

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

**TESE**

**Alimentação de *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae)**  
**por meio de membranas de silicone:**  
**parâmetros biológicos e infecção *in vitro* de *Rickettsia***  
***parkeri***

**Carla Carolina Dias Uzedo Ribeiro**

**2015**



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

**ALIMENTAÇÃO DE *Ornithodoros rostratus*  
(Acari: Argasidae) POR MEIO DE MEMBRANAS DE SILICONE:  
PARÂMETROS BIOLÓGICOS E INFECÇÃO *IN VITRO* DE *Rickettsia  
parkeri***

**CARLA CAROLINA DIAS UZEDO RIBEIRO**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Adivaldo Henrique da Fonseca**

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

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2015

595.429

R484a

T

Ribeiro, Carla Carolina Dias Uzedo, 1984-  
Alimentação de *Ornithodoros rostratus*  
(Acari: Argasidae) por meio de membranas de  
silicone: parâmetros biológicos e infecção  
in vitro de *Rickettsia parkeri* / Carla  
Carolina Dias Uzedo Ribeiro. - 2015.  
97 f.: il.

Orientador: Aivaldo Henrique da  
Fonseca.

Tese (doutorado) - Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias.

Bibliografia: f. 83-95.

1. Carrapato - Teses. 2. Carrapato -  
Biologia - Teses. 3. Carrapato como  
transmissor de doenças - Teses. 4.  
Alimentação artificial - Teses. 5.  
*Rickettsia* - Teses I. Fonseca, Aivaldo  
Henrique da, 1953- II. Universidade Federal  
Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-  
Graduação em Ciências Veterinárias. III.  
Título.

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

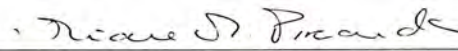
**CARLA CAROLINA DIAS UZEDO RIBEIRO**

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

TESE APROVADA EM 20/02/2015.



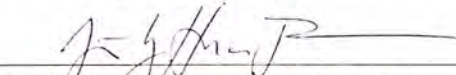
Doutor Aivaldo Henrique da Fonseca, UFRRJ  
(Orientador)



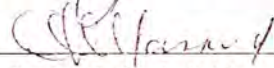
Doutora Eliane Mattos Piranda, UFMS



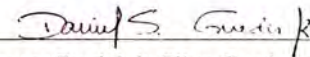
Doutor Paulo Henrique Duarte Caçado, EMBRAPA - CNPQC



Ph.D. João Luiz Horácio Faccini, UFRRJ



Doutor Carlos Luiz Massard, UFRRJ



Doutor Daniel da Silva Guedes, FIOCRUZ

*Dedico este trabalho a Deus, a minha mãe  
Kátia e ao meu pai Antônio Carlos.*

## AGRADECIMENTOS

Obrigada MEU DEUS pela tua grandeza, misericórdia, pelo que tens feito e pelo que há de fazer.

Aos meus pais ANTÔNIO CARLOS RIBEIRO e KÁTIA DIAS UZEDO pelo apoio incondicional em todos os momentos de minha vida.

As minhas avós CLOTILTE DIAS e ALTINA MOREIRA RIBEIRO, e tia SANDRA RIBEIRO por estarem sempre irradiando alegria e confiança.

Ao Professor ADIVALDO HENRIQUE DA FONSECA, meu orientador, pelo acolhimento, convívio, conhecimentos transferidos e principalmente por acreditar em meu trabalho.

À professora MARÍLIA FONSECA pelo carinho e preocupação, e pelas diversas vezes que me recebeu com tanta presteza em sua casa.

Aos amigos PAULO HENRIQUE DUARTE CANÇADO e ELIANE MATTOS PIRANDA por terem depositado a sementinha da pesquisa em meu coração. Tenho a certeza que estão imensamente felizes por assistirem mais essa etapa em minha vida.

Às companheiras e companheiros de laboratório PATRÍCIA BARIZON CEPEDA, BRUNA DE AZEVEDO BAÊTA, JAQUELINE VALIM, JÉSSICA FERNANDES, JÉSSICA FERREIRA, ANDRÉIA KILL SILVEIRA, RAFAELLA CÂMARA, BRUNA LAND, PRISCILA NUNES, GUSTAVO NUNES, MÁRCIO BARIZON CEPEDA, MATHEUS DIAS CORDEIRO, CAROLINA MAROTTA, LUCINÉIA, VANESSA DE ALMEIDA RAIA, MICHELE DA COSTA PINHEIRO, IWINE JOICE DE SÁ, NEIDE, PAULO CÉSAR e CHARLES PASSOS RANGEL pela agradável convivência.

Aos professores KÁTIA MARIA FAMADAS, JOSÉ LUIS LUQUE ALEJOS, MARIA DE LURDES DE AZEVEDO RODRIGUES e CARLOS LUIZ MASSARD, pela participação especial em minha vida acadêmica.

Ao professor LUIZ HORÁCIO FACCINI, pela orientação e conhecimentos transferidos desde minha iniciação científica até a conclusão do mestrado.

À EMBRAPA, pelo amparo logístico durante a coleta dos carrapatos no Pantanal – MS.

Aos meus amigos LEANDRO DE CARVALHO e MIRIAN SILVA SANTOS, por todo o carinho.

À TATIANE DE ALMEIDA KAWAMURA, pelo tempo de convivência no laboratório, companheirismo e alegria.

A minha amiga LEILA LOPES, pelo carinho de sempre.

As minhas amigas CLARICE MATTOS e DÉBORA COSTA BARROSO, por toda a amizade, selada desde os primeiros dias de aula na graduação.

Ao Instituto de Zootecnia, pelo empréstimo de coelhos, em especial o Senhor PEDRO TIMÓTEO e a Dra. PACITA.

Ao meu namorado EWERTON ANTÔNIO ALVARES e sua família, pelo carinho e compreensão nos momentos difíceis.

A amiga VERA LUCIA, pelo enorme carinho e auxílio durante todos esses anos.

Aos amigos conquistados durante minha permanência em Cuba, CLÁUDIA BEZERRA, MAYLIN NAVARRETE, MAYKELIN FUENTES, MILDREY PEREZ e a todos que fizeram esta estadia mais agradável.

A todos os meus AMIGOS E FAMILIARES não citados, que me concederam de maneira particular o sustento para chegar até aqui.

À UFRRJ, por todos os ensinamentos obtidos.

A todos os PROFESSORES E FUNCIONÁRIOS do Curso de pós- graduação em Ciências Veterinárias – UFRRJ, pelo agradável convívio e aprendizado.

À FIPERJ, pelo incentivo e entendimento da importância desta etapa em minha vida profissional.

Aos meus amigos de trabalho VITOR NAYLOR, LUIZ SALGADO e LUIS BERNABÉ, pelo apoio e companheirismo.

A todos os ANIMAIS que passaram por esse experimento, pois sem eles tal estudo não seria possível.

Ao CONSELHO NACIONAL PARA O DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLOGIA (CNPq), FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO (FAPERJ) e COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR (CAPES), pelo suporte financeiro.

## BIOGRAFIA

Carla Carolina Dias Uzedo Ribeiro, filha de Antônio Carlos Ribeiro e Kátia Dias Uzedo, nasceu em 19 de Julho de 1984, no município do Rio de Janeiro, RJ.

Cursou o ensino fundamental e início do ensino médio no Colégio Santa Mônica, concluindo o terceiro ano no Colégio Miguel Couto, ambos no município do Rio de Janeiro.

No ano de 2004, ingressou no curso de Zootecnia da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), colando grau e obtendo o título de bacharel em Zootecnia em 18 de Abril de 2009. Durante o período acadêmico, realizou estágios na Bovinocultura de Leite e Fazendinha Agrobiológica – EMBRAPA. Em agosto de 2006, iniciou sua vida científica no Laboratório de Ixodologia, tornando-se bolsista de Iniciação Científica do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico, sob a orientação do professor João Luiz Horácio Faccini.

No primeiro semestre de 2009, iniciou o mestrado acadêmico no Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em parasitologia veterinária, UFRRJ. Durante esse período, a aluna foi bolsista da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior – CAPES, ainda sob a orientação do professor João Luiz Horácio Faccini. Seu trabalho de dissertação teve como título “Ciclo biológico de *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911 (Acari: Argasidae) utilizando coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) como hospedeiros experimentais”.

Após concluir o mestrado, ingressou no curso de doutorado do mesmo programa, permanecendo como bolsista CAPES. Neste período foi orientada pelo professor Adivaldo Henrique da Fonseca, responsável pelo Laboratório de Doenças Parasitárias. De agosto a dezembro de 2013, realizou um estágio de Doutorado Sanduíche na Estación Experimental Indio Hatuey e Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria, em Cuba, com o intuito de aprimorar técnicas de alimentação artificial de carrapatos.

