatou que *A. triste* foi competente na transmissão de *R. parkeri* **(**cepa At 24) em todas as suas fases parasitárias para coelhos (*O. cunicullus*).

Szabó et al. (2012) ao analisarem vertebrados de uma reserva de Mata Atlântica no município de Peruíbe, SP, evidenciaram grande carga parasitária de ninfas de *A. ovale* infestando pequenos mamíferos. Ainda, constataram que roedores *Euryoryzomys russatus* apresentaram soroprevalência de anticorpos contra *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) com títulos elevados o que sugere o papel deste animal como hospedeiro amplificador para o agente da FMB.

Nesta pesquisa, 20% (2/10) dos animais do G2 foram soronegativos aos 7 e 10 dias PI. Este achado concorda com Fonseca & Martins (2007) que descreveram que os títulos diagnósticos de anticorpos iniciaram somente após 7 a 10 dias da doença. No entanto, estes dois animais foram eutanasiados para coleta de tecidos, coincidindo no período anterior à soroconversão. A soroconversão de *C. porcellus* iniciou a partir do 14º PI no G2 ocorrendo em 40% (4/10) dos animais avaliados (Quadro 1). Barci & Nogueira (2006) descreveram que a detecção de anticorpos anti-riquetsiais, em geral, torna-se possível somente após a segunda semana do início da doença. Em nosso trabalho outros 40% (4/10) dos cobaios do G2 apresentaram a soropositividade aos 21 dias PI.

Li & Walker (1992) através de estudos *in vitro* demonstraram a teoria dose dependente da relação riquétsia-célula hospedeira. Sugere-se que a resposta imunológica encontrada aos 21 dias PI, bem como a variação nos títulos de anticorpos encontrados neste experimento, possa ser decorrente de uma baixa dose infectante. No entanto, não foi possível determinar a dose infectante por se tratar de uma infecção natural por vetores.

Maciel (2013) demonstrou essa mesma relação dose dependente em sua pesquisa com *R. parkeri* (cepa At 24) em galinhas domésticas. Contudo, Goddard (2003) verificou, que o carrapato *A. americanum* infectado com *R. parkeri* foi capaz de transmitir baixos níveis da bactéria para *C. porcellus* infestados experimentalmente.

La Scola e Raoult (1997) citaram a amplificação de DNA riquetsial como sendo um dos ensaios mais eficazes para o diagnóstico das riquetsioses em casos agudos, pois estes são testes de detecção direta do agente. Neste estudo, não foi possível evidenciar a presença do

DNA de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) no pulmão, baço, fígado e cérebro dos cobaios infectados. Valbuena et al. (2002) relataram que *R. parkeri* multiplica-se preferencialmente na pele dos hospedeiros, produzindo lesões dermatológicas em detrimento a lesões de órgãos internos.

La Scola e Raoult (1997) referiram que *R. parkeri* causa infecção nas células endoteliais dos animais, proporcionando uma concentração muito baixa nos tecidos, o que pode dificultar sua detecção por análise molecular. Desta forma, a quantidade de DNA presente nos órgãos dos cobaios poderia ser inferior a 8,15ng/µL, não sendo detectável pela PCR empregada neste estudo.

Milagres (2010) relatou resultados semelhantes, ao analisar amostras de DNA riquetsial em tecidos de roedores obtendo resultados negativos na PCR utilizando *primers* específicos para amplificação do gene da citrato sintase (*gltA*). Maciel (2013) ao empregar a técnica de PCR para avaliar a infecção experimental de *R. parkeri* (cepa At 24) no baço e pulmão de galinhas domésticas não observou amplificação do fragmento do *gltA*.

CONCLUSÃO

Com base nos resultados sorológicos obtidos, conclui-se que ninfas de *A. ovale* possuem competência vetorial na transmissão de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) para cobaios (*C. porcellus*). Constatou-se a transmissão transestadial de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) entre as fases de ninfa para adulto.

Não foi detectada a presença de DNA riquetsial nos tecidos avaliados (baço, fígado, pulmão e cérebro). Demais pesquisas devem ser conduzidas com o intuito de esclarecer a participação dos vetores e demais hospedeiros como reservatórios/ amplificadores desta nova cepa na natureza.

REFERÊNCIAS

Angerami R.N., Silva A.M.R, Nascimento E.M.M, Colombo S., Wada M.Y., Santos F.C.P., Mancini D.M., De Oliveira R.C., Katz G., Martins E.C. & Da Silva L.J. 2009. Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 15(2):207-208.

Bacellar F.C. 1996. *Rickettsias* isoladas e Portugal- contribuição para identificação e classificação das estirpes. Tese de Doutorado, Universidade de Évora, Évora.

Barbieri ARM. 2012. Aspectos epidemiológicos da febre maculosa da Mata Atlântica em um foco endêmico no município de Blumenau, Santa Catarina. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 91f.

Barci A.G. & Nogueira A.H.C. 2006. Febre Maculosa Brasileira. Disponível em: http://www.infobibos.com/artigos/febremaculosa/febremaculosa.html

Björkman N., Dantzer V., Hasselager H.H. & Kjaersgaard P. 1981. Perfusion in vivo of the porcine placenta. Fixation for EM. Placenta 2:287-302.

Calic S. B. 2004. Sorologia das Riquetsioses. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 13(1):185-187.

Comer M.K. 1991. Rocky montain spotted fever. Veterinary Clinics of North America Small Animal Practice 21(1):27-44.

Dumler J. S. & Walker D. H. 2005. Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and persisting virulence. The New England Journal of Medicine 353:551-553.

Fonseca L.M. & Martins A.V. 2007. Febre maculosa: revisão de literatura – Artigo revisão. Saúde & ambiente em revista 2(1):01-20.

Freitas M.O. 2007. Detecção de Rickettsias do Grupo Febre Maculosa em cães e equinos em São José dos Pinhais, PR. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 79 f.

Galvão M.A.M. & Ribeiro J.G.L. 1993. Febre Maculosa. p.1374-1380. In: Pedroso E.R.P., Rocha M.O.C., Silva O.A. (Ed.) Clínica Médica; os princípios da prática ambulatorial. ed. Atheneu, São Paulo.

Galvão M.A.M., Silva L.J., Nascimento E.M.M., Calic S.B., Sousa R. & Bacellar F. 2005. Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. Revista de Saúde Pública 39(5):1-6.

Gimémez D.F. 1964. Staining Rickettsiae in yolk-sac cultures. Stain Technology 39:135-140.

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

Horta M.C., Labruna M.B., Sangioni L.A., Vianna M.C, Gennari S.M., Galvão M.A., Mafra C.L., Vidotto O., Schumaker T.T. & Walker D.H. 2004. 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: serological evidence for infection by *Rickettsia rickettsii* and another spotted fever group rickettsia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 71:93-97.

Horta M.C., Labruna M.B., Pinter A., Linardi P.M. & Schumaker T.T.S. 2007. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 102(7):793-801.

Krawczak F.S. 2012. Avaliação da dinâmica da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos *Amblyomma ovale* Koch, 1844 naturalmente infectados. Dissertação de Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 88f.

La Scola B. & Raoult D. 1997. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. Journal of Clinical Microbiology 35(11):2715-2727.

Labruna M.B., Whitworth T., Horta M.C., Bouyer D.H., McBride J.W., Pinter A., Popov V., Gennari S.M. & Walker D.H. 2004. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. Journal of Clinical Microbiology 42(1):90-98.

Labruna M.B. 2009. Ecology of Rickettsia in South America. Annals of the New York Academy of Sciences 1166:156-166.

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

Li H. & Walker D.H. 1992. Characterization of rickettsial attachment to host cells by flow cytometry. Infection and Immunity 60:2030-2035.

Maciel J.F. 2013. 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 em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, RS. 62f.

Medeiros A.P., Souza A.P., Moura A.B., Lavina M.S., Bellato V., Sartor A.A., Nieri-Bastos F.A., Richtzenhain L.J. & Labruna M.B. 2011. Spotted fever group Rickettsia infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 106:926-930.

Milagres B.S. 2010. Pesquisa de *Rickettsia* em animais sinantrópicos e domésticos em seus ectoparasitas em duas áreas de baixa endemicidade para febre maculosa brasileira da região leste de Minas Gerais, de 2005 - 2007. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, BA.

Moura M.M., Martins T.F., Sabatini S. & Labruna M.B. 2012. Biologia do carrapato *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) em laboratório. Anais 20º Simpósio Internacional de Iniciação Científica, São Paulo, SP, *on line* (Resumo).

Nieri F.A.B**.** 2012. Avaliação da Infecção por *Rickettsia* spp. em *Amblyomma triste* Koch (Acari: Ixodidae) e em algumas espécies de *Ornithonyssus* Sambon (Acari: Macronyssidae). Tese de

Doutorado em Medicina Veterinária, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 66p.

Pacheco R.C., Moraes-Filho J., Marcili A., Richtzenhain L.J., Szabó M.P.J., Catroxo M.H.B., Bouyer D.H. & Labruna M.B. 2011. *Rickettsia monteiroi* sp. nov., infecting the tick *Amblyomma incisum* in Brazil. Applied and Environmental Microbiology 77:5207–5211.

Paddock C.D., Brenner O., Vaid C., Boyd D.B., Berg J.M., Joseph R.J., Zaki S.R. & Childs J.E. 2002. Short Report: Concurrent rocky mountain spotted fever in dog and its owner. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 66:197-199.

Paddock C.D., Sumner J.W., Comer J.A, Zaki S.R., Goldsmith S.C., Goddard J., McLellan S.L.F., Tamminga C.L. & Ohl C.A. 2004. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 38:805-811.

Parola P. & Raoult D. 2001. Ticks and tickborne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. Clinical Infectious Disease 32(51):897-928.

Piranda E.M. 2008. Estudos biológicos de *Rhipicephalus sanguineus* e interação *Rickettsia rickettsii*, *R. sanguineus* e cães em condições laboratoriais. Tese de doutorado em Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. 74p.

Regnery R.L., Spruill C.L. & Plikaytis B.D. 1991. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. Journal of Bacteriology 173:1576-1589.

Sabatini G.S., Pinter A.; Nieri-Bastos F.A., Marcili A. & Labruna M.B. 2010. 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 47(5): 913-916.

Sangioni L.A. 2003. Pesquisa de Infecção por riquettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães e equídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo. Tese de Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 86p.

Sangioni L.A., Horta M.C., Vianna M.C.B., Gennari S.M., Soares R.S., Galvão M.A.M., Schumaker T.T.S., Ferreira F., Vidotto O. & Labruna M.B. 2005. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. Emerging Infectious Diseases 11:265-270.

Sangioni L.A., Vogel F.F.S., Cadore G.C., Hilger R.B., Tonim R., Pacheco R.C., Ogrzewalska M. & Labruna M.B. 2011. Rickettsial infection in Cerro Largo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 63(2):511-514.

Saraiva D.G., Fournier G.F.S.R., Martins T.F., Leal K.P.G., Vieira F.N., Câmara E.M.V.C., Costa C.G., Onofrio V.C., Battesti D.M.B., Guglielmone A.A. & Labruna M.B. 2012. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. Experimental & Applied Acarology 58(2):159-166.

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

Szabó M.P.J., Martins T.F., Nieri-Bastos F.A, Spolidorio, M.G. & Labruna M.B. 2012. A surrogate life cycle of *Amblyomma ovale* Koch, 1844. Ticks and Tick-Borne Diseases 3(4):262-264.

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

Szabó M.P.J., Martins T.F., Nieri-Bastos F.A, Spolidorio, M.G. & Labruna M.B. 2012. A surrogate life cycle of *Amblyomma ovale* Koch, 1844. Ticks and Tick-Borne Diseases 3:262-264.