Durante a vida acadêmica publicou artigos científicos em revistas nacionais e internacionais, além de participar ativamente de eventos científicos e grupos de pesquisa.



## RESUMO GERAL

RIBEIRO, C.C.D.U. **Alimentação de *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae) por meio de membranas de silicone: parâmetros biológicos e infecção *in vitro* de *Rickettsia parkeri*.** 2015. 97p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

A alimentação artificial representa uma importante ferramenta por possibilitar estudos envolvendo a intrínseca relação vetor- patógeno, além de mimetizar a utilização de hospedeiros naturais. O objetivo do primeiro capítulo foi estabelecer a alimentação artificial da espécie *O. rostratus* por meio de membranas de silicone e avaliar o efeito da dieta nos parâmetros biológicos dos carrapatos alimentados artificialmente. O segundo capítulo teve como finalidade avaliar a eficiência da técnica descrita no primeiro capítulo, para infecção *in vitro* de *R. parkeri* para carrapatos *O. rostratus* e verificar o potencial de transmissão de *R. parkeri* por carrapatos infectados artificialmente quando ninfas para cobaios. O primeiro experimento foi iniciado com 130 ninfas de primeiro instar de *O. rostratus*, individualizadas, para cada grupo experimental. Os grupos foram divididos de acordo com a dieta fornecida, sendo eles, sangue citratado de coelho, sangue citratado de bovino, sangue de bovino com antibiótico e sangue desfibrinado de bovino. O grupo-controle procedeu a alimentação diretamente em coelhos. Os espécimes eram pesados antes e após a alimentação artificial, que era realizada em um aparato confeccionado por membranas de silicone. Para o experimento do segundo capítulo foram utilizadas 42 ninfas de diferentes instares, com pesos homogêneos, divididas em três grupos experimentais. O grupo 1 foi direcionado para a avaliação da técnica de alimentação artificial na infecção *in vitro* de *R. parkeri* para ninfas de *O. rostratus* e o grupo 2 foi utilizado para avaliar a capacidade de transmissão de *Rickettsia parkeri* por *O. rostratus* infectados artificialmente quando ninfas para cobaios. O grupo 3 caracterizou o grupo -controle. Os grupos 1 e 2 foram alimentados artificialmente com sangue de coelho, contendo  $5 \times 10^5$  de células VERO infectadas com *R. parkeri*. Foi realizada a PCR para avaliar a infecção nos carrapatos do grupo 1. A avaliação da transmissão nos cobaios foi realizada por meio da técnica de RIFI e pelos sinais clínicos apresentados pelos hospedeiros. Os resultados do primeiro experimento demonstraram que o aparato alimentar proposto foi eficiente quanto ao estímulo de fixação e satisfatório quanto ao ingurgitamento dos carrapatos, sendo possível a manutenção de colônias de *Ornithodoros rostratus*, utilizando somente alimentação artificial por meio de membranas de silicone. Os carrapatos que receberam sangue citratado de coelho apresentaram parâmetros biológicos semelhantes aos observados em condições de alimentação *in vivo*. O segundo estudo demonstrou que o sistema de alimentação artificial foi capaz de promover a infecção *in vitro* de ninfas do carrapato *O. rostratus* por *R. parkeri*, além de verificar que adultos de *O. rostratus* infectados por *R. parkeri* por meio artificial possuem poder infectante para cobaios.

**Palavras-chave:** Carrapato, Argasidae, Alimentação Artificial e Infecção Experimental.

## ABSTRACT

RIBEIRO, C.C.D.U. **Feeding of *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae) by silicone membranes: biological parameters and infection *in vitro* of *Rickettsia parkeri*.** 2015. 97p. Thesis (Doctor Science of Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

Artificial feeding is an important tool for enabling studies involving the intrinsic relationship vector - pathogen, and mimic the use of natural hosts. The aim of the first chapter was to establish the artificial feeding of the species *O. rostratus* using silicone membranes and evaluate the effect of diet in the biological parameters of the ticks fed artificially. In the second chapter, was to evaluate the efficiency of the technique described in the first chapter in the infection *in vitro* of *R. parkeri* by tick nymphs of *O. rostratus* and verify the potential for transmission of *R. parkeri* by infected tick nymphs to susceptible hosts was verified as well as the possibility of pathogen isolation in culture. The first experiment was initiated with 130 ninfal first instar nymphs of *O. rostratus* individualized for each experimental group. The groups were divided according to the given diet, namely, citrated rabbit blood, citrated bovine blood, bovine blood with antibiotics and defibrinated bovine blood. The control group was fed directly in rabbits. The specimens were weighed before and after artificial feeding, wich was carried out in an apparatus made of silicone membranes. In the second chapter, 42 nymphs in diferent instars were used, with homogeneous weights, divided into three groups. Group 1 was directed to the assessment of the artificial feeding technique in the infection *in vitro* of *R. parkeri* to *O. rostratus* nymphs and group 2 was used to evaluate the transmission capacity of *Rickettsia parkeri* to guinea pigs by artificially infected *O. rostratus* nymphs. Group 3 was the control group. Groups 1 and 2 were artificially fed with rabbit blood containing  $5 \times 10^5$  of VERO cells infected with *R. parkeri*. PCR was performed to assess infection in group 1 ticks. Evaluation of infection in guinea pigs was carried out by the IFA technique, and clinical signs presented by the hosts. The results of the first experiment showed that the proposed feed apparatus was efficient concerning fixation stimulus and satisfactory in engorging ticks, as being possible to maintain colonies of *Ornithodoros rostratus* using artificial feeding only through silicon membrane. Ticks that received citrated rabbit blood showed biological parameters similar to those *in vivo* conditions. The second study demonstrated that the artificial feeding system was able to promote the infection *in vitro* of *R. parkeri* to *O. rostratus* tick nymphs, in addition to verifying that adult *O. rostratus* infected by *R. parkeri* by artificial means is able to infect guinea pigs.

**Keywords:** Tick, Argasidae, Artificial Feeding and Experimental Infection.

## LISTA DE ABREVIACOES E SMBOLOS

% porcentagem  
µL microlitros  
AA alimentação artificial  
B.O.D. "Biological Oxygen Demand" - demanda biolgica de oxignio  
DMEM Dubecco's modified Eagle's medium  
DNA "deoxyribonucleic acid" – cido desoxirribonuclico  
dNTP nucleotdeos trifosfato  
DPA Departamento de Parasitologia Animal  
EDTA "ethylenediaminetetraacetic acid" - ácido etileno diamino tetractico  
et al. *et alli* e colaboradores  
GFM grupo da febre maculosa  
FM febre maculosa  
g grama  
*gltA* gene citrato sintase  
H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> gua destilada  
HBSS solução Balanceada de Hank`s  
IER ndice de eficiência reprodutiva  
IgG Imunoglobulina G  
m metro  
M molar  
mg miligramas  
MgCl<sub>2</sub> cloreto de magnésio  
mL mililitros  
mM milimolar  
NaCl Cloreto de sódio  
ng nanograma  
°C graus Celsius  
PBS phosphate buffered saline  
PCR "polymerase chain reaction" reação em cadeia da polimerase  
pH potencial hidrogeniônico  
q.s.p. quantidade suficiente para  
pb pares de bases  
RIFI reação de imunofluorescência indireta  
SDS dodecil sulfato de sódio  
Taq *Thermus aquaticus*  
TE tampão Tris-EDTA  
UFRRJ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
U.I unidades internacionais  
UR umidade relativa  
x vezes

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO I

**Tabela 1.** Parâmetros biológicos de ninfas de primeiro instar de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle. 49

**Tabela 2.** Parâmetros biológicos de ninfas de segundo instar de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle. 50

**Tabela 3.** Parâmetros biológicos de ninfas de terceiro instar de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle. 51

**Tabela 4.** Parâmetros biológicos de ninfas de quarto instar de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle. 52

**Tabela 5.** Parâmetros biológicos de ninfas de quinto instar de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle. 53

**Tabela 6.** Parâmetros biológicos de ninfas de sexto instar de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle. 54

**Tabela 7.** Parâmetros biológicos de fêmeas de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle. 55

### CAPÍTULO II

**Tabela 8.** Resultado da PCR de ninfas e adultos de *Ornithodoros rostratus* infectados por *Rickettsia parkeri*, por meio da alimentação artificial, após a realização da ecdise ninfal. 76

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

**Figura 1.** Coleta de carrapatos *Ornithodoros rostratus* na Fazenda Nhumirim Pantanal-MS. A) Inspeção visual no solo com auxílio de uma pá de jardinagem; B) Espécime caminhando no terreno após revolvimento do solo; C) Armadilha de CO<sub>2</sub>; D) Carrapato atraído pelo CO<sub>2</sub> na armadilha 37

**Figura 2.** Alimentação de fêmeas de *Ornithodoros rostratus* oriundas do Pantanal –MS em coelhos domésticos. A) Contenção da fêmea por um frasco até o momento da fixação; B) Desprendimento espontâneo e fixação de dois espécimes 38

**Figura 3.** Etapas para a confecção das unidades de alimentação utilizadas para alimentar artificialmente os carrapatos *Ornithodoros rostratus*. 1) Lâmina de microscopia dupla, a ser fixada a membrana de silicone; 2 e 3) Aplicação da cola de silicone, por toda lateral da lâmina; 4 e 5) Disposição da membrana de silicone no aparato de vidro 39

**Figura 4.** Preparação das unidades de alimentação. A) Depósito da fonte sanguínea na célula do aparato de alimentação, com auxílio de agulha e seringa; B) Disposição dos carrapatos contidos por tubos tipo Eppendorf<sup>®</sup> nos aparatos de alimentação 41

**Figura 5.** Alimentação artificial de *Ornithodoros rostratus* utilizando membranas de silicone. A) Fêmeas no momento inicial e final da alimentação; B) Alimentação de ninfas de primeiro instar; C) Observação do abaulamento do idiossoma da fêmea durante a alimentação artificial; D) Fêmeas no momento final da alimentação artificial e liberação do líquido coxal; E e F) Redução da fonte sanguínea pelo consumo dos carrapatos nos aparatos de alimentação 45

**Figura 6.** Gráfico de sobrevivência durante os estágios de vida dos carrapatos *Ornithodoros rostratus* alimentados artificialmente, por meio de membranas de silicone e grupo controle (Coelho- Sangue citratado de coelhos; Bovino- Sangue citratado de bovino; Bovino com Antibiótico - Sangue de bovino com antibiótico; Bovino Desfibrinado- Sangue desfibrinado de bovino; Controle - grupo-controle) 56

**Figura 7.** Ritmo médio de oviposição de fêmeas de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente, por meio de membranas de silicone e grupo-controle (Coelho- Sangue citratado de coelhos; Bovino- Sangue citratado de bovino; Bov. AB - Sangue de bovino com antibiótico; Bov. Desf.- Sangue desfibrinado de bovino; Controle- grupo-controle) 56

### CAPÍTULO II

**Figura 8.** Fluxograma dos procedimentos experimentais 70

**Figura 9.** Alimentação de carrapatos *Ornithodoros rostratus* infectados quando ninfas por *Rickettsia parkeri*, em cobaias e demais procedimentos experimentais. A e B) Alimentação de ninfas de *Ornithodoros rostratus* em cobaias; C) Infestação de larvas pela técnica do saco de pano; D) Aferimento da temperatura retal; E) Coleta de sangue por meio da veia marginal da orelha, com auxílio de tubos capilares 74

**Figura 10.** Gel de agarose 1,5% com padrão de peso, controles negativos (C- 19, 20), positivos (C+18), 14 amostras oriundas da infecção artificial de *Ornithodoros rostratus* por *Rickettsia parkeri* (2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,14,15,16,17) com 13 bandas amplificadas para o gene *gltA* e 2 (8, 13) amostras de carrapatos infectados 76

**Figura 11.** Gel de agarose 1,5% com padrão de peso, controles negativos (C- 19, 20), positivos (C+18), 14 amostras oriundas da infecção artificial de *Ornithodoros rostratus* por *Rickettsia parkeri* (2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,14,15,16,17) com 7 bandas amplificadas para o gene *ompA* e 2 (8, 13) amostras de carrapatos infectados 77

**Figura 12.** Valores da temperatura retal aferida em cobaios infestados com ninfas e adultos de *Ornithodoros rostratus* infectados com *Rickettsia parkeri* na fase ninfal por meio de alimentação artificial 80

**Figura 13.** Valores da temperatura retal aferida em cobaios infestados com larvas de *Ornithodoros rostratus* infectadas com *Rickettsia parkeri* na fase ninfal por meio de alimentação artificial 80

**Figura 14.** A e B) Edema escrotal e ponto de necrose sugerindo reação escrotal em cobaios infestados com ninfas e adultos de *Ornithodoros rostratus* infectados artificialmente por *Rickettsia parkeri* quando ninfas; C) Testículos de cobaio infestado com carrapatos não infectados (controle); D) Lesões semelhantes a escaras típicas de inoculação em cobaios, deixadas no local da fixação do carrapato *Ornithodoros rostratus* infectado 81

## LISTA DE QUADROS

### CAPÍTULO II

**Quadro 1.** Volumes dos reagentes empregados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).71

**Quadro 2.** Protocolo do termociclador, de acordo com o gene alvo utilizado na PCR. 72

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b>	23
<b>CAPÍTULO I</b>	24
<b>Alimentação artificial de <i>Ornithodoros rostratus</i> Aragão, 1911 (Acari: Argasidae) por meio de membranas de silicone</b>	24
<b>RESUMO</b>	25
<b>ABSTRACT</b>	26
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	27
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	28
2.1 O Carrapato <i>Ornithodoros rostratus</i>	28
2.2 Aspectos biológicos de <i>Ornithodoros rostratus</i>	29
2.3 Importância na saúde pública	30
2.4 A técnica de alimentação artificial de carrapatos	31
2.5 Alimentação artificial de carrapatos argasídeos	32
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	36
3.1 Local de execução do experimento	36
3.2 Obtenção dos espécimes e técnicas de coleta empregadas	36
3.3 Obtenção das ninfas em jejum	37
3.4 Procedimentos para avaliar a técnica de alimentação artificial de <i>Ornithodoros rostratus</i> por meio de membranas de silicone	38
3.4.1 Preparação das membranas de silicone	38
3.4.2 Preparação das unidades de alimentação	38
3.4.3.1 Ninfas	40
3.4.3.2 Adultos	40
3.4.4 Amostras de sangue	41
3.5 Procedimentos para avaliar o efeito da dieta nos parâmetros biológicos de <i>Ornithodoros rostratus</i> alimentados artificialmente	41
3.5.1 Grupos experimentais e preparação das amostras de sangue	42



3.5.2 Parâmetros biológicos	42
3.5.2.1 Parâmetros biológicos avaliados em ninfas	42
3.5.2.2 Parâmetros biológicos avaliados em fêmeas	42
3.6 Comitê de ética	43
3.7 Análise estatística	43
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>44</b>
4.1 Avaliação da técnica de alimentação artificial de <i>Ornithodoros rostratus</i> por meio de membranas de silicone	44
4.2 Avaliação do efeito da dieta nos parâmetros biológicos de <i>Ornithodoros rostratus</i> alimentados artificialmente	45
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>56</b>
<b>CAPÍTULO II</b>	<b>58</b>
<b>Infecção <i>in vitro</i> de <i>Rickettsia parkeri</i> (Rickettsiales:Rickettsiaceae) em <i>Ornithodoros rostratus</i> Aragão, 1911, por meio de alimentação artificial em membranas de silicone</b>	<b>58</b>
<b>RESUMO</b>	<b>59</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>60</b>
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>61</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>62</b>
2.1 O Gênero <i>Rickettsia</i>	62
2.1.1 <i>Rickettsia parkeri</i>	63
2.2 Relação <i>Rickettsia</i> - Argasídeos	64
2.3 Infecção por meio da alimentação artificial de agentes da família Rickettsiaceae	65
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>67</b>
3.1 Local de execução do experimento	67
3.2 Obtenção do inóculo de <i>Rickettsia parkeri</i>	67
3.3 Manutenção do isolado de <i>Rickettsia parkeri</i>	67
3.4 Manutenção dos animais	67

3.4.1 Coelhos	67
3.4.2 Cobaios	67
3.5 Manutenção da colônia de <i>Ornithodoros rostratus</i>	68
3.6 Grupos Experimentais	68
3.7 Procedimentos experimentais	68
3.8.1 Detecção de DNA de <i>Rickettsia parkeri</i> nos carrapatos infectados	71
3.9 Procedimentos para avaliar a transmissão de <i>Rickettsia parkeri</i> pelo carrapato <i>Ornithodoros rostratus</i> , infectado artificialmente, para cobaios	72
3.9.1 Infestação em cobaios	72
3.9.2 Sinais clínicos	72
3.9.3 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	72
3.10 Comitê de ética	73
3.11 Análise estatística	73
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>75</b>
4.1 Avaliação da infecção <i>in vitro</i> de <i>Rickettsia parkeri</i> para ninfas de <i>Ornithodoros rostratus</i>	75
4.1.1 Detecção de DNA de <i>Rickettsia parkeri</i> nos carrapatos infectados	75
4.2 Avaliação da transmissão de <i>Rickettsia parkeri</i> pelo carrapato <i>Ornithodoros rostratus</i> , infectado artificialmente, para cobaios	77
4.2.1 Infestação e sinais clínicos em cobaios	77
4.2.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)	78
<b>5 CONCLUSÕES</b>	<b>82</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>83</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>96</b>
Anexo 1. Extração de DNA de Carrapatos (Fenol/Fenol-clorofórmio)	96

## INTRODUÇÃO GERAL

A literatura atual registra, aproximadamente, 900 espécies de carrapatos, classificados em três famílias, Nutalliellidae, Ixodidae e Argasidae, agrupadas na subordem Ixodida (BARROS-BATTESTI et al., 2006). Esses artrópodes são obrigatoriamente parasitas, capazes de transmitir uma diversidade de agentes patogênicos para humanos e animais. Apenas os mosquitos hematófagos são capazes de superar a variedade de patógenos transmitidos pelos carrapatos (DE LA FUENTE et al., 2007; LIU; BONNET, 2014).