Weiss E. & Moulder J.W. 1984. The Rickettsias and Clamydias, p.687–739. In: Kreig N.R. and. Holt J.G (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.

Yu X.J. & Walker D.H. 2003. The order rickettsiales. In: Dworkin M. The Prokaryortes: an evolving electronic resource for the microbiology community, 3rd. ed. New York: Springer-Velag.

Quadro 1. Distribuição das frequências do período parasitário das ninfas, do percentual de realização de ecdise de ninfa para adulto e da avaliação da transmissão transestadial de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica)

	Animal	Média do período parasitário das ninfas (dias)	Ecdise ninfa-adulto (%)	Transmissão transestadial	
				Teste de Hemolinfa (%)	Detecção pela PCR (%)
	07	6	100	0	0
	08	7	90,4	0	0
	09	5	95	0	0
	10	5	95,6	0	0
G1[a]	11	6	100	0	0
	12	7	100	0	0
	13	6	91,6	0	0
	14	5	95,4	0	0
	15	7	92	0	0
	16	6	95,2	0	0
	Média	6,6	95,4	0	0
	17	5	91,3	100	100
	18	6	90,9	100	100
	19	5	90,4	100	100
	20	7	95,6	100	100
G2[b]	21	5	100	N/C	100
	22	6	95,4	100	100
	23	6	100	100	100
	24	7	95	N/C	100
	25	6	95,8	100	100
	26	7	95,4	100	100
	Média	6	94,9	80	100

G1[a]: grupo composto por cobaios infestados com ninfas de *A. ovale* não infectadas (controle negativo). G2[b]: grupo composto por cobaios infestados com ninfas de *A. ovale* infectados com *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica). N/C: Não conclusivo.

Quadro 2. Distribuição dos títulos de anticorpos anti-*R. parkeri* dos cobaios (*C. porcellus*) infestado com ninfas infectadas com *R. parkeri* (cepa Mata Altântica), nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias pós infecção (PI), pela Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Animal	7 dias PI	14 dias PI	21 dias PI	28 dias PI
17	N	512	128	128
18	N	*	*	*
19	N	1.024	512	128
20	N	N	256	128
21	N	128	256	128
22	N	*	*	*
23	N	N	2.048	1.024
24	N	N	2.048	1.024
25	N	256	*	*
26	N	N	512	512
Média/ DP	0	480/ 396,2	822,8/ 848,5	438,8/ 423,6

N: negativo; *: eutanásia; DP: desvio padrão.

4. CAPÍTULO II.

Infecção experimental de *Rickettsia parkeri (*cepa Mata Atlântica) em *Cavia porcellus*

Joice M. Brustolin*, Felipe S. Krawczak, Camila L. de Souza, Fábio B. Rosa, Marcelo B. Labruna, Sônia T. A. Lopes, Fernanda S. F. Vogel, Sônia A. Botton, Luis Antônio Sangioni

(Artigo submetido à revista Pesquisa Veterinária Brasileira – ISSN 1678 -5150 no dia 21 de fevereiro de 2014. Versão on-line/ disponível em http://www.pvb.com.br/)

Infecção experimental de *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica) em *Cavia porcellus*

Joice M. Brustolin[2*], Felipe S. Krawczak[4], Camila L. de Souza[3], Fábio B. Rosa[3], Marcelo B. Labruna[4], Sônia T. A. Lopes[3], Fernanda S. F. Vogel[2], Sônia A. Botton[2], Luis Antônio Sangioni[2]

ABSTRACT - Brustolin J.M., Krawczak F., Souza C.L., Rosa F.B., Labruna M.B., Lopes S.T.A., Vogel F.S.F., Botton S.A. & Sangioni L.A. 2014. [**Experimental infection of *Rickettsia parkeri* (strain Atlantic rainforest) in *Cavia porcellus***] Infecção experimental de *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica) em *Cavia porcellus Pesquisa Veterinária Brasileira 00(0):00-00*. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5149, Camobi, Santa Maria, RS, Brazil. 97105-900. Telefone: (55) 3220 8071. E-mail: joicebrustolin@yahoo.com.br

This study aimed to describe the profile of the experimental infection with *Rickettsia parkeri* (strain Atlantic rainforest) in *Cavia porcellus* (guinea pigs) infested with nymphs of naturally infected *Amblyomma ovale* by verifying the clinical and serological patterns for antibodies in anti -*R . parkeri* (strain Atlantic rainforest) as well as the hematological and histopathological changes. In this study, 26 animals were divided into three groups, G1: used 10 guinea pigs infested with uninfected *A. ovale* nymphs, G2: 10 guinea pigs infested with *A. ovale* nymphs naturally infected with *R. parkeri* (strain Atlantic rainforest), and G3: 6 uninfected guinea pigs. Blood samples were taken on days 7, 14, 21 and 28 post- infestation (PI) carrying out the indirect immunofluorescence assay (IFA) and hematological tests. For histopathological analysis, fragments of spleen and lung were harvested from guinea pigs euthanized on days 10 and 28 PI. During the experiment, the only clinical findings were the

---

[1] Recebido em .....
Aceito para publicação em .....
[2] Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5149, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brasil. *Autor para correspondência: lasangioni@gmail.com.
[3] Departamento de Pequenos Animais, Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), Av. Roraima, 1000, Prédio 44, Sala 5149, Camobi, Santa Maria, RS, 97105-900, Brasil.
[4] Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo (USP), Av. Prof. Orlando Marques de Paiva, 87, Cidade Universitária, São Paulo, SP, 05508-270, Brasil.

presence of eschar at the tick attachment site. Serology resulted in 100% seronegative guinea pigs in G1 (10/10) and G3 (6/ 6). However, in G2, 80% (8/10) of the guinea pigs were seropositive and 20% (2/10) seronegative. Hematologic results observed in G1 were: leukopenia at 7 days PI, increased total plasma proteins (TPP) and decreased platelets at 7, 14 and 21 days PI. In G2 were observed: leukocytosis, neutrophilia and monocytosis at 7 days PI, increased platelets at 14 days PI and decreased PPT at 21 days PI. Histopathology revealed that 20% (2 /10) of G1 animals showed mild diffuse hemosiderosis in the spleen at 28 days PI. In G2, 10% (1/10) of the animals showed mild diffuse hemosiderosis in the 10 days PI, 30% (3/10) showed diffuse pulmonary congestion at 10 and 28 days PI and in another 20% (2/10) follicular hyperplasia was observed mild multifocal spleen at 28 days PI. In G3, 33% (2/6) animals showed diffuse pulmonary congestion. The serological results, along with clinical, hematological and histopathological changes in guinea pigs experimentally infected by *R. parkeri* (strain Atlantic rainforest) demonstrate an acute subclinical feature infection.

INDEX TERMS: *Rickettsia parkeri* (strain Atlantic), infection, blood count, histopathological, *Cavia porcellus*.

RESUMO - Este estudo teve por objetivo descrever o perfil da infecção experimental por *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica) em *Cavia porcellus* (cobaios) infestados com ninfas de *Amblyomma ovale* naturalmente infectadas, por meio da verificação dos padrões clínicos e sorológicos na pesquisa de anticorpos anti-*R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) e pelas alterações hematológicas e histopatológicas. Neste estudo, foram utilizados 26 animais, divididos em três grupos sendo: G1: 10 cobaios infestados com ninfas de *A. ovale* não infectadas; G2: 10 cobaios infestados com ninfas de *A. ovale* naturalmente infectadas com *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica); e, G3: 6 cobaios não infestados. Coletas sanguíneas foram realizadas nos dias 7, 14, 21 e 28 pós-infestação (PI) para a realização da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) e exames hematológicos. Para a análise histopatológica, fragmentos de baço e pulmão foram colhidos dos cobaios eutanasiados nos dias 10 e 28 PI. Durante o experimento, as alterações clínicas observadas foram apenas a presença de escaras no local de fixação dos carrapatos. A sorologia resultou em 100% de animais soronegativos no G1 (10/10) e G3 (6/6). Entretanto, no G2, 80% (8/10) dos cobaios foram soropositivos e 20% (2/10) soronegativos. Os resultados hematológicos observados no G1 foram: leucopenia aos 7 dias PI, aumento de proteínas plasmáticas totais (PPT) e diminuição de plaquetas aos 7, 14 e 21 dias PI. No G2 foram observados: leucocitose, neutrofilia e monocitose aos 7 dias PI, aumento de plaquetas

aos 14 dias PI e diminuição de PPT aos 21 dias PI. Na análise histopatológica observou-se que 20% (2/10) dos animais do G1, apresentaram hemossiderose difusa leve no baço aos 28 dias PI. No G2, 10% (1/10) dos animais demonstraram hemossiderose difusa leve no aos 10 dias PI, 30% (3/10) apresentaram congestão difusa pulmonar aos 10 e 28 dias PI e em outros 20% (2/10) observou-se hiperplasia folicular multifocal leve no baço aos 28 dias PI. No G3, 33% (2/6) dos animais apresentaram congestão difusa pulmonar. Os resultados sorológicos, juntamente com as alterações clínicas, hematológicas e histopatológicas nos cobaios infectados experimentalmente por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) demonstram uma infecção aguda de característica subclínica.

TERMOS DE INDEXAÇÃO: *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica), infecção, hemograma, histopatológico, *Cavia porcellus*.

INTRODUÇÃO

A febre maculosa brasileira (FMB) é considerada uma enfermidade zoonótica de caráter endêmico, febril e agudo. É causada por bactérias do grupo da febre maculosa (GFM), pertencentes ao gênero *Rickettsia,* que possuem características de cocobacilos Gram negativos e intracelulares obrigatórios. Estes micro-organismos podem estar presentes nas células intestinais, nas glândulas salivares e nos ovários de artrópodes (Acha & Szyfres 2003, Raoult, Parola & Paddock 2005). O principal agente etiológico da FMB é *Rickettsia rickettsii*, apresentando outras espécies como causadora da doença nas Américas, incluindo *R. parkeri* e *R. felis* (Labruna 2004, Parola, Davoust & Raoult 2005).

A transmissão do agente, geralmente, ocorre por carrapatos da família Ixodidae, sendo o gênero *Amblyomma* spp. o principal vetor (Raoult, Parola & Paddock 2005). Entretanto, no Brasil, outras espécies de carrapatos foram relatadas como sendo infectados por riquétsias, dentre as quais *Amblyomma ovale* (Labruna et al. 2011). A transmissão da bactéria pelo ixodideo ocorre no momento do repasto sanguíneo, em um período de 4 a 6 horas após a fixação no hospedeiro. Além disso, pode haver a contaminação do hospedeiro pelo esmagamento do carrapato infectado (Harden 1990, Camargo-Neves et al. 2004).

No Brasil, a infestação em humanos por *A. cajennense* ocorre de maneira maciça por larvas e ninfas nos meses de abril a junho (predomínio de larvas) e de julho a novembro (predomínio de ninfas), coincidindo com os maiores registros de casos da doença (Galvão 1988, Spickett et al. 1991, Galvão et al. 2003). Sangioni (2003) ressaltou que, além da falta de

especificidade parasitária da ninfa, a sua menor dimensão, pode facilitar o tempo de fixação no hospedeiro. Todavia, o carrapato adulto realiza uma fixação mais dolorosa quando comparada as formas imaturas, diminuindo a probabilidade do ácaro fixar-se por um período superior ao de cinco horas no hospedeiro.