Diversos estudos têm sido conduzidos com intuito de aumentar o conhecimento existente e elucidar questões inerentes à relação entre patógenos e seus vetores. No entanto, observamos que ainda existem lacunas decorrentes da carência de informações sobre a biologia, comportamento e competência vetorial de algumas espécies de carrapatos. Desse modo, a utilização de ferramentas alternativas que possam fornecer maior compreensão desses mecanismos em condições controladas podem se tornar particularmente úteis.

A espécie *Ornithodoros rostratus* foi escolhida para compor o trabalho por apresentar um processo de alimentação acelerado e ser considerada como possível vetor de *Rickettsia rickettsii*, agente causador da febre maculosa em humanos (HOOGSTRAAL, 1985). Enquanto a bactéria *R. parkeri* constituiu-se em um modelo de estudo de baixa patogenicidade, garantindo maior segurança na condução dos experimentos.

O carrapato *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911 é uma espécie de carrapato argasídeo com distribuição na América do Sul, apresenta baixa especificidade parasitária e possui relatos de parasitismo em humanos (RIBEIRO et al., 2013).

A bactéria *Rickettsia parkeri* é uma espécie pertencente ao Grupo da Febre Maculosa isolada, primeiramente, em carrapatos da espécie *Amblyomma maculatum* Koch, 1844. Este patógeno causa em cobaios sintomas semelhantes à *Rickettsia rickettsii*, porém brandos e sem mortalidade (PARKER et al., 1939).

A presente tese foi desenvolvida em dois capítulos. O objetivo do primeiro capítulo foi estabelecer a alimentação artificial da espécie *O. rostratus* por meio de membranas de silicone e avaliar o efeito da dieta nos parâmetros biológicos dos carrapatos alimentados artificialmente. O segundo capítulo teve como finalidade avaliar a eficiência da técnica descrita no primeiro capítulo para infecção *in vitro* de *R. parkeri* para carrapatos *O. rostratus* e verificar o potencial de transmissão de *R. parkeri* por *O. rostratus*, infectados artificialmente quando ninfas, para cobaios.

## **CAPÍTULO I**

### **ALIMENTAÇÃO ARTIFICIAL DE *Ornithodoros rostratus* ARAGÃO, 1911 (Acari: Argasidae) POR MEIO DE MEMBRANAS DE SILICONE**

## RESUMO

RIBEIRO, C.C.D.U. **Alimentação artificial de *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911 (Acari: Argasidae) por meio de membranas de silicone.** 2015. 97p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O objetivo do primeiro capítulo foi estabelecer a alimentação artificial da espécie *O. rostratus* por meio de membranas de silicone e avaliar o efeito da dieta nos parâmetros biológicos dos carrapatos alimentados artificialmente. As unidades de alimentação foram confeccionadas por lâminas duplas de microscopia, que tiveram suas bordas preenchidas por uma camada de cola de silicone, de modo a deixar uma célula em seu interior. No momento da alimentação, essas unidades eram preenchidas com auxílio de agulha e seringa, com sangue previamente aquecido à temperatura de 37,5 °C. O experimento foi iniciado com 130 ninfas de primeiro instar de *O. rostratus*, individualizadas para cada grupo experimental. Os grupos foram divididos de acordo com a dieta fornecida, sendo eles, sangue citratado de coelho e citratado de bovino, sangue de bovino com antibiótico e sangue desfibrinado de bovino. O grupo-controle foi alimentado diretamente em hospedeiros experimentais. Os carrapatos seguiram alimentando-se de acordo com o grupo experimental até atingirem a etapa de adultos. Durante o experimento, todos os carrapatos foram ingurgitados somente por meio da alimentação artificial, não sendo necessário ingurgitamento parcial em qualquer hospedeiro. Os espécimes em jejum eram pesados em balança analítica e colocados em contato com as membranas de silicone repleta com o sangue disponibilizado de acordo com cada grupo. Após o período alimentar, era aferido o peso novamente para avaliar a diferença antes e após a alimentação, o que conferia o ganho de peso dos carrapatos. Todos os grupos apresentaram diferenças estatísticas nas médias dos pesos das ninfas e fêmeas aferidos antes e após as alimentações ( $p < 0,05$ ). A utilização de sangue citratado de coelhos elevou o desempenho nos parâmetros relacionados ao ganho de peso a partir de ninfas de segundo instar, sendo estatisticamente semelhante ( $p > 0,05$ ) ao grupo-controle. No grupo de ninfas alimentadas com sangue citratado de bovino ocorreram 213 (N1-N6) mudas ninfais, sangue bovino com antibiótico 220 (N1-N6) e sangue bovino desfibrinado 312 (N1-N6). O grupo alimentado com sangue de coelhos apresentou um maior número de ecdises ninfais, quando comparado ao grupo-controle, 394 e 377 (N1-N6), respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas quanto ao ganho de peso nos grupos de fêmeas que receberam diferentes dietas ( $p > 0,05$ ). Os resultados demonstraram que o aparato alimentar proposto foi eficiente quanto ao estímulo de fixação e satisfatório quanto ao ingurgitamento dos carrapatos, sendo possível a manutenção de colônias de *Ornithodoros rostratus*, utilizando somente alimentação artificial por meio de membranas de silicone. Os carrapatos que receberam sangue citratado de coelho apresentaram parâmetros biológicos semelhantes aos observados em condições de alimentação *in vivo*.

**Palavras-chave:** Carrapato, Argasídeo, Alimentação *in vitro*, Sangue de Coelhos e Sangue de Bovinos.

## ABSTRACT

RIBEIRO, C.C.D.U. **Artificial feeding of *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911 (Acari: Argasidae) by silicone membranes.** 2015. 97p. Thesis (Doctor Science of Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

The aim of the first chapter was to establish the artificial feeding of the species *O. rostratus* by silicone membranes and evaluate the effect of diet in the biological parameters of the ticks fed artificially. The feeding units were made by double microscope glass slides which had their edges filled with a silicone adhesive layer, creating a cell inside. At feeding time, these units were filled with the aid of needle and syringe with blood previously heated to 37.5 ° C. The experiment was initiated with 130 ninfal first instars of *O. rostratus* individualized for each experimental group. The groups were divided according to the given diet, namely, blood citrated rabbit and citrated bovine, bovine blood with antibiotics and defibrinated bovine blood. The control group was fed directly on experimental hosts. Ticks remained feeding according to the experimental group until they reach the adult stage. During the experiment, all ticks were engorged only through artificial feeding, partial engorgement on any host was not necessary. The unfed specimens were weighed on an analytical balance and placed in contact with the silicone membrane filled with blood according to each group. After the feeding period, the weight was measured again to evaluate the difference before and after feeding, which gave the tick weight gain. All groups showed statistically significant differences in the weight average of nymphs and females measured before and after feeding ( $p < 0.05$ ). The group fed on citrated rabbit blood had performance in parameters related to weight gain from second instar nymphs, being statistically similar ( $p > 0.05$ ) to the control group. In the group of nymphs fed with bovine citrated blood occurred 213 (N1-N6) nymphal moults, bovine blood with antibiotic 220 (N1-N6) and bovine blood defibrinated 312 (N1-N6). The group fed with the blood of rabbits showed a greater number of nymphal moults, when compared to the control group, 394 and 377 (N1-N6), respectively. No significant differences were observed for weight gain in groups of females fed different diets ( $p > 0.05$ ). The results showed that the proposed feed apparatus was efficient concerning fixation stimulus and satisfactory in engorging ticks, as being possible to maintain colonies of *Ornithodoros rostratus* using artificial feeding only through silicon membrane. Ticks that received citrated rabbit blood showed biological parameters similar to those *in vivo* conditions.