Durante aproximadamente 60 anos *R. parkeri* foi considerada como uma espécie não patogênica, sendo apenas documentada causando infecções em seres humanos no ano de 2004 nos Estados Unidos (Paddock et al. 2004), em 2009 no Uruguai (Conti-diaz et al. 2009) e 2011 na Argentina (Romer et al. 2011).

Uma nova cepa de riquétsia do grupo da febre maculosa foi diagnosticada no estado de SP, a qual foi denominada de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica), devido as suas similaridades filogenéticas com *R. parkeri*. Esta amostra foi isolada de um paciente que apresentou uma doença febril-exantemática, com presença de escaras de inoculação no local do parasitismo pelo artrópode. Os sinais clínicos foram observados dez dias após o paciente ser infestado por carrapatos, presentes em área de reserva de Mata Atlântica, em Barra do Una, Peruíbe (SP) (Spolidorio et al. 2010).

Rehacek, Urvolgyi & Kocianova (1992) demonstraram a susceptibilidade de várias espécies de roedores a diferentes espécies de *Rickettsia* do GFM. Estes animais constituem um grupo ecologicamente importante, tanto do ponto de vista da abundância e diversidade de espécies na natureza, quanto por serem encontrados como componentes fundamentais em quase todos os ecossistemas terrestres (Reis et al. 2008).

Cobaios (*Cavia porcellus*) pertencem a Classe Mammalia, Ordem Rodentia (Cooper & Schiller 1975, Storer et al. 1998) e são considerados modelos experimentais para diversas linhas de pesquisas, sendo inclusive empregados em pesquisas com riquétsias (Weiss & Moulder 1984, Yu & Walker 2003, Piranda 2008).

Este estudo teve como objetivo descrever o perfil da infecção experimental causada por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) em *C. porcellus* (cobaios) infestados com ninfas de *A. ovale* naturalmente infectadas.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção de carrapatos infectados e não infectados

Nesta pesquisa foram utilizadas ninfas de carrapatos *A. ovale* não infectadas e infectadas por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) cedidas pelo Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade de São Paulo (USP). As ninfas naturalmente infectadas foram

coletadas de cães no município de Peruíbe, SP. A infecção dos ixodideos foi comprovada através dos testes de hemolinfa, PCR e sequenciamento de DNA (Krawczak 2012). As colônias de carrapatos infectados e não-infectados foram mantidas em estufa incubadora refrigerada tipo demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a 25°C e Umidade Relativa (UR) >95%, no Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), até o momento da infestação dos cobaios.

Modelo experimental

Foram utilizados 26 cobaios (*C. porcellus*), com idade entre um e dois anos, com peso médio de 700 gramas, provenientes de um biotério comercial de Santa Maria – RS, constituídos em três grupos: G1: 10 cobaios infestados com ninfas de *A. ovale* não infectadas; G2: 10 cobaios infestados com ninfas de *A. ovale* infectadas com *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) e G3: 06 cobaios não infestados (controle negativo). Todos os animais foram mantidos individualmente em caixas plásticas para cobaios, no Biotério do Núcleo de Pesquisa em Animais Silvestres (NEPAS), em condições de isolamento em ambiente controlado. Os animais receberam ração para cobaios e água *ad libitum*. As caixas de vivência eram higienizadas e inspecionadas duas vezes ao dia, durante todo o experimento.

Todos os cobaios selecionados para o estudo foram soronegativos para pesquisa de anticorpos anti- *R. parkeri* por meio da reação de imunofluorescência indireta (RIFI) (Horta et al. 2007), realizada dez dias antes da infestação.

Infestação experimental com ninfas em cobaios (*C. porcellus*)

Em uma área tricotomizada na região dorsal de cada cobaio, em cada grupo, foi fixada uma câmara de infestação de carrapatos aderidas com cola especial para tecidos (DunDun®) (Figura 1a), evitando a fuga das ninfas para o ambiente. Nas caixas de vivência de cada animal, procedeu-se a colocação de fitas dupla face evitando possíveis fugas de carrapatos no caso de abertura, indevida ou acidental, das câmaras de infestação. Em cada câmara, foram colocadas 25 ninfas de *A. ovale* por animal (Figura 1b), infectadas ou não, de acordo com o grupo experimental. Os carrapatos foram mantidos nos cobaios para realizarem o repasto sanguíneo até o seu desprendimento total, sendo posteriormente coletados (Figura 1c).

Coleta de sangue

As amostras de sangue de todos os animais foram coletados no dia zero, ou seja, antes da infestação e aos dias 7, 14, 21 e 28 pós-infestação (PI). A colheita de amostras de sangue, foi realizada através de punção cardíaca, com anestesia geral prévia, via intra-muscular utilizando-se a associação de ketamina 10% (2,2mg/kg) e cloridrato de xilazina 2% (12mg/kg). Também foi administrado o analgésico morfina (2-5mg/kg) pela via sub-cutânea,

no período pós colheita, afim de minimizar a dor do procedimento, preconizado pelo comitê de ética animal, da UFSM, de acordo com Carpenter (2010). Foram obtidos 2ml de sangue de cada animal, sendo 1,5ml armazenado em tubos contendo EDTA para as análises hematológicas e 0,5ml armazenados em tubos tipo eppendorf sem EDTA, sendo centrifugados para obtenção de soro.

Reação de Imunofluorescência Indireta (RIFI)

Para a confirmação da infecção nos cobaios, empregou-se a técnica de RIFI estabelecida por Horta et al. (2007). Utilizou-se lâminas sensibilizadas com os antígenos de *R. parkeri* (cepa At 24) (Silveira et al. 2007), cedidas pelo laboratório de Doenças Parasitárias da USP. O soro teste foi diluído (1:64) em solução fosfato tamponada (PBS) e a seguir depositada sobre a lâmina contendo o antígeno das riquétsias. Após incubação em estufa (37ºC/30 minutos) a lâmina foi lavada com solução de lavagem (solução de PBS acrescida de Triton 100X), ficando em repouso até sua secagem total. A cada lâmina foi adicionado o conjugado específico – anti-imunoglobulina G (IgG) de *C. porcellus* marcado com isotiocianato de fluoresceína (SIGMA®) – na diluição de 1:900. Posteriormente, foi realizada nova incubação, com adição de corante azul de Evans (0,2%) lavagem e secagem em temperatura ambiente e em câmara escura. A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico invertido (Olympus BX60, Japan). Como resultado positivo, considerou-se as amostras que reagiram na diluição de 1:64. Em todas as RIFI foram utilizados controles positivos e negativos.

Avaliação hematológica

A avaliação hematológica foi realizada pelo Laboratório de Patologia Clínica Veterinária da UFSM. As contagens de hemácias, leucócitos totais e a quantificação da hemoglobina foram realizados em contador automático Mindray BC 2800 Vet®. Para a determinação do hematócrito utilizou-se de centrífuga de micro-hematócrito, na rotação de 19720G. O volume corpuscular médio (VCM) e a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) foram determinados por cálculos indiretos. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaço sanguíneo corado com Panótico Rápido®, utilizando microscopia de luz.

Análise dos parâmetros clínicos e avaliação da infecção

Para a análise dos parâmetros fisiológicos, realizou-se inspeção clínica diária dos animais, avaliando alterações nos seguintes parâmetros: atitude comportamental, apetite e consumo de água, aspectos das fezes e da urina, o grau de hidratação, o tempo de refil capilar, a frequência cardíaca e respiratória, o peso dos animais, a temperatura corporal e a inspeção

da coloração de mucosas. Foram comparados os resultados hematológicos dos grupos G3 e G1 com o intuito de verificar as alterações hematológicas em decorrência do parasitismo causado pelos carrapatos. Os resultados do G1 também foram comparados com o do G2, buscando avaliar o perfil da infecção causada pela *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica), neste modelo experimental.

Análise estatística

Todos os resultados hematológicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) fator único, com comparação entre grupos pelo teste *F* com grau de significância de 95%, onde os valores encontrados foram submetidos à fórmula "Log_{10} (X + 10)" visando normalizar os resultados.

Coleta de amostras de tecidos e avaliação histopatológica

Para a avaliação histopatológica, procedeu-se a eutanásia dos cobaios dos três grupos em 2 períodos, sendo: aos 10 dias PI realizada a necropsia em 2 animais de cada grupo e aos 28 dias PI, 8 animais do G1 e G2 e 4 animais do G3. Os animais foram eutanasiados com a utilização de agentes anestésicos injetáveis via intraperitoneal (Acepromazina 1%). Os órgãos selecionados para o exame histopatológico foram o baço e pulmão. Os tecidos coletados foram acondicionados em potes individuais contendo solução de formol a 10% e encaminhados ao Laboratório de Patologia Veterinária da UFSM onde foram processados por método histológico de rotina e corados pela técnica de hematoxilina-eosina (HE) e examinados sob microscopia de luz.

Comitê de ética e biossegurança

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), sob o número 072/2013.

RESULTADOS

Confirmação da infecção por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) nos cobaios por meio de RIFI

As análises sorológicas por meio da RIFI demostraram que 100% (10/10) dos animais do G1 e 100% (6/6) dos animais do G3 não apresentaram anticorpos reativos. No G2 verificou-se a soroconversão em 80% (8/10) dos cobaios, sendo que 40% (4/10) apresentaram soropositividade aos 14 dias PI e os demais aos 21 dias PI. Dois cobaios deste grupo não soroconverteram, resultando em 20% (2/10) de animais soronegativos.

Análise dos parâmetros hematológicos e clínicos da infecção por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) nos cobaios

As avaliações dos parâmetros hematológicos estão demonstrados nos Quadro 1 e 2. Na avaliação do leucograma (Quadro 1), foram observados no G1 alterações nas contagens de leucócitos, neutrófilos e monócitos aos 7 dias PI ($p<0,05$), apresentando leucopenia, sem haver outras alterações nas demais células analisadas em todo o experimento. No eritrograma (Quadro 2), foram observadas alterações aos 7, 14 e 21 dias PI ($p<0,05$), revelando um aumento das proteínas plasmáticas totais (PPT) e diminuição das plaquetas.

No leucograma do G2 (Quadro 1), observou-se alterações nas contagens de leucócitos, neutrófilos e monócitos, apresentando leucocitose, neutrofilia e monocitose, no dia 7 PI ($p<0,05$). No eritrograma (Quadro 2) verificou-se o aumento das plaquetas aos 14 dias PI e diminuição das PPT aos 21 dias PI ($p<0,05$).

Não foram observadas alterações nos parâmetros clínicos nos animais do G1 e G3. Nos animais do G2 foram verificadas somente escaras (Figura 1d) nos locais de fixação das ninfas, resultando em pequenas lesões dermatológicas após o desprendimento dos carrapatos.

Avaliação histopatológica da infecção por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) nos cobaios

Os resultados histopatológicos estão demonstrados no Quadro 3. Foi observado que 20% (2/10) dos animais do G1 apresentaram hemossiderose difusa leve no baço aos 28 dias PI. No G2 observou-se que 10% (1/10) dos animais apresentaram hemossiderose difusa leve no baço aos 10 dias PI; 30% (3/10) dos cobaios demonstraram congestão difusa nos pulmões aos 10 e 28 dias PI; e, 20% (2/10) dos animais apresentaram hiperplasia folicular multifocal leve no baço aos 28 dias PI. No G3 foram observados que em 33% (2/6) dos animais houve a presença de congestão difusa nos pulmões aos 10 dias PI.

DISCUSSÃO

O diagnóstico da FMB em humanos é considerado um desafio, pois esta enfermidade apresenta uma sintomatologia inespecífica, além da possibilidade de ocorrência de infecções subclínicas (Galvão et al. 2005, Scorpio et al. 2008). O teste padrão para o diagnóstico sorológico da doença é a RIFI, tanto em animais quanto em humanos (Galvão et al. 2005).

A soroconversão demonstrada nesta pesquisa em 80% (8/10) dos animais do G2 evidenciou a sensibilidade deste modelo experimental frente ao agente. Desta forma foi possível demonstrar a transmissibilidade de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) pelo vetor (*A. ovale*). Krawczak (2012) também observou que *A. ovale* nas fases parasitárias e de vida livre

é altamente eficiente na transmissão desta nova cepa de riquétsia para coelhos (*Oryctolagus cunicullus*).

Kelly et al. (1992), após inoculação experimental de *Rickettsia conorii* em cães, não observaram alterações clínicas ou laboratoriais nos animais. No entanto, detectaram soroconversão e riquetsemia por até 10 dias PI. Breitschwerdt et al. (1988) inocularam *Rickettsia montana* em cães e verificaram que todos os animais permaneceram clinicamente saudáveis. Em outra pesquisa, Sexton et al. (1994) também observaram que humanos infectados com *R. australis* não apresentaram sinais clínicos e riquetsemia, mesmo havendo soroconversão. As buscas por características específicas nas alterações clínicas nas infecções determinadas pelos diferentes tipos de riquétsias torna-se um dado relevante para o entendimento da FMB.

Nas avaliações das variações hematológicas ocorridas nas infecções provocadas por riquétsias, o hemograma é considerado um dos exames mais requisitados, uma vez que é um teste laboratorial prático e econômico, sendo, portanto, de grande utilidade na rotina clínica (Lopes, Biondo & Santos 2007).

As alterações hematológicas como trombocitopenia, leucocitose, hipoalbuminemia, e aumento do tempo de coagulação são comumente observadas em infecção causadas por *R. rickettsii* (Galvão et al. 2005). Entretanto, ainda há poucas informações sobre os efeitos patogênicos das demais espécies de riquétsias do GFM nos diferentes hospedeiros, sendo que, muitas vezes estas infecções podem estar ocorrendo de forma assintomática (Fortes 2010).

Neste estudo, os resultados das avaliações do G2 revelaram leucocitose, neutrofilia e monocitose no 7º dia PI. Em cães infectados por *R. rickettsii* foram descritas como anormalidades hematológicas anemia, trombocitopenia, leucopenia leve após o aparecimento da febre, seguido por leucocitose (Keenan et al. 1977, Gasser, Birkenheuer & Breitschewerdt 2001). No entanto, Font, Closa & Mascort. (1992) descreveram sete casos em canídeos soropositivos para *R. conorii* que apresentavam um quadro clínico hematológico variando de leucopenia a leucocitose. Alterações como neutrofilia e monocitose podem ser relacionadas às infecções bacterianas por riquétsias, assim como infecções fúngicas e protozoárias (Biondo 2005). Neste experimento, sugere-se que estas alterações observadas aos 7 dias PI no G2 possam ser uma resposta a infecção aguda causada por esta bactéria.

Em relação ao eritrograma, foi evidenciado nos cobaios do G2 um aumento na contagem de plaquetas aos 14 dias PI, sem haver presença de febre. Plaquetas são consideradas mediadores da homeostase sanguínea, tendo como principal função fisiológica detectar vasos endoteliais danificados, agregando-se no local do dano e iniciando o processo

coagulação sanguínea, impedindo um extravasamento sanguíneo (Wong 2013). Como a riquétsia se multiplica nas células endoteliais dos seus hospedeiros (Greene & Breitschwerdt 2006), sugere-se que este aumento nas contagens de plaquetas seja em decorrência desta homeostase.

Todavia, Piranda (2008) relatou que cães acometidos por *R. rickettsii* apresentaram significativa diminuição das plaquetas durante o período febril. Del Fiol et al. (2010) também observaram uma diminuição das plaquetas como sendo um achado frequente em infecções por *R. rickettsii*.

No presente estudo, os cobaios do G2 apresentaram uma diminuição de PPT. A diminuição destas proteínas é uma alteração frequentemente verificada em processos fisiológicos em animais jovens, como durante as fases de crescimento onde ocorrem disfunções hormonais, em alterações envolvendo subnutrição e processos hemorrágicos devido a traumas ou patógenos (González & Scheffer 2003). Lopes, Biondo & Santos (2007) citaram que em processos inflamatórios ocorre saída de líquidos e proteínas para os tecidos, com queda nas proteínas plasmáticas; sendo observado em hemorragias ou exsudação.

Neste estudo observaram-se alterações hematológicas no G1, revelando leucopenia aos 7 dias PI, não sendo observadas demais alterações. Anderson & Valenzuela (2008) citam que os carrapatos hematófagos apresentam em sua saliva moléculas capazes de modular a resposta imune do hospedeiro, levando a uma supressão da atividade leucocitária, concordando assim com este achado.

No eritrograma dos cobaios do G1 foi verificada uma diminuição nas contagens de plaquetas aos 7, 14 e 21 dias PI. Esta diminuição pode estar relacionada ao parasitismo pelo carrapato, o qual durante o seu repasto sanguíneo libera em sua saliva antagonistas da atividade plaquetária, anticoagulantes e vasodilatadores (Francischetti et al. 2010).

Observou-se também neste grupo um aumento de PPT, o que pode ser atribuídos a fatores como desidratação onde ocorre uma hemoconcentração, aumentando os valores das proteínas plasmáticas totais e perda de fluídos (Lopes, Biondo e Santos 2007). Contudo, Freitas (2007) em avaliação dos parâmetros hematológicos de equinos parasitados por carrapatos do gênero *Amblyomma* spp. encontrou concentrações de PPT dentro dos parâmetros fisiológicos para estes animais. Sugere-se que o aumento destas proteínas neste grupo esteja relacionado a um processo de desidratação.

As alterações nos parâmetros clínicos foram observadas somente nos cobaios do G2. Estas alterações constituíram-se apenas em escaras nos locais de fixação das ninfas, caracterizadas por lesões dermatológicas que foram denotadas após o desprendimento dos

ácaros. Raoult & Roux (1997) relataram que os sinais clínicos das infecções por riquétsias variam dependendo da espécie de riquétsia envolvida.

Além disso, Piranda (2008) e Del Fino et al. (2010) descreveram a febre como uma das manifestações clínicas da infecção causada por riquétsias. Krawczak (2012) ao avaliar coelhos infectados com *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) relatou não haver encontrado febre ou demais alterações clinicas nestes animais. Contudo, a riquetsiose causada por *R. parkeri*, em humanos, tem como característica apresentar uma sintomatologia mais branda, sendo observados: dores de cabeça, erupções cutâneas, mialgia, escaras nos locais de fixação dos carrapatos e febre inferior a 40°C (Spolidorio et al. 2010, Romer et al. 2011, Sangioni et al. 2011, Silva et al. 2011).

Valbuena, Feng & Walker (2002) constataram que infecções causadas por riquétsias, consideradas de baixa patogenicidade, incluindo *R. parkeri*, possuem como sítio de multiplicação, preferencialmente, o próprio local de inoculação do vetor, podendo gerar escaras cutâneas. Paddock et al. (2004) e Krawczak (2012) também relataram a presença de escaras nas infecções causadas por outras riquétsias. No entanto, nas infecções por *R. rickettsii* estas lesões são menos frequentes (Spolidorio et al. 2010).

Nas avaliações histopatológicas foram constatadas a presença de hemossiderose difusa leve no baço de 10% (1/10) dos cobaios do G2, aos 10 dias PI. Vasconcellos (2013) relatou um caso de hematoma esplênico relacionado a distúrbios de coagulação secundários à infecção por *Anaplasma phagocytophila*. A hemossiderose esplênica pode ocorrer por diversas causas, sendo encontrado em patologias de diferentes agentes etiológicos. Desta forma, esta alteração pode ser sugestiva da infecção provocada por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica).

Neste experimento, em 20% (2/10) dos cobaios do G1 foi verificada a presença de hemossiderose difusa leve no baço aos 28 dias PI. Freire (1979) observou que 50% (2/4) dos bovinos infestados experimentalmente por *A. cajennense* apresentaram como um achado acidental hemossiderose esplênica. Considera-se este resultado como um achado acidental, pois o parasitismo por carrapatos não é citado como sendo causa de hemossiderose esplênica.

Verificou-se também que 20% (2/10) dos animais do G2, apresentaram hiperplasia folicular multifocal leve no baço aos 28 dias PI. Este aumento do número de células do baço é considerado como uma lesão encontrada em doenças infecciosas ou auto-imune, como nas septicemias e viremias (Coelho 2002).

Araújo et al. (2013) relataram que a hiperplasia folicular ocorreu em infecções por *Trypanossoma cruzi* em cães. Andrade, Pinto & Oliveira (2002) também evidenciaram esta alteração em infecções virais como causadas por Togavírus em camundongos.

Congestão pulmonar difusa foi uma lesão microscópica observada em 30% (3/10) dos cobaios do G2 aos 10 e 28 dias PI e em 33% (2/6) dos animais do G3 aos 10 dias PI. Carvalho et al. (1992) relataram esta alteração em indivíduos com leptospirose. Todavia a congestão difusa pulmonar pode ser uma lesão inespecífica, atribuída a diversas causas, dentre as quais incluem a eutanásia (McGavin & Zachary 2012).

CONCLUSÃO

Neste estudo foi possível demonstrar uma infecção aguda de caráter subclínico por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) em *Cavia porcellus*. Ressalta-se que dentre os agentes etiológicos da FMB, *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) apresenta menor patogenicidade neste modelo experimental. As principais alterações clínicas determinadas pelo micro-organismo constituem as lesões dermatológicas. Outros estudos devem ser realizados para investigar a participação de roedores na epidemiologia da FMB ocasionada por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica).

REFERÊNCIAS

Acha P.N. & Szyfres B. 2003. Chlamidioses & Rickettsioses in: Zoonoses and communicable diseases common to man and animals 3(2):3-51.

Anderson J.M. & Valenzuela J.G. 2008. Tick saliva: from pharmacology and biochemistry to transcriptome analysis and functional genomics. p.92-107. In: Bowman A.S. & Nutall P.A. Ticks – Biology, Disease an control. Cambridge University Press, New York, USA.

Andrade A., Pinto S.C. & Oliveira R.S. 2002. Animais de Laboratório: criação e experimentação [online]. Editora FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ. 388p.

Araújo I.M., Domiciano T.A.O., Jorge E.M., Paredes L.J.A., Machado F.M.C. & Bezerra Junior P.S. 2013. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em um cão domiciliado da área urbana do município de Castanhal, Estado do Pará, Brasil. Ars Veterinária 29:56.

Biondo A.W. 2005. Interpretaçao do leucograma. p.29-35. In: González, F.H.D. & santos A.P. (eds.): Anais do II Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Breitschwerdt E.B., Walker D.H., Levy M.G., Burgdorfer W., Cobertt W.T., Hurlbert S.A., Stebbins M.E., Curtins B.C. & Allen D.A. 1988. Clinical, hematologic and humoral immune response in female dogs inoculated with *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia montana*. American Journal of Veterinary Research 49(1):70-76.

Camargo-Neves V.L.F., Vieira A.M.L., Souza C.E., Labruna M.B., Mayo R.C. & Souza S.S.L. 2004. Manual de vigilância acarológica. p.35-37. Secretaria Estadual de Saúde do Estado de São Paulo, São Paulo, SP.

Carpenter J.W. 2010. Formulário de animais exóticos. MedVet, São Paulo. 492p.