**Keywords:** Tick, Argasidae, *In vitro* Feeding, Rabbit Blood and Bovine Blood.

## 1 INTRODUÇÃO

Até 2009, estavam descritas no Brasil 61 espécies de carrapatos pertencentes a oito gêneros, dentre eles *Argas*, *Antricola*, *Ornithodoros*, *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Ixodes* e *Rhipicephalus* (DANTAS-TORRES et al., 2009). Nos últimos cinco anos, quatro novas espécies foram inseridas na fauna brasileira de carrapatos, destacando-se um novo gênero, aumentando este número para 65 espécies endêmicas ou estabelecidas (MARTINS et al., 2014).

*Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911 é uma espécie de argasídeo com uma distribuição na América do Sul, registrada no Brasil, Bolívia, Argentina e Paraguai. Apresenta baixa especificidade parasitária, podendo acometer desde mamíferos, incluindo humanos, até répteis e aves. A espécie em questão foi considerada como possível vetor de *Rickettsia rickettsii*, agente causador da Febre Maculosa em humanos (HOOGSTRAAL, 1985), porém esse mecanismo ainda carece de maiores estudos. Dessa forma, o desenvolvimento de metodologias que possam ajudar a suprir lacunas pertinentes a relação vetor-patógeno, se torna de extrema importância no âmbito da parasitologia.

As técnicas que possibilitam a alimentação artificial de carrapatos vêm sendo estudadas com a finalidade de mimetizar a alimentação em um hospedeiro natural (DE LA VEGA et al., 2004). Aliado a este fato, é observado que o estabelecimento de colônias de carrapatos em laboratório, muitas vezes, é dificultado pela não adaptação desses artrópodes a hospedeiros alternativos e pelo custo elevado com a manutenção desses animais (RANGEL et al., 2008; KROBER; GUERIN, 2007), além de envolver questões éticas geradas pelo uso de animais em experimentos científicos. Assim, no caso de sucesso, a alimentação artificial pode apresentar algumas vantagens sobre os métodos tradicionais, propiciando a manutenção de carrapatos com custos baixos, sem a utilização de hospedeiros experimentais, e ainda permitir estudos envolvendo a intrínseca relação vetor-patógeno.

O presente estudo teve como objetivo estabelecer a alimentação da espécie *O. rostratus* por meio de membranas de silicone e avaliar o efeito da dieta nos parâmetros biológicos dos carrapatos alimentados artificialmente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Carrapato *Ornithodoros rostratus*

A família Argasidae apresenta muitas divergências quanto a sua sistemática, exemplos incluem Clifford et al. (1964), Filippova (1966), Pospelova-Shtrom (1969), Camicas e Morel (1977), Hoogstraal (1985), Klompen e Oliver (1993), Camicas et al. (1998) e Keirans (2009). Guglielmone et al. (2010) foram os mais recentes a contribuir com esse esclarecimento, publicando a última lista de nomes de espécies válidas de carrapatos do mundo.

Atualmente, a fauna de carrapatos argasídeos está composta por aproximadamente 200 espécies. Dentre essas, 87 se encontram estabelecidas na região Neotropical, distribuídas em cinco gêneros *Antricola* (17 espécies), *Argas* (12 espécies), *Ornithodoros* (55 espécies), *Nothoaspis* (2 espécies) e *Otobius* (1 espécie) (BARROS-BATTESTI et al., 2013).

No Brasil, foram registradas 65 espécies de argasídeos. Dessas, quatro foram recentemente descritas, sendo *Ornithodoros fonsecai* (LABRUNA; VENZAL, 2009), *Nothoaspis amazoniensis* (NAVA et al., 2010), *Ornithodoros cavernicolous* (DANTAS-TORRES et al., 2012) e *Ornithodoros kohlsi* (MARTINS et al., 2014). Porém, muitas dessas espécies registradas não possuem estudos detalhados acerca do ciclo de vida e possíveis agentes transmitidos, com exceção de algumas espécies como *Ornithodoros talage* Guérin-Méneville 1849 (SCHUMAKER; BARROS, 1995), *Ornithodoros mimom* Kohls, Clifford, Jones 1969 (LANDULFO et al., 2012) e *Ornithodoros rostratus* Aragão 1911 (RIBEIRO et al., 2013).

*Ornithodoros rostratus* foi primeiramente descrito por Aragão no ano de 1911. Sua descrição foi baseada em machos e fêmeas recolhidos às margens do Rio Guaporé, no estado do Mato Grosso. Posteriormente, uma segunda coleção de ninfas, procedentes de Indya no estado de Goiás, foi enviada ao mesmo autor para descrição do estágio imaturo da espécie (ARAGÃO, 1916). Este carrapato é considerado uma espécie silvestre de tamanho considerável, e fêmeas ingurgitadas chegam a pesar 450 mg (ARAGÃO, 1936; GUIMARÃES et al., 2001).

A espécie é popularmente conhecida como “carrapato de chão”, “brancão” e “borrachudo”, permanece a maior parte de seu ciclo de vida no solo, e só busca seus hospedeiros para se alimentar. É frequentemente encontrada em tocas de animais silvestres ou grutas por eles frequentadas, porém se adapta facilmente a habitações humanas, construções primitivas, ranchos e locais onde são encontrados animais domésticos e de produção (FLECHTMANN, 1973).

O parasitismo por *O. rostratus* provoca intensa dor e prurido, resultando em infecções bacterianas secundárias. Em humanos tem preferência pela região das pernas (ARAGÃO, 1931; 1936; GUIMARÃES et al., 2001; CANÇADO, 2008). Em alguns animais o parasitismo resulta em lesões equimóticas que permanecem por alguns dias. Infestações em massa chegam a determinar a morte de animais de pequeno porte, principalmente leitões (FLECHTMANN, 1973). Recentemente, esta espécie foi reportada promovendo paralisia em cães no Pantanal do Mato Grosso do Sul (RIBEIRO et al. 2013).

A distribuição geográfica da espécie *O. rostratus* se estende por alguns países da América do sul, e já foi assinalada no Brasil, Bolívia, Argentina e Paraguai. Na Bolívia, é encontrada na região de fronteira com o Brasil e no Chaco Boliviano (ARAGÃO, 1936), uma região de planície arborizada que muito se assemelha à paisagem pantaneira. No Brasil, inicialmente foi encontrado na região central, como Mato Grosso e Goiás, posteriormente foi verificada sua presença na região sudeste, nos estados de São Paulo e Minas Gerais (ARAGÃO, 1931, 1936; BARROS-BATTESTI et al., 2006). Desde 2008, vem sendo



reportado na região da Nhecolândia, Pantanal do Mato Grosso do Sul (CANÇADO et al., 2008; ALMEIDA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2013).

Sua baixa especificidade parasitária determina uma diversidade de espécies utilizadas como hospedeiros. Foi relatado o parasitismo em coelhos, cães, ratos, cobaias, macacos, camundongos, saguis, onças, equinos, bovinos, porcos selvagens e domésticos e aves, além de frequentes relatos em humanos (ARAGÃO, 1931; 1936; GUIMARÃES et al., 2001; NAVA et al. 2007; CANÇADO, 2008; ALMEIDA et al., 2012).

Relatos do seu parasitismo em animais de produção são amplamente descritos na literatura, principalmente em suínos. Pardi e Rocha (1953) descreveram a incidência crescente de lesões na pele dos suínos de abatedouro no estado de São Paulo, semelhantes à peste suína clássica, que eram promovidas por esta espécie.

Na província de Formosa - Argentina, Mancebo et al. (2002) observaram a dispersão de *O. rostratus* em uma grande área de produção caprina, e constataram que o parasitismo ocasionado por esse carrapato era considerado um limitante para a economia local.

## 2.2 Aspectos biológicos de *Ornithodoros rostratus*

Em linhas gerais, o ciclo biológico dos carrapatos argasídeos apresenta-se em fases de ovo, larva, alguns instares ninfais e adultos (machos e fêmeas). Geralmente, possuem alimentação rápida, apresentando uma fase parasitária curta. Os carrapatos desta família apresentam evidente heterogeneidade nos seus padrões de desenvolvimento e comportamento alimentar, de encontro com os padrões observados na família Ixodidae.