Carvalho J.E.M., Marchiori E.S., Silva J.B.G., Netto B.A.S., Tavares W., Paula A.V. 1992. Comprometimento pulmonar na leptospirose. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 25(1):21-30.

Coelho H.E. 2002. Patologia Veterinária. Ed. Manole Ltda, Barueri, SP. p.45-53.

Conti-Diaz I.A., Moraes-Filho J., Pacheco R.C. & Labruna M.B. 2009. Serological evidence of *Rickettsia parkeri* as the etiological agent of rickettsiosis in Uruguay. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo 51(6):337-339.

Cooper G. & Schiller A.L. 1975. Anatomy of the guinea pig. Cambridge, Harward University Press. 417p.

Del Fiol F.S., Junqueira F.M., Rocha M.C.P., Toledo M.I & Barebrato Filho S. 2010. A Febre Maculosa no Brasil. Revista Panamericana de Salud Publica 27(6):461-466.

Font A., Closa J.M. & Mascort J. 1992. Tick – transmitted diseases: a comparative study of Lyme disease, canine ehrlichiosis and rickettsiosis in the dog. Veterinary International 3:3-13.

Fortes F.S. 2010. Infecção por *Rickettsia* spp. em cães no município de são josé dos pinhais e em capivaras no município de Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinária, apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 105f.

Francischetti I.M.B., Sá-Nunes A., Mans BJ., Santos IM.& Ribeiro J.M.C. 2010. The role of saliva in tick feeding. Front Bioscience [online] 14(1):2051-2088.

Freitas M.O. 2007. Detecção de Rickettsias do Grupo Febre Maculosa em cães e equinos em São José dos Pinhais, PR. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 79f.

Freire, N.M.S. 1979. Toxicidade de *Amblyomma cajennense* para ruminantes domésticos e sua significação como agente de uma nova “Tick Paralysis”. Tese de doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. 129p.

Gasser A.M., Birkenheuer A.J. & Breitschewerdt E.B. 2001. Canine Rocky Montain Spotted fever: a retrospective study of 30 cases. Journal of the American Animal Hospital Association 37(1):41-48.

Galvão M.A.M. 1988. A FMB em Minas Gerais e seus determinantes. Dissertação de Mestrado em Saúde Pública, Escola Nacional de Saúde Pública, ENSP/Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.

Galvão M.A.M., Calic S.B., Chamone C.B., Mafra C.L., Filho G.C., Olano J.P. & Walker D.H. 2003. Spotted Fever Rickettsiosis in Coronel Fabriciano, Minas Gerais State. Revista Brasileira de Medicina Tropical 36:479-481.

Galvão M.A.M., Silva L.J., Nascimento E.M.M., Calic S.B., Sousa R. & Bacellar F. 2005. Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. Revista de Saúde Pública 39(5):1-6.

González F.H.D. & Scheffer J.F.S. 2003. Perfil sanguíneo: ferramenta de análise clínica, metabólica e nutricional. p.73-89. In: Gonzálvez F.H.D., Campos R. (eds.): Anais do I Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da região Sul do Brasil, Porto Alegre, RS.

Greene C.E. & Breitschwerdt E.B. 2006. Rocky Mountain Spotted Fever, Murine Typhuslike Disease, Rickettsialpox, Typhus, and Q Fever, p.232-240. In*:* Ibid. (Ed.), Infectious Diseases of the Dog and Cat. Saunders Elsevier, 3rd ed. St Louis.

Harden V.A. 1990. Rocky mountain spotted fever. Baltimore: Johns Hopkins University Press. 8p.

Horta M.C., Labruna M.B., Pinter A., Linardi P.M. & Schumaker T.T.S. 2007. Rickettsia infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 102(7):793-801.

Keenan K.P., Buhles W.C., Huxsoll J.D.L., Williams R.G., Hildebrandt P.K., Campbell J.M & Stephenson E.H. 1977. Pathogenesis of infection with *Rickettsia rickettsii* in the dog: a disease model for Rocky Montain Spotted Ferver. The Journal of Infectious Diseases 135:911-917.

Kelly P.J., Matthewman L.A., Mason P.R., Courtney S., Katsande C. & Rukwava J. 1992. Experimental infection of dogs with a Zimbabwean strain of *Rickettsia conorii*. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 95(5):322-326.

Krawczak, F.S. 2012. Avaliação da dinâmica da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos *Amblyomma ovale* Koch, 1844 naturalmente infectados. Dissertação de Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 88f.

Labruna M. B. 2004. Carrapatos. A Hora Veterinária 23:63-65.

Labruna M.B., Mattar S., Nava S., Bermudez S., Venzal J.M., Dolz G., Abarca K., Romero L., De Sousa R., Oteo J. & Zavala-Castro J. 2011. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. Revista MVZ Córdoba 16(2):2435-2457.

Lopes S. T.A., Biondo A.W. & Santos A.P. 2007. Manual de Patologia Clínica Veterinária - 3. ed. – Santa Maria: UFSM/Departamento de Clínica de Pequenos Animais. 107p.

McGavinM.D.& Zachary J.F. 2012. Pathologic Basis of Veterinary Diseases, 5th ed. St Louis: Missouri, EUA.

Paddock C.D., Sumner J.W., Comer J.A., Zaki S.R., Goldsmith C.S., Goddard J., McLellan S.L., Tamminga C.L. & Ohl, C.A. 2004. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. Clinical Infectious Diseases Chicago Journals 38:805-811.

Parola P., Davoust B. & Raoult D. 2005. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. Veterinary Research 36:469-492.

Piranda E.M. 2008. Estudos biológicos de *Rhipicephalus sanguineus* e interação *Rickettsia rickettsii*, *R. sanguineus* e cães em condições laboratoriais. Tese de doutorado em Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. 74p.

Raoult D., Parola P. & Paddock C.D. 2005. Tick-Bourne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases challenging Old Concepts. American Society for Microbiology. 18(4):719-756.

Raoult D. & Roux V. 1997. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. Clinical Microbiology Reviews 10:694-719.

Rehacek J., Urvolgyi J. & Kocianova E. 1992. Susceptibility of some species of rodents to rickettsiae. Folia Parasitologica 39(3):265-284.

Reis F.S., Barros M.C., Fraga E.C., Penha T., Teixeira W., Santos A.C.G. & Guerra R.M.S. N. 2008. Ectoparasitos de pequenos mamíferos silvestres de áreas adjacentes ao rio Itapecuru e área de preservação ambiental do Inhamum, Estado do Maranhao, Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 17(1):69-74.

Romer Y., Seijo A.C., Crudo F., Nicholson W.L., Varela-Stokes A., Lash R.R. & Paddock C.D. 2011. *Rickettsia parkeri* rickettsiosis, Argentina. Emerging Infectious Diseases 17(7):1169-1173.

Sangioni, L.A. 2003. Pesquisa de Infecção por riquettsias do grupo da febre maculosa em humanos, cães e equídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo. Tese de Doutorado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 86p.

Sangioni L.A., Vogel F.F.S., Cadore G.C., Hilger R.B., Tonim R., Pacheco R.C., Ogrzewalska M. & Labruna M.B. 2011. Rickettsial infection in Cerro Largo, State of Rio Grande do Sul, Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 63(2):511-514.

Sexton D.J., Banks J., Graves S., Hughes K. & Dwyer B. 1994. Prevalence of antibodies to spotted fever group rickettsiae in dogs from southeastern Australia. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 51(1):121.

Silva N., Eremeeva M.E., Rozental T., Ribeiro G.S., Paddock C.D., Ramos E.A.G., Favacho A.R.M., Reis M.G., Dasch G.A., Lemos G.A. 2011. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. Emerging Infectious Diseases 17(2):275-278.

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

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

Spickett A.M., Horak I.G., Braack L.E.O. & Ark H.V. 1991. Drag-sampling of free-living Ixodid Ticks in the Kruger National Park. Onderstepoort Journal of Veterinary Research 58(1):27-32.

Spolidório M., Labruna M.B., Mantovani E., Brandão P.E., Richtzenhain L.J. & Yoshinari N. 2010. Novel Spotted Fever Group Rickettsiosis, Brazil. Emerging Infectious Diseases 16(3):521-523.

Storer T.I., Usinger R.L., Stebbins R.C. & Nybakken J.W. 1998. Zoologia geral. 1 ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 816p.

Valbuena G., Feng H.M. & Walker D.H. 2002. Mechanisms of immunity against rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. Microbes Infection 4(6):625-633.

Vasconcellos M. 2013. Hematoma esplênico: relato de caso. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária 21:1679-7353.

Weiss E. & Moulder J.W. 1984. The Rickettsias and Clamydias, p.687–739. In: Kreig N.R. and. Holt J.G (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.

Wong C.H.Y, Jenne C.N., Petri B., Chrobok N.L & Kuber P. 2013. Nucleation of platelets with blood-borne pathogens on Kupffer cell precedes other innate immunity and contributes to bacterial clearance. Nature Immunology 14:785-792.

Yu X.J. & Walker D.H. 2003. The order rickettsiales. In: Dworkin M. The Prokaryortes: an evolving electronic resource for the microbiology community, 3rd. ed. New York: Springer-Velag.

Quadro 1. Avaliação hematológica: demonstração da média e desvio padrão dos resultados do leucograma dos cobaios de todos os grupos tratamentos nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias pós infestação (DPI)

	7 DPI			14 DPI			21 DPI			28 DPI		
GRUPOS	G3[a]	G1[b]	G2[c]	G3[a]	G1[b]	G2[c]	G3[a]	G1[b]	G2[c]	G3[a]	G1[b]	G2[c]
CÉLULAS	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP
Leucócitos ($x10^3/mm^3$)	10,62a ± 2,15	8,41bA ± 3,20	11,37B ± 1,70	9,56a ± 3,16	10,65aA ± 2,56	12,26A ± 2,44	7,76a ± 1,97	10,08aA ± 2,79	11,6A ± 1,97	9,36a ± 2,50	9,8aA ± 3,31	11,02A ± 1,90
Neutrófilos (%)	5,67a ± 1,07	3,33aA ± 1,22	5,33B ± 1,55	4,44a ± 7,13	3,77aA ± 1,42	4,89A ±1,02	3,92a ± 1,5	4,87aA ± 1,73	4,94A ± 1,49	5,06a ± 1,87	5,03aA ± 2,18	4,65A ± 1,53
Linfócitos (%)	4,05a ± 1,26	4,57aA ± 2,74	5A ± 1,34	4,34a ± 2,68	5,85aA ± 2,57	6,37A ± 2,15	3,12a ± 8,22	4,53aA ± 2,22	5,94A ± 1,94	3,88a ± 8,45	4,02aA ± 9,60	5,60A ± 1,82
Monócitos (%)	2,29a ± 83,2	2,17aA ± 300	5,61B ± 2,46	4,4a ± 7,6	26,7aA ± 3,01	4,32A ± 1,95	4,56a ± 5,48	2,28aA ± 2,25	3,42A ± 2,76	1,37a ± 5,0	3,59aA ± 2,81	1,05A ± 8,4
Eosinófilos (%)	7,15a ± 5,49	2,84aA ± 3,81	4,66A ± 3,9	7,34a ± 8,39	4,66aA ± 4,75	5,63A ± 4,37	2,93a ± 2,65	4,44aA ± 3,58	3,68A ± 2,07	2,83a ± 2,64	3,76aA ± 3,45	6,62A ± 3,65

a,b: médias seguidas por letras diferentes, na linha, na comparação entre G3 e G1, diferem pelo teste F ($p< 0,05$). A,B: médias seguidas por letras diferentes, na linha, na comparação entre G1 e G2, diferem pelo teste F ($p< 0,05$). ᾱ: média. DP: desvio padrão. G3[a]: grupo composto por animais não infestados. G1[b]: grupo composto por animais infestados com ninfas de *Amblyomma ovale* não infectadas. G2[c]: grupo composto por animais infestados com ninfas de *Amblyomma ovale* naturalmente infectadas com *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica).

Quadro 2. Avaliação hematológica: demonstração da média e desvio padrão dos resultados do eritrograma dos cobaios de todos os grupos tratamentos nos períodos de 7, 14, 21 e 28 dias pós infestação (DPI)

	7 DPI			14 DPI			21 DPI			28 DPI		
GRUPOS	G3[a]	G1[b]	G2[c]	G3[a]	G1[b]	G2[c]	G3[a]	G1[b]	G2[c]	G3[a]	G1[b]	G2[c]
CÉLULAS	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP	ᾱ / DP
Hemácias (10^6/µL)	3,97a ± 0,59	4,22aA ± 0,26	4,33A ± 0,69	4,03a ± 0,40	3,98aA ± 0,64	3,97A ± 0,51	3,92a ± 0,15	4,08aA ± 0,89	4,2A1 ± 0,50	3,81a ± 0,23	3,80aA ± 0,64	4a ± 0,52
Hemoglobina (g/µL)	10,45a ± 1,78	11,24aA ± 1,68	11,82A ± 1,23	10,75a ± 1,0	10,58aA ± 1,73	11,23A ± 1,08	10,23a ± 0,272	10,9aA ± 2,37	11,5A ± 1,15	10,3a ± 0,64	10,5aA ± 1,75	11,5A ± 1,43
Hematócrito (%)	37,11a ± 5,91	40,86aA ± 5,47	41,25A ± 5,74	36,07a ± 2,55	37,38aA ± 6,17	37,08A ± 3,67	35,55a ± 2,39	35,45aA ± 5,96	37,87A ± 4,41	34,8a ± 4,94	36,1aA ± 5,31	36,01A ± 4,82
Proteína plasmática (g/dl)	6,06a ± 0,28	6,50bA ± 0,33	6,49A ± 0,22	5,4a ± 1,35	6,66bA ± 0,58	6,27A ± 0,39	5,9a ± 0,34	6,62bA ± 0,52	5,9B ± 0,15	5,85a ± 0,44	6,36aA ± 0,56	5,98A ± 0,31
Plaquetas ($x10^3/mm^3$)	417 a ± 92,2	331bA ± 43,2	373A ± 51	463a ± 164	320bA ± 29,9	394B ± 90,66	455a ± 135	355bA ± 52,78	377A ± 63,3	400a ± 112	360aA ± 40,75	400A ± 40,6
VCM fL	93,38a ± 2,62	93,84aA ±5,75	95,41A ± 3,16	89,8a ± 3,64	94,7 aA ± 2,9	92,18aA ± 2,06	90,6a ± 3,7	84,4aA ± 5,11	90,1A ± 2,42	91,1a ± 7,45	88,5aA ± 3,75	89,6A ± 2,60
CHCM %	28,21a± 0,54	27,01aA ±1,21	28,04A ±0,74	29,7a ± 0,88	27,4 aA ±0,76	30,18A ± 0,60	28a ± 1,34	31,2aA ± 2,31	29,2A ± 1,28	29,8a ± 2,55	30,1aA ± 1,6	32,01A ± 0,61

a,b: médias seguidas por letras diferentes, na linha, na comparação entre G3 e G1, diferem pelo teste F ($p < 0,05$). A,B: médias seguidas por letras diferentes, na linha, na comparação entre G1 e G2, diferem pelo teste F ($p < 0,05$). ᾱ: média. DP: desvio padrão. G3[a]: grupo composto por animais não infestados. G1[b]: grupo composto por animais infestados com ninfas de *Amblyomma ovale* não infectadas. G2[c]: grupo composto por animais infestados com ninfas de *Amblyomma ovale* naturalmente infectadas com *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica).

Quadro 3. Análise histopatológica de tecidos (pulmão e baço) dos cobaios de todos os grupos tratamentos, nos períodos de 7, 10, 14 e 28 dias pós infestação (DPI)

		Eutanásia (DPI)	Tecidos Analisados	
Grupos	Animais		Baço	Pulmão
G1[a]	07	28	Sem alterações	Sem alterações
	08	28	Sem alterações	Sem alterações
	09	28	Sem alterações	Sem alterações
	10	28	Hemossiderose difusa leve	Sem alterações
	11	28	Hemossiderose difusa leve	Sem alterações
	12	28	Sem alterações	Sem alterações
	13	28	Sem alterações	Sem alterações
	14	28	Sem alterações	Sem alterações
	15	10	Sem alterações	Sem alterações
	16	10	Sem alterações	Sem alterações
G2[b]	17	28	Sem alterações	Congestão difusa
	18	10	Hemossiderose difusa leve	Congestão difusa
	19	28	Sem alterações	Sem alterações
	20	28	Hiperplasia folicular multifocal leve	Sem alterações
	21	28	Sem alterações	Sem alterações
	22	10	Sem alterações	Sem alterações
	23	28	Hiperplasia folicular multifocal leve	Sem alterações
	24	28	Sem alterações	Sem alterações
	25	28	Sem alterações	Congestão difusa
	26	28	Sem alterações	Sem alterações
G3[c]	01	10	Sem alterações	Congestão difusa
	02	10	Sem alterações	Congestão difusa
	03	28	Sem alterações	Sem alterações
	04	28	Sem alterações	Sem alterações
	05	28	Sem alterações	Sem alterações
	06	28	Sem alterações	Sem alterações

G1[a]: animais não infestados. G2[b]: animais infestados com ninfas de *Amblyomma ovale* não infectadas. G3[c]: animais infestados com ninfas de *Amblyomma ovale* naturalmente infectadas com *Rickettsia parkeri* (cepa Mata Atlântica).

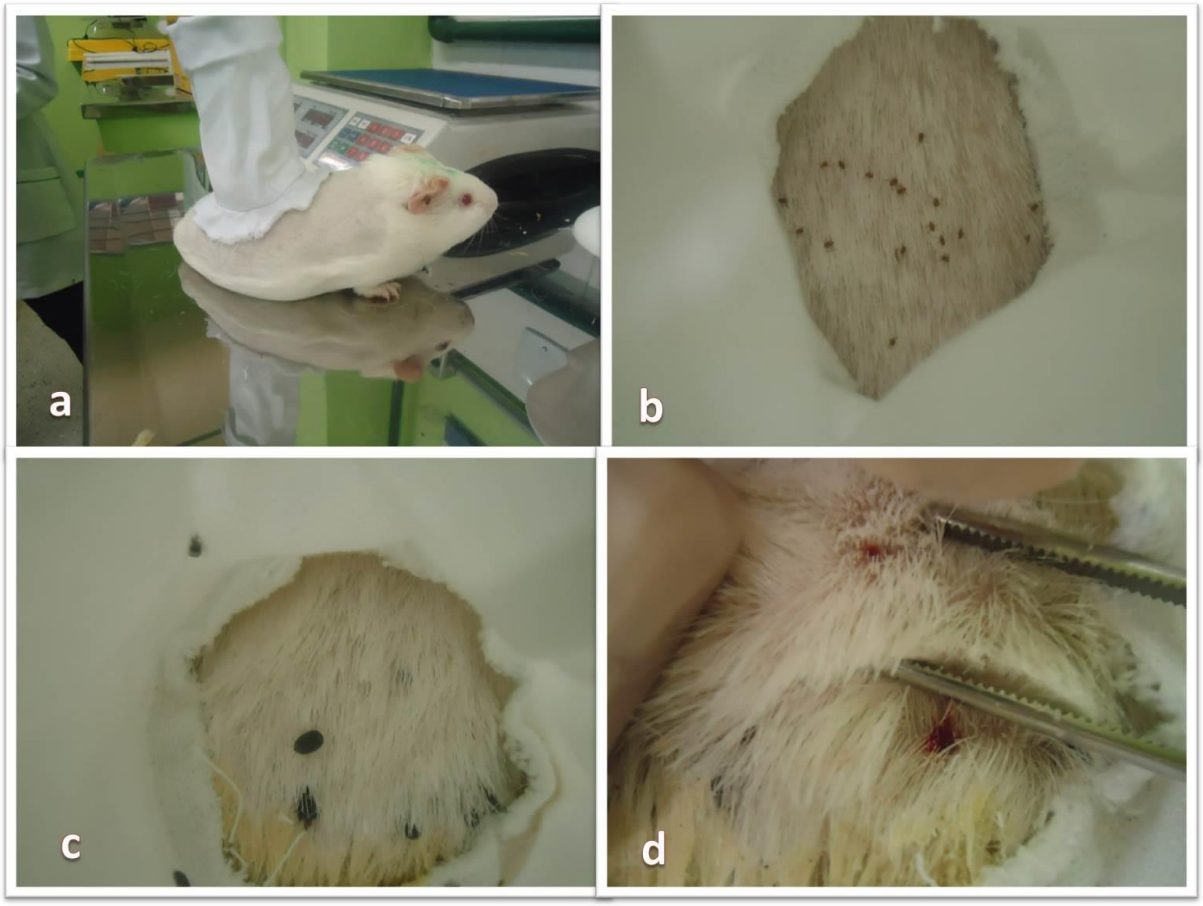

Figura 1. a. Cobaio com câmara de infestação fixada na região dorsal. b. Ninfas de *A. ovale* no interior da câmara de infestação, no dia da realização da infestação experimental. c. Ninfas ingurgitadas dentro da câmara de infestação, após repasto sanguíneo. d. Escaras cutâneas no local de fixação das ninfas de *A. ovale.*

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Estudos recentes vêm relatando a presença de uma nova cepa de riquétsia circulando no Brasil. Esta cepa, denominada de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) foi descrita nos estados de São Paulo (Spolidorio et al. 2010, Sabatini et al. 2010), Bahia (Silva et al. 2011) e Santa Catarina (Medeiros et al. 2011, Barbieri 2012). Sabatini et al. (2010) sugerem que o carrapato *A. ovale* seja o principal vetor desta nova cepa, nas áreas de Mata Atlântica. Szabó et al. (2012) conseguiram isolar esta nova cepa de riquétsia oriunda de *A. ovale* obtidos numa região do estado de SP, reforçando a importância deste vetor na transmissão deste agente.

O objetivo deste trabalho foi ampliar os conhecimentos a respeito de *A. ovale* como disseminador e transmissor de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica). Além disso, avaliou o perfil da infecção causada por este micro-organismo em *Cavia porcellus*.

Nava, Mangold & Guglielmone (2006) destacaram que os roedores (cobaios) são amplamente utilizados em pesquisas devido à facilidade de manipulação e por serem empregados rotineiramente em estudos na epidemiologia no ciclo biológico de carrapatos. Demostrou-se nesta pesquisa que o carrapato *A. ovale* possui competência vetorial na transmissão desta riquétsia, apresentando 100% de transmissão transestadial entre as fases de ninfa para adulto e favorecendo a manutenção desta riquétsia nestes vetores. Adicionalmente, foi possível evidenciar que o hospedeiro *C. porcellus* foi susceptível à infecção. Verificou-se que os cobaios apresentaram soroconversão a partir dos 14 dias PI por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica). Entretanto, o DNA do agente não foi detectado pela técnica empregada nos tecidos avaliados (pulmão, baço, fígado e cérebro).