Os argasídeos do gênero *Ornithodoros* são agrupados em três classes de acordo com o padrão de alimentação larval: (1) larvas que realizam muda para N1 sem alimentação (ex. *Ornithodoros savignyi* Audouin, 1827 (KHAN; SRIVASTAVA, 1988) e *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, 1923) (BARROS-BATTESTI et al., 2012.); (2) larvas que realizam seu repasto por alguns minutos a dias (ex. *O. rostratus* e *Ornithodoros turicata* Dugès, 1876) (BECK et al., 1986); e (3) larvas que alimentam-se lentamente durante vários dias, como das espécies que parasitam morcegos e aves (ex. *Ornithodoros mimon* Kohls, Clifford; Jones, 1969) (LANDULFO et al., 2012).

A família Argasidae é conhecida por apresentar grande longevidade na fase de adultos, com relatos de sobrevivência de até 25 anos. Essa característica pode estar ligada a um fenômeno conhecido como diapausa, um fator importante que regula o tempo de desenvolvimento de muitas das espécies de argasídeos, que necessitam sobreviver por períodos de vários meses, até o encontro com possíveis hospedeiros. Esse encontro ainda é prejudicado pela pouca atividade com a qual essa família procura por seus hospedeiros, percorrendo distâncias muito pequenas, tornando essa incidência muitas vezes casual (SONESHINE, 1993).

Na família Argasidae, os adultos tornam-se sexualmente ativos após a última muda ninfal. O acasalamento geralmente ocorre após o repasto sanguíneo, encontrando padrões raros de acasalamento sobre o hospedeiro. O ciclo gonotrófico é completamente dependente da alimentação, exceto em casos raros. As fêmeas desta família produzem poucos ovos e realizam mais de uma postura em seu ciclo de vida, permitindo dispersarem seus descendentes gradualmente ao longo do tempo (BALASHOV, 1972; SONESHINE, 1991). Esse fato, possivelmente representa um mecanismo de adaptação à escassez de hospedeiros ou variabilidade climática (VIAL, 2009).

Aeschlimann e Grandjean (1973) avaliaram a relação entre o acasalamento e oviposição de *Ornithodoros moubata*, e asseguraram que o número de acasalamentos não

influencia na fecundidade das fêmeas, sendo necessário apenas um único acasalamento para assegurar a fertilidade em todos os seus ciclos reprodutivos.

Dados sobre o ciclo biológico de *O. rostratus* se limitam a Brumpt (1915), Guglielmone e Hadani (1980), Venzal e Estrada- Peña (2006) e mais recentemente Ribeiro et al. (2013).

Brumpt (1915) foi o primeiro a publicar dados sobre a biologia de *O. rostratus*. O autor utilizou como hospedeiros experimentais cães (*Canis familiaris*) e aves domésticas (*Gallus gallus*) para avaliar a fase de vida livre e parasitária dessa espécie. Segundo o autor, as larvas só começaram o desprendimento a partir do segundo dia de alimentação, seguindo até o oitavo. Os instares ninfais variaram de 3-5, observando o surgimento de adultos a partir de ninfas de quarto instar.

Guglielmone e Hadani (1980) reproduziram em laboratório o ciclo biológico de *O. rostratus*, de forma sucinta, a partir de ninfas coletadas do ambiente. Foram utilizados cobaios (*Cavia porcellus*) como hospedeiros experimentais do estudo. O tempo de alimentação larval variou de 24 - 72 horas, enquanto nos instares ninfais esse tempo não ultrapassou 2 horas. Na alimentação de larvas foi verificado que 33% das larvas colocadas se desprenderam em até 24 horas e aproximadamente 20% das larvas não completaram o processo de ingurgitamento. A recuperação de adultos ocorreu a partir da muda de ninfas de terceiro e quarto instares ninfais.

Venzal e Estrada-Peña (2006) verificaram o desempenho de larvas de *Ornithodoros puertoricensis* Fox, 1947 e *O. rostratus* utilizando répteis (Gekkonidae) como hospedeiros experimentais, no intuito de fornecer comparações entre mamíferos, quanto às características alimentares desses carrapatos. Os autores observaram que a média do período alimentar de larvas de *O. rostratus* em coelhos foi de 2,9 dias, enquanto que alimentadas em répteis essa média subiu para 4,9 dias, com uma taxa de alimentação de 20%. Este trabalho sugeriu que larvas de *O. rostratus* são aptas a se alimentarem em geconídeos.

Ribeiro et al. (2013) descreveram o ciclo completo da espécie, utilizando coelhos como hospedeiros experimentais. Os autores levaram em consideração todos os parâmetros da fase parasitária e de vida livre da espécie. Neste trabalho foi descrita a recuperação de 53% de larvas em um período de alimentação que durava em média 39 minutos. De um total de 253 ninfas ingurgitadas (N1-N5), 192 (75,9%) mudaram para o estágio seguinte. Os autores descreveram um instar ninfal adicional, porém sugeriram cinco instares ninfais como regra no ciclo de vida de *O. rostratus*. A necessidade de um segundo repasto foi observada para a muda de algumas ninfas. A colônia de laboratório originou 36 adultos, iniciando a muda para machos a partir do terceiro instar, porém a primeira fêmea só foi possível a partir de ninfas de quinto instar. A razão sexual encontrada foi de 1:1. O acasalamento foi observado fora do hospedeiro com machos não alimentados. O período de oviposição durou em média 14 dias.

### **2.3 Importância na saúde pública**

A maioria das doenças emergentes surge de patógenos zoonóticos e muitos deles transmitidos por artrópodes. Os mosquitos são os maiores vetores de patógenos para humanos, enquanto os carrapatos são os maiores transmissores para os animais. Porém, eles se encontram em segundo lugar quanto à diversidade de patógenos transmitidos a humanos (DE LA FUENTE et al., 2007).

Em humanos, o parasitismo pelo carrapato está relacionado a determinadas espécies, que podem causar condições tóxicas severas, tais como paralisias, toxicoses, irritações e alergias. Além disso, sua capacidade de transmitir uma grande variedade de doenças é considerada um importante problema de saúde pública (ESTRADA-PEÑA; JONGEJAN, 1999). Em relação aos agentes patogênicos transmitidos por carrapatos argasídeos, podemos

destacar vírus e bactérias, tendo destaque borrélias. Manzano-Román et al. (2012) citaram em seu estudo 18 espécies de carrapatos da família Argasidae transmitindo diferentes espécies de borrélias e podendo causar doença em humanos.

Segundo Estrada-Peña e Jongejan (1999), o gênero *Ornithodoros* possui uma distribuição representativa de espécies que parasitam humanos. No total, 22 espécies foram citadas parasitando humanos, e 12 são encontradas frequentemente.

Aproximadamente, nove espécies no mundo apresentam considerável importância na transmissão de agentes patogênicos para humanos: *Ornithodoros asperus* Warburton, 1918 (*Borrelia caucasica*), *Ornithodoros capensis* Neumann, 1907 (vírus Hughes group), *Ornithodoros coreaceus* Koch, 1844 (*Borrelia coraciae*), *Ornithodoros erraticus* Lucas, 1849 (*Borrelia crocidurae*, *Borrelia hispanica*), *Ornithodoros hermsi* Wheeler, Herms & Meyer, 1935 (*Borrelia hermesi*), *Ornithodoros maritimus* Vermeil & Marguet, 1967 (Vírus Hughes group), *Ornithodoros moubata* Murray, 1877 (*Borrelia duttoni*), *Ornithodoros tartakovsky* Olenov, 1931 (*Borrelia latyschevi*) e *Ornithodoros turicata* (*Borrelia turicatae*).

A primeira descrição do parasitismo de *O. rostratus* em humanos foi relatada em Aragão (1916). Posteriormente, esses relatos foram verificados em Caçado (2008).

Estudos primários foram realizados envolvendo a inoculação de diversos agentes em *O. rostratus*, como *Treponema gallinarum*, *Tripanosoma cruzi* e o vírus da febre amarela, porém não foi observada evolução nas transmissões (ARAGÃO, 1916; ARAGÃO, 1931). Posteriormente, Lemos-Monteiro et al. (1932 a,b) avaliaram a transmissão do agente etiológico do Typho Exanthematico por *O. rostratus* e *Amblyomma cajennense* Fabricius, 1787, que em seguida foi identificado como *Rickettsia rickettsii* (Wolbach 1919). Os autores observaram que *Ornithodoros rostratus* e *Amblyomma cajennense* foram susceptíveis à infecção quando alimentados em cobaias em fase infectante. Segundo Hoogstraal (1985), a espécie em questão pode ser considerada como possível vetor de *Rickettsia rickettsii*, agente causador da febre maculosa em humanos.

Almeida et al. (2009) averiguaram a ocorrência de *Rickettsia* spp., *Borrelia* spp. e agentes da família Anaplasmataceae em *O. rostratus* coletados no Pantanal sul-mato-grossense pela técnica da PCR. Os autores verificaram que os carrapatos eram negativos para *Rickettsia* spp. Desses carrapatos, quatro ninfas foram positivas para agentes da família Anaplasmataceae e cinco positivas para *Borrelia* spp., em adultos nenhuma positividade foi verificada.

Recentemente, Almeida et al. (2012) examinaram por meio de detecção molecular, carrapatos adultos, ninfas e ovos de *O. rostratus* da região do Pantanal, e verificaram que todos os carrapatos testados (100%) produziram produtos da PCR para três genes de *Coxiella*, contudo os autores acreditam que essa bactéria possa ser um endossimbionte da espécie analisada.

## 2.4 A técnica de alimentação artificial de carrapatos

O uso de técnicas de alimentação *in vitro* para a manutenção e criação de carrapatos tem grandes vantagens em termos de comodidade, produtividade e despesa financeira, e sugerem uma ótima alternativa aos procedimentos *in vivo* (SCHWAN et al., 1991). Além disso, a utilização da alimentação artificial é uma ferramenta importante para o ensaio de susceptibilidade e resistência aos acaricidas, estudo de substâncias biologicamente ativas secretadas pela saliva do carrapato, isolamento de agentes patogênicos, avaliação da eficiência na capacidade vetorial na transmissão de agentes, e também reduz substancialmente a utilização de animais em diversos tipos de pesquisa (KRÖBER; GUERIN, 2007; TAJERI; RAZMI, 2011). Desse modo, a crescente demanda para a produção de um grande número de

carrapatos em idades sincronizados, para a realização dos diversos estudos, requer o desenvolvimento de métodos eficazes e padronizados para alimentar artificialmente diferentes espécies de carrapatos (SCHWAN et al., 1991).

No entanto, a utilização desses sistemas ainda apresenta certas limitações devido a diversos fatores relacionados ao complexo ciclo de vida dos carrapatos. Para Bonnet e Liu (2012), por apresentar um longo período de alimentação (3-12 dias), a família Ixodidae possui a biologia alimentar mais complexa de todos os artrópodes hematófagos, acarretando, dessa forma, limitação à capacidade dos sistemas de alimentação artificial.

Diversos sistemas de alimentação artificial para carrapatos são encontrados na literatura, incluindo a utilização de membranas naturais ou sintéticas, tubos capilares e recentemente, ponteiras plásticas. O primeiro relato de alimentação por meio de membrana natural foi descrito em 1912 por Hindle e Merriman, para as espécies *Argas persicus* Oken, 1818, *Ornithodoros moubata* e *Hyalomma aegyptium* Linnaeus, 1758, às quais foram submetidas a esse sistema após a retirada do órgão de Haller, no intuito de verificar a possibilidade de alimentação com diferentes fontes sanguíneas, sem a presença deste órgão. Posteriormente, a técnica utilizando os tubos capilares foi descrita por Chabaud (1950), consistindo no posicionamento de tubos capilares sobre o aparelho bucal dos carrapatos. Esta técnica foi recentemente aperfeiçoada por Rangel (2011), com a substituição dos tubos capilares por ponteiras plásticas, o que permitiu a ingestão contínua de sangue, sem que fosse necessário realizar trocas constantes do aparato de alimentação.

Tajeri e Razmi (2011) destacaram os principais trabalhos no mundo envolvendo alimentação artificial de ixodídeos por meio de membranas (*Rhipicephalus microplus* Canestrini, 1888 (KEMP et al., 1975), *Dermacentor andersoni* Stiles, 1908 (PAINE et al., 1983), *D. nuttalli* Olenov, 1928 (HABEDANK et al., 1994), *Amblyomma hebraeum* Koch, 1844 (KUHNERT et al., 1995), *A. variegatum* Fabricius, 1794 (VOIGT et al., 1993; YOUNG et al., 1996.; BARRE et al., 1998), *Hyalomma anatolicum* Koch, 1844 (HABEDANK et al., 1994) *Ixodes holocyclus* Neumann, 1899 (STONE et al., 1983), e *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann, 1901 (WALADDE et al., 1991, 1993, MUSYOKI et al., 2004)) e por meio de tubos capilares (*Rhipicephalus microplus* (DE LA VEGA et al., 2000), *Ixodes scapularis* Say, 1821 (KORSHUS et al., 2004;. SOARES et al., 2005; BROADWATER et al., 2009), *I. ricinus* Linnaeus, 1758, *I. hexagonus* Leach, 1815 (BOUWKNEGT et al., 2010), *Rhipicephalus appendiculatus* (PURNELL; JOYNER, 1967), *R. bursa* Canastrini & Fanzago, 1878 (BOUWKNEGT et al., 2010), *Dermacentor reticulatus* Fabricius, 1794 (BOUWKNEGT et al., 2010) e *D. variabilis* Say, 1821 (KOCAN et al., 2005).

No Brasil, diversos estudos relacionados à alimentação artificial de carrapatos foram conduzidos, envolvendo as principais espécies de interesse econômico: *Argas miniatus* Koch, 1844, *Amblyomma cajennense*, *Dermacentor nitens* Neumann, 1897, *Rhipicephalus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* Latreille, 1806, utilizando tubos capilares (ABEL, 2004; RANGEL, 2008; RANGEL et al., 2008; SAKAI, 2010), membranas de silicone (MOURA et al., 1997; FONSECA et al., 1999) e ponteiras plásticas (RANGEL, 2011; VALIM, 2014; RIBEIRO et al., 2014). Em geral, todas as espécies de carrapatos estudadas foram capazes de se alimentar sem ocasionar efeito deletério a sua biologia. Na grande maioria dos estudos foram utilizados espécimes parcialmente alimentados, submetidos a este tipo de alimentação de 12-36 horas.

## 2.5 Alimentação artificial de carrapatos argasídeos

A alimentação artificial dos carrapatos argasídeos se torna mais simples em comparação aos ixodídeos, pela necessidade de menor tempo de fixação e por um conjunto de reações de menor intensidade para a realização de seu repasto sanguíneo (BROWN, 1989).

Este considerável investimento por parte dos carrapatos é precedido por uma cascata de fenômenos, definida pelo comportamento para a aceitação de um hospedeiro apropriado e para a fixação em um local para alimentação (KUHNERT, 1995).

A conexão do carrapato ao hospedeiro depende da presença adequada de uma variedade de estímulos químicos e físicos que instigam o carrapato a se alimentar (BONNET; LIU, 2012). Com isso, um sistema de alimentação ideal deve incluir métodos que sejam capazes de estimular a alimentação, além de possuir um fornecimento de nutrientes adequados (KRÖBER; GUERIN, 2007). Bonnet e Liu (2012) mencionaram que os estímulos olfativos são indispensáveis no caso das membranas de origem sintéticas, podendo diferir de acordo com a espécie de carrapato estudada. A atmosfera de dióxido de carbono (entre 5 e 10% de CO<sub>2</sub>) também tem sido observada em alguns estudos envolvendo alimentação artificial como estimulante do carrapato a alimentação (VOIGT et al, 1993). Nesse contexto, resíduos de animais como pelos, extratos de peles e fezes de carrapatos, têm formulado misturas fago estimulantes para a fixação dos carrapatos nos sistemas de alimentação.

A utilização da alimentação artificial para argasídeos dos gêneros *Argas* spp. e *Ornithodoros* spp. vem sendo amplamente descrita na literatura ( BUTLER et al., 1984; OSBORNE; MELLOR, 1985; OSBORNE; MELLOR, 1986; WIRTZ; BARTHOLD, 1986; HOKAMA et al. 1987; KIRCH et al., 1991; SCHWAN et al.,1991; ABBASSY et al., 1994; FONSECA et al. 1999; RUHETA et al., 2005; MC COY at al., 2010), por meio de membranas de origem animal, membranas artificiais a base de silicone e/ou Parafilm<sup>®</sup> e por meio de tubos capilares.

As membranas de origem animal foram a princípio amplamente utilizadas para alimentação de carrapatos argasídeos, porém, em sua maioria, são de difícil obtenção, manuseio e muitas vezes inadequadas, quanto às condições assépticas. Observamos na literatura trabalhos que relataram a manutenção dessas espécies em membranas confeccionadas a partir de intestinos de mamíferos, asas de morcegos e membranas de ovos de aves (THARSIS, 1958). Dessa maneira, as membranas sintéticas, principalmente à base de silicone, foram bem aceitas pelo fato de serem autoclaváveis, duráveis, imperecíveis e elásticas, podendo se adequar a diferentes aparatos de alimentação. Porém, essas ainda encontram dificuldades inerentes ao estabelecimento de protocolos alternativos, que dependem, essencialmente, da adequação da textura e espessura das membranas, da temperatura e umidade relativa do ar nos sistemas de alimentação, das dietas utilizadas, do controle de bactérias e fungos e dos fago estimulantes (RANGEL, 2011).

Hokama et al. (1987) testaram a eficiência da técnica de alimentação artificial por meio de membranas de Parafilm<sup>®</sup> para ninfas e adultos de *Ornithodoros coriaceus*. Os carrapatos obtiveram um excelente ingurgitamento (87-90%) e os ovos resultantes das fêmeas alimentadas artificialmente foram totalmente viáveis.

Schwan et al. (1991) desenvolveram uma técnica de manutenção artificial para ninfas e adultos de *Ornithodoros moubata*, utilizando um sistema de alimentação vedado com uma folha de Parafilm<sup>®</sup> sobre sangue citratado de bovino. O sistema foi projetado com uma capacidade de alimentar 2.000 ninfas ou até 200 adultos de uma só vez. As taxas de alimentação variaram entre 80 - 100%. A subsequente produção de ovos das fêmeas foi notavelmente alta, produzindo uma média de 210 ovos por carrapato, com uma taxa de eclosão de 96,72%. Além disso, foram avaliados os efeitos na capacidade reprodutiva de fêmeas, quando utilizado neste sistema diferentes dietas, sendo elas: sangue heparinizado e congelado bovino, sangue heparinizado de bovino, sangue de ratos e sangue desfibrinado de ovinos. Para este estudo foram encontrados melhores índices com utilização de sangue bovino citratado.

Kirch et al. (1991) compararam a utilização de dois tipos de membranas sintéticas, uma confeccionada a partir de uma superfície de Parafilm<sup>®</sup> e outra à base de látex, em estudos

envolvendo a morfologia de eritrócitos bovinos submetidos à hemólise no intestino do carrapato *Ornithodoros concanensis* Cooley & Kohls 1941 . O percentual de alimentação foi considerado pelos autores bem sucedido, sendo significativamente superior à utilização da membrana sintética confeccionada por Parafilm<sup>®</sup> (63%) do que látex (43%).

Os primeiros a descreverem o preparo de membranas reforçadas à base de silicone para alimentação artificial, foram Davis et al. (1983), desenvolvido primeiramente para alimentação de *Culicoides mississippiensis* Hoffman, 1926 (Diptera: Ceratopogonidae). A partir deste modelo de membrana, diversos aparatos de alimentação foram desenvolvidos a fim de mimetizar com este tipo de superfície a pele do hospedeiro, em diferentes sistemas de alimentação artificial para carrapatos.

Durante algum tempo, foram observadas taxas de mortalidade ocasionalmente elevadas, quando utilizada alimentação artificial em argasídeos. No entanto, Osborne e Mellor (1986) afirmaram não estarem associadas ao método de alimentação, e sim ao sangue, sugerindo contaminação por agentes microbianos, a causa principal das mortes e não a superalimentação, como era previamente pensado. Este transtorno pôde ser facilmente controlado pela adição de antibióticos na alimentação.

Osborne e Mellor (1985) compararam a eficácia da alimentação artificial em *Ornithodoros moubata*, utilizando diferentes fontes sanguíneas, por meio de membranas de silicone e membranas naturais. Os autores verificaram que a alimentação artificial por meio de membranas de silicone apresentou boa taxa de alimentação, avaliada pela fecundidade, que se mostrou significativamente superior quando comparada com a alimentação *in vivo*, comprovando a maior conveniência desta técnica para a manutenção de colônias destes carrapatos. O sangue de camundongo demonstrou ser a melhor fonte utilizada.

Fonseca et al. (1999) empregaram membranas de silicone pinceladas com líquido resultante da depenagem das frangos de abatedouro comercial contendo fragmentos de pele e penas, para alimentar o carrapato *Argas miniatus*. Foram utilizadas como fontes sanguíneas, aves e bovinos, enquanto o grupo-controle se alimentou no hospedeiro natural. Segundo os autores, o sangue das aves foi 100% eficaz na alimentação de ninfas e adultos de *A. miniatus*, sendo que a substituição pelo sangue bovino apresentou resultados acima do obtido para o grupo-controle, alimentado diretamente sobre as aves. Os parâmetros biológicos se mantiveram na média esperada. Os resultados obtidos indicaram ser possível aperfeiçoar a manutenção de colônias de *A. miniatus* em laboratório, por meio da alimentação artificial com o uso de sangue bovino e membranas de silicone.

Estudos relacionados à transmissão de patógenos para carrapatos argasídeos por meio de alimentação artificial foram propostos por Butler et al. (1984), Abbassy et al. (1994), McCoy et al. (2010) e Burešová et al. (2006).

Butler et al. (1984) utilizaram membrana à base de silicone para a alimentação artificial de cinco espécies do gênero *Ornithodoros*, com diferentes dietas alimentares, verificando a possibilidade da transmissão *in vitro* do vírus da peste suína africana. Nesse estudo, alcançaram sucesso, tanto na alimentação artificial dos carrapatos, como na transmissão do vírus.

Abbassy et al. (1994) reportaram a utilização da técnica de alimentação artificial em carrapatos do gênero *Argas*, utilizando soro fetal bovino como fonte de alimentação, para demonstrar a transmissão do vírus do oeste do Nilo. Os autores verificaram que o soro fetal bovino possui alto valor nutritivo para os carrapatos, além de proporcionar um meio para a quantificação para doses infectantes.

McCoy et al. (2010) estudaram a espécie *Ornithodoros hermsi* com a finalidade de transmitir espiroquetas do gênero *Borrelia* por meio da alimentação artificial. Foi realizada uma reação em cadeia da polimerase quantitativa, para aferir a quantidade de espiroquetas ingeridas e mantidas nos carrapatos após a alimentação. A densidade de espiroquetas nos

carrapatos ingurgitados se mostrou menor que as apresentadas no sangue. Os autores verificaram que após o quinto dia de alimentação, o número de espiroquetas nos carrapatos diminuiu a partir do número inicialmente ingerido, no entanto, mantiveram-se constantes até o 15º dia.

Burešová et al. (2006) verificaram por meio da alimentação artificial a transmissão experimental da bactéria *Chryseobacterium indologenes* para as espécies *O. moubata* e *Ixodes ricinus*, utilizando membranas sintéticas. Foi observado que a alimentação se configurou letal para os carrapatos da espécie *O. moubata*, enquanto que a taxa de mortalidade de *I. ricinus* foi insignificante. Os resultados deste estudo demonstraram que os carrapatos argasídeos possuem defesa menos eficiente contra a infecção por *C. indologenes* que os ixodídeos.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 Local de execução do experimento

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Doenças Parasitárias (LDP) do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado no município de Seropédica, RJ.

#### 3.2 Obtenção dos espécimes e técnicas de coleta empregadas

Os carrapatos *O. rostratus* utilizados neste experimento foram coletados exclusivamente para esse trabalho de tese, na fazenda da Nhumirim da EMBRAPA- Pantanal, região da Nhecolândia, localizada no Pantanal do Mato Grosso do Sul (latitude 18° 59' S, longitude 56° 39' O) no ano de 2012. Para a coleta dos carrapatos, três técnicas distintas foram utilizadas: arrasto de flanela, armadilha de CO<sub>2</sub> e inspeção visual no solo.

Para a técnica de arrasto foram utilizadas flanelas de 1,5m de comprimento por 80 cm de largura, fixadas em um suporte de madeira. As flanelas foram arrastadas sobre a superfície do terreno, em locais, estrategicamente, descritos como área de ocorrência do carrapato em questão.

A técnica da armadilha de CO<sub>2</sub> utilizada foi descrita por Cançado et al. (2008). Para a confecção da armadilha foram utilizadas duas caixas plásticas de aproximadamente 1000 mL de volume e frascos tipo Eppendorf<sup>®</sup> de 0,5 mL. As caixas foram empilhadas e um orifício foi aberto na tampa da caixa inferior e no fundo da caixa superior, assim como nas laterais da caixa inferior. O tubo tipo Eppendorf<sup>®</sup> foi perfurado por uma agulha (25X0.7) e transpassado entre as caixas superior e a inferior, de forma que houvesse passagem entre elas. Na caixa inferior foi colocado carbonato de cálcio (CaCO<sub>3</sub>) e na caixa superior ácido láctico (C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub>). Por meio do tubo perfurado, o ácido escoava e gotejava sobre o sal, promovendo uma reação que liberava CO<sub>2</sub>. Os orifícios nas laterais da caixa inferior permitiam a saída desse gás, que gerava atração nos carrapatos. Foram utilizados 500 mL de uma solução aquosa