La Scola e Raoult (1997) mencionaram que *R. parkeri* causa infecção nas células endoteliais dos animais, proporcionando uma concentração muito baixa nos tecidos. Isto pode dificultar a detecção do DNA do micro-organismo por análise molecular. Desta forma, a quantidade de DNA presente nos órgãos dos cobaios poderia ser inferior a 8,15ng/µL e estando abaixo do limiar detectável pela PCR empregada neste trabalho. Milagres (2010) relatou resultados semelhantes ao analisar amostras de DNA riquetsial em tecidos de roedores obtendo resultados negativos na PCR utilizando *primers* específicos para amplificação do gene da citrato sintase (*gltA*). Maciel (2013) ao empregar a técnica de PCR para avaliar a infecção experimental de *R. parkeri* (cepa At 24) no baço e pulmão de galinhas domésticas não observou a amplificação do fragmento do gene *gltA*.

Na determinação do perfil hematológico da doença, os resultados de hemograma e eritrograma nos indicaram a presença de uma infecção aguda por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) nos cobaios infectados. Não foram verificadas alterações nos padrões clínicos avaliados relativos aos comumente relacionados às riquétsias mais patogênicas, assim como *R. rickettsii*, especialmente o aumento de temperatura, anemias e máculas disseminadas pelo organismo, dentre outros (Gasser, Birkenheuer & Breitschewerdt 2001, Biondo 2005, Del Fiol et al. 2010).

Todavia, lesões dérmicas foram observadas ao redor de 7 dias PI, coincidindo com o desprendimento dos ixodideos ingurgitados. Desta forma, no modelo experimental avaliado, a infecção por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) apresenta uma infecção mais branda de característica subclínica. Este resultado está de acordo com os demais autores que pesquisaram a infecção por *R. parkeri* em outros hospedeiros (Sangioni et al. 2011, Krawczak 2012, Maciel 2013).

Na análise histopatológica, os resultados obtidos neste trabalho foram compatíveis com as alterações histopatológicas relatadas nas infecções por outros agentes bacterianos, incluindo outras riquétsias (Vasconcellos 2013). Com base nos resultados obtidos, a infecção desta riquétsia pode ser considerada de baixa patogenicidade para os cobaios.

Novos estudos devem ser realizados a fim de esclarecer a participação dos vetores e demais hospedeiros como reservatórios/amplificadores desta nova cepa na natureza.

6. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste experimento permitem concluir que:

1. As ninfas de *A. ovale* possuem competência vetorial na transmissão de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) para cobaios (*C. porcellus*);
2. A transmissão transestadial de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) entre as fases de ninfa para adulto de *A. ovale* é de 100%;
3. Cobaios infestados com ninfas de *A. ovale* infectadas soroconverteram, apresentando títulos variados a partir da segunda semana após a infecção;
4. Não foi possível detectar de DNA riquetsial nos tecidos dos cobaios analisados pela técnica de PCR empregada nesta pesquisa;
5. Pelas avaliações dos padrões hematológicos, clínicos e histopatológicos foi possível evidenciar uma infecção aguda de caráter subclínico por *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) no modelo experimental estudado.

7. REFERÊNCIAS

Angerami R.N., Resende M.R., Feltrin A.F., Katz G.; Nascimento E.M., Stucchi R.S., Silva L.J. 2006. Brazilian spotted fever: a case series from na endemic area in southeastern Brazil: epidemiological aspects. Annals of the New York Academy of Sciences 1078(1):170-172.

Angerami R.N., Silva A.M.R, Nascimento E.M.M, Colombo S., Wada M.Y., Santos F.C.P., Mancini D.M., De Oliveira R.C., Katz G., Martins E.C. & Da Silva L.J. 2009. Brazilian spotted fever: two faces of a same disease? A comparative study of clinical aspects between an old and a new endemic area in Brazil. European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases 15(2):207-208.

Araújo I.M., Domiciano T.A.O., Jorge E.M., Paredes L.J.A., Machado F.M.C. & Bezerra Junior P.S. 2013. Infecção por *Trypanosoma cruzi* em um cão domiciliado da área urbana do município de Castanhal, Estado do Pará, Brasil. Ars Veterinária 29:56.

Azad A.F. & Beard C.B. 1998. Rickettsial pathogens and their arthropod vectors. Emerging Infectious Diseases 4:179-186.

Alves L.C., Borges C.C.A., Silva S., Couto S.E.R. & Menezes R.C. 2007. Endoparasitos em cobaias (*Cavia porcellus*) (Mammalia, Rodentia, Cavidae) provenientes de biotério de criação e experimentação do município do Rio de Janeiro, Brasil. Ciência Rural 37(5):1380-1386.

Bacellar F.C. 1996. *Rickettsias* isoladas e Portugal- contribuição para identificação e classificação das estirpes. Dissertação de doutoramento em Biologia. Universidade de Èvora, Évora.

Barbieri ARM. 2012. Aspectos epidemiológicos da febre maculosa da Mata Atlântica em um foco endêmico no município de Blumenau, Santa Catarina. Dissertação de Mestrado em Medicina Veterinária - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo. 91f.

Barci A.G. & Nogueira A.H.C. 2006. Febre Maculosa Brasileira. Disponível em: http://www. infobibos.com/Artigos/febremaculosa/FEBRE%20MACULOSA%20BRASILEI RA.pdf

Biondo A.W. 2005. Interpretaçao do leucograma. p.29-35. In: González, F.H.D. & santos A.P. (eds.): Anais do II Simpósio de Patologia Clínica Veterinária da Região Sul do Brasil. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

Björkman N., Dantzer V., Hasselager H.H. & Kjaersgaard P. 1981. Perfusion in vivo of the porcine placenta. Fixation for EM. Placenta 2:287-302.

Burgdorfer, W. 1988. Ecological and epidemiological considerations of Rocky Mountain spotted fever and scrubs typhus. p.33-50. In: Walker D. H. (Ed.) Biology of Rickettsial Diseases, Boca Raton, FL: CRC Press.

Calic S.B., Barcellos-Rocha C.M., Leite R.C., Mafra C.L., Galvão M.A. 2005. Old and new human rickettsiosis in Minas Gerais state, Brazil. Annals of the New York Academy of Sciences 1063:356-357.

Camargo-Neves V.L.F., Vieira A.M.L., Souza C.E., Labruna M.B., Mayo R.C. & Souza S.S.L. 2004. Manual de vigilância acarológica. p.35-37. Secretaria Estadual de Saúde do Estado de São Paulo, São Paulo, SP.

Chen L.F. & Sexton D.J. 2008. What's New in Rocky Mountain Spotted Fever? Infectious Diseases Clinics of North America 22(3):415-432.

Cooper G. & Schiller A.L. 1975. Anatomy of the guinea pig. Cambridge, Harward University Press. 417p.

Del Fiol F.S., Junqueira F.M., Rocha M.C.P., Toledo M.I & Barebrato Filho S. 2010. A Febre Maculosa no Brasil. Revista Panamericana de Salud Publica 27:461-466.

Dumler J. S. & Walker D. H. 2005. Rocky Mountain spotted fever-changing ecology and persisting virulence. The New England Journal of Medicine 353:551-553.

Fonseca L.M. & Martins A.V. 2007. Febre maculosa: revisão de literatura – Artigo revisão. Saúde & ambiente em revista 2(1):01-20.

Fortes F.S. 2010. Infecção por *Rickettsia* spp. em cães no município de são josé dos pinhais e em capivaras no município de Foz do Iguaçu, Paraná, Brasil. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinária, apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal e Medicina Veterinária Preventiva, Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 105f.

Fournier P.E. & Raoult D. 2009. Bacteriology, Taxonomy and Phylogeny of R*ickettsia*. p.379. In: Raoult D. & Parola P. Rickettsial diseases. New York: Healthcare.

Freitas M.O. 2007. Detecção de Rickettsias do Grupo Febre Maculosa em cães e equinos em São José dos Pinhais, PR. Dissertação de Mestrado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR. 79f.

Freitas M.C.D.O., Grycajuk, M., Molento M.B., Bonacin J., Labruna M.B., Pacheco R.C., Moraes-Filho J, Deconto I. & Biondo A.W. 2010. Brazilian spotted fever in cart horses in a non-endemic area in Southern Brazil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 19(2):130-131.

Galvão M.A.M. & Ribeiro J.G.L. 1993. Febre Maculosa. p.1374-1380. In: Pedroso E.R.P., Rocha M.O.C., Silva O.A. (Ed.) Clínica Médica; os princípios da prática ambulatorial. ed. Atheneu, São Paulo.

Gasser A.M., Birkenheuer A.J. & Breitschewerdt E.B. 2001. Canine Rocky Montain Spotted fever: a retrospective study of 30 cases. Journal of the American Animal Hospital Association 37:41-48.

Greca H, Langoni H & Souza L.C. 2008. Brazilian Spotted fever: a reemergnt zoonosis. Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical diseases 14(1):4.

Greene C.E. & Breitschwerdt E.B. 2006. Rocky Mountain Spotted Fever, Murine Typhuslike Disease, Rickettsialpox, Typhus, and Q Fever, p.232-240. In*:* Ibid. (Ed.), Infectious Diseases of the Dog and Cat. Saunders Elsevier, 3rd ed. St Louis.

Guedes E., Leite R., Prata M.C.A., Pacheco R.C., Walker D.H. & Labruna M.B. 2005. Detection of *Rickettsia rickettsii* in the tick *Amblyomma cajennense* in a new Brazilian spotted fever–endemic area in the state of Minas Gerais. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 100(8):841-848.

Guglielmone A.A., Beati L., Barros-Battesti D.M., Labruna M.B., Nava S., Venzal J.M., Mangold A.J., Szabó M.P.J., Martins J.R., Acuña-González D. & Peña A.E. 2006. Ticks (Ixodidae) on humans in South America. Experimental & Applied Acarology 40(2):83-100.

Holman R.C., Paddock C.D., Curns A.T., Krebs J.H., McQuiston J.H. & Childs J.E. 2001. Analysis of Risk Factors for fatal rocky mountain spotted fever: evidence for superiority of tetracyclines for therapy. Journal Infectious Diseases 184:1437-1444.

Horta M.C. 2002. Pesquisa de infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa em humanos, equídeos, caninos e em diferentes estádios de vida do *Amblyomma cajennense*, provenientes de uma área endêmica do estado de São Paulo. Tese de Mestrado em epidemiologia experimental aplicada as zoonoses**,** Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 72f.

Horta M. C., Moraes-Filho J., Casagrande R.A., Saito T.B., Rosa S.C., Ogrzewalska M., Matushima E.R & Labruna M.B. 2009 Experimental Infection of the Opossum *Didelphis aurita* by *Rickettsia rickettsii* and Evaluation of the Transmission of the Infection to ticks *Amblyomma cajennense*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases 9(1):109-117.

Jeffrey L. & Silber M.D. 1996. Rocky Mountain Spotted Fever. Clinics in Dermatology 14:245-258.

Kostman J.R.M.D. 1996. Laboratory Diagnosis of Rickettsial Diseases. Clinics in Dermatology 14:301-306.

Krawczak F.S. 2012. Avaliação da dinâmica da infecção por *Rickettsia parkeri* cepa Mata Atlântica, agente etiológico de uma nova riquetsiose brasileira, em carrapatos *Amblyomma ovale* Koch, 1844 naturalmente infectados. Dissertação de Mestrado em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, SP. 88f.

Labruna M. B. 2004. Carrapatos. A Hora Veterinária 137:63-65.

Labruna M.B., Jorge R.S., Sana D.A., Jacomo A.T., Kashivakura C.K., Furtado M.M., Ferro C., Perez S.A., Silveira L., Santos T.S., Jr. Marques S.R., Morato R.G., Nava A., Adania C.H., Teixeira R.H., Gomes A.A., Conforti V.A., Azevedo F.C., Prada C.S., Silva J.C., Batista A.F., Marvulo M.F., Morato R.L., Alho C.J., Pinter A., Ferreira P.M., Ferreira F. & Barros-Battesti D.M. 2005. Ticks (Acari: Ixodida) on wild carnivores in Brazil. Experimental & Applied Acarology 36:149-16.

Labruna M.B. 2002. Ticks (Acari: Ixodidae) on Wild Animals from the Porto-Primavera Hydroeletric Power Station Area, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz 97:1133-1136.

Labruna M.B. 2006. Epidemiologia da febre maculosa no Brasil e nas Américas. p.63-78. In: I Simpósio Brasileiro de Acarologia, Viçosa, Minas Gerais.

Labruna M.B., Pacheco R., Richtzenhain L.J. & Szabó M.P.J. 2007. Isolation of *Rickettsia rhipicephali* and *Rickettsia bellii* from *Haemaphysalis juxtakochi* Ticks in the State of São Paulo, Brazil. Applied and Environmental Microbiology 73(3):869-873.

Labruna, M.B. 2009. Ecology of *Rickettsia* in South America. Annals of the New York Academy of Sciences 1166:156-166.

Labruna M.B., Mattar S., Nava S., Bermudez S., Venzal J.M., Dolz G., Abarca K., Romero L., De Sousa R., Oteo J. & Zavala-Castro J. 2011. Rickettsioses in Latin America, Caribbean, Spain and Portugal. Revista MVZ Córdoba 16(2):2435-2457.

La Scola B. & Raoult D. 1997. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. Journal of Clinical Microbiology 35:2715-2727.

Lemos E.R.S., Machado R.D., Coura J.R., Guimarães M.A.A., Freire N.M.S., Amorim M. & Gazeta G.S. 1996. Epidemiological aspects of the Brazilian spotted fever: Seazonal activity of ticks collected in a endemic área in São Paulo, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 30(3):181-185.

Maciel J.F. 2013. 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 em Medicina Veterinária, Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, RS. 62f.

Madeira A. 2004. Surto de febre maculosa no estado de Santa Catarina. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária 13:364.

Martins T.F., Moura M.M. & Labruna M.B. 2012. Life-cycle and host preference of Amblyomma ovale (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. Experimental & Applied Acarology 56(2):151-158.

Medeiros A.P., Souza A.P., Moura A.B., Lavina M.S., Bellato V., Sartor A.A., Nieri-Bastos F.A., Richtzenhain L.J. & Labruna M.B. 2011. Spotted fever group Rickettsia infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 106(8):926-930.

Melles H. H., Colombo S. & Silva M.V. 1999. Spotted fever: isolation of Rickettsia from a skin biopsy sample. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. São Paulo 34:37-41.

Merhej V. & Raoult D. 2011. Rickettsial evolution in the light of comparative genomics**.** Biology Review 86:379-405.

Milagres B.S. 2010. Pesquisa de *Rickettsia* em animais sinantrópicos e domésticos em seus ectoparasitas em duas áreas de baixa endemicidade para febre maculosa brasileira da região

leste de Minas Gerais, de 2005 - 2007. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Instituto de Ciências Exatas e Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, BA.

Monteiro J.L. 1933. Comportamento experimental do coelho ao vírus do "Typho exantemático de São Paulo" e da febre maculosa das montanhas rochosas. Memórias do Instituto Butantã 8:3-9.

Moreira J.A. & Magalhães O. 1935. Typho Exantemático em Minas Gerais. Brasil Médico 21:465-470.

Mota R.A., Silva L.B.G., Cunha A.P., Sobrinho E.S.N., Pinheiro Junior J.W., Rabelo S.S.A. & Oliveira A.A.F. 2008. Alterações clínicas em cobaios (*Cavia porcellus*) inoculados experimentalmente com isolados de campo de *Burkholderia mallei* de equídeos com mormo. Medicina Veterinária 2(1):1-9.

Moura M.M., Martins T.F., Sabatini S. & Labruna M.B. 2012. Biologia do carrapato *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) em laboratório. Anais 20º Simpósio Internacional de Iniciação Científica, São Paulo, SP, *on line* (Resumo).

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

Nava S.N., Mangold A.J. & Guglielmone A.A. 2006. The natural hosts for larvae and nymphs of *Amblyomma neumanni* and *Amblyomma parvum* (Acari: Ixodidae). Experimental and Applied Acarology 40:123-131.

Pacheco R.C., Horta M.C., Moraes-Filho J., Ataliba A.C., Inter A. & Labruna M.B. 2007. Rickettsial infection in capybaras (*Hydrochoerus hydrochaeris*) from São Paulo, Brazil: serological evidence for infection by *Rickettsia bellii* and *Rickettsia parkeri*. Biomédica 27:364-371.

Padilha A.F. 2010. Detecção sorológica e molecular de espécies do gênero *Rickettsia* em pequenos roedores de três municípios de minas gerais com diferentes perfis de endemicidade. Dissertação de Mestrado em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto, MG. 92f.

Paddock C.D., Sumner J.W., Comer J.A, Zaki S.R., Goldsmith S.C., Goddard J., McLellan S.L.F., Tamminga C.L. & Ohl C.A. 2004. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. Clinical infectious diseases: an official publication of the Infectious Diseases Society of America 38(6):805-811.

Paddock C.D. 2009. The science and fiction of emerging rickettsioses. Annals of the New York Academy of Sciences 1166:133-143.

Parola P., Davoust B. & Raoult D. 2005. Tick- and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. Veterinary Research. 36:469-492.

Pereira M.C. & Labruna M.B. 1998. Febre Maculosa: aspectos clínicos epidemiológicos. Clínica Veterinária 12:19-23.

Pinter A. & Labruna M.B. 2006. Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. Annals of the New York Academy of Sciences 1078(1):523-529.

Piranda E.M. 2008. Estudos biológicos de *Rhipicephalus sanguineus* e interação *Rickettsia rickettsii*, *R. sanguineus* e cães em condições laboratoriais. Tese de doutorado em Veterinária, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. 74p.

Raoult D. & Parola P. 2009. Rickettsial diseases. p.379. In: Raoult D. & Parola P. New York: Informa Healthcare.

Raoult D., Parola P. & Paddock C.D. 2005. Tick-Bourne Rickettsioses around the World: Emerging Diseases challenging Old Concepts. American Society for Microbiology. 18(4):719-756.

Raoult D. & Roux V. 1997. Rickettsioses as paradigms of news or emerging infectious diseases. Clinical Microbiology Reviews 10(4): 694-719.

Rehacek J., Urvolgyi J. & Kocianova E. 1992. Susceptibility of some species of rodents to rickettsiae. Folia Parasitologica. 39:265-284.

Reis F.S., Barros M.C., Fraga E.C., Penha T., Teixeira W., Santos A.C.G. & Guerra R.M.S. N. 2008. Ectoparasitos de pequenos mamíferos silvestres de áreas adjacentes ao rio Itapecuru e área de preservação ambiental do Inhamum, Estado do Maranhao, Brasil. Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária. 17(1):69-74.

Sabatini G.S., Pinter A., Nieri-Bastos F.A., Marcili A. & Labruna M.B. 2010. 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 47(5):913-916.

Sangioni L.A. 2003. Pesquisa de Infecção por rickettsias do grupo da febre maculosa, em humanos, cães, eqüídeos e em adultos de *Amblyomma cajennense*, em região endêmica e não endêmica do estado de São Paulo. Tese de Doutorado em Epidemiologia Experimental e Aplicada às Zoonoses, Universidade de São Paulo, São Paulo. 86p.

Sangioni L.A., Horta M.C., Vianna M.C.B., Gennari S.M., Soares R.S., Galvão M.A.M., Schumaker T.T.S., Ferreira F., Vidotto O. & Labruna M.B. 2005. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. Emerging Infectious Diseases 11:265-270.

Sangioni L.A., Vogel F.F.S., Cadore G.C., Hilger R.B., Tonim R., Pacheco R.C., Ogrzewalska M. & Labruna M.B. 2011. Rickettsial infection in Cerro Largo , State of Rio Grande do Sul, Brazil. Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia 63(2):511-514.

Saraiva D.G., FOurnier G.F.S.R., Martins T.F., Leal K.P.G., Vieira F.N., Câmara E.M.V.C., Costa C.G., Onofrio V.C., Battesti D.M.B., Guglielmone A.A. & Labruna M.B. 2012. Ticks (Acari: Ixodidae) associated with small terrestrial mammals in the state of Minas Gerais, southeastern Brazil. Experimental & Applied Acarology 58(2):159-166.

Silva N., Eremeeva M.E., Rozental T., Ribeiro G.S., Paddock C.D., Ramos E.A.G., Favacho A.R.M., Reis M.G., Dasch G.A., Lemos G.A. 2011. Eschar-associated Spotted Fever Rickettsiosis, Bahia, Brazil. Emerging Infectious Diseases 17:275-278.

Souza C.E., Souza S.S.L., Lima V.L.C., Calic S.B., Camargo M.C.G.O., Savani E.S.M.M., D'Auria S.R.N., Linhares A.X. & Yoshinari N.H. 2008. Serological identification of *Rickettsia* spp from the spotted fever group in capybaras in the region of Campinas – SP – Brazil. Ciência Rural 38(6):1694-1699.

Souza C.E., Moraes-Filho J., Ogrzewalska M. & Uchoa F.C., Horta M.C., Souza S.S., Borba R.C. & Labruna M.B. 2009. Experimental infection of capybaras *Hydrochoerus hydrochaeris* by Rickettsia *rickettsii* and evaluation of the transmission of the infection to ticks *Amblyomma cajennense*. Veterinary Parasitology 161:116-121.

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

Storer T.I., Usinger R.L., Stebbins R.C. & Nybakken J.W. 1998. Zoologia geral. 1ª ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional. 816p.

Szabó M.P.J., Martins T.F., Nieri-Bastos F.A, Spolidorio, M.G. & Labruna M.B. 2012. A surrogate life cycle of *Amblyomma ovale* Koch, 1844. Ticks and Tick-Borne Diseases 3:262-264.

Vasconcellos M. 2013. Hematoma esplênico: relato de caso. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária. 21:1679-7353.

Walker D.H. 1989. Rocky Mountain spotted fever: A disease in need of microbiological concern. Clinical Microbiology of Review 2(3):227-240.

Walker D.H. 2002. *Rickettsia rickettsii*: as virulent as ever. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene 66(5):448-449.

Weller S.J., Baldridge G.D., Munderloh U.G., Simser J., Kurtti T.J. 1998. Phylogenetic placement of rickettsiae from the ticks *Amblyomma americanum* and Ixodes scapularis. Journal Clinic Microbiology. 36(5):1305-1317.

Weinert L.A., Werren J.H., Aebi A., Stone G.N. & Jiggins F.M. 2009. Evolution and diversity of Rickettsia bacteria. BMC Biology 7(6):1-15.

Weiss E. & Moulder J.W. 1984. The Rickettsias and Clamydias, p.687–739. In: Kreig N.R. and. Holt J.G (Eds.), Bergey's manual of systematic bacteriology. Williams and Wilkins, Baltimore.

Yu X.J. & Walker D.H. 2003. The order rickettsiales. In: Dworkin M. The Prokaryortes: an evolving electronic resource for the microbiology community, 3rd. ed. New York: Springer-Velag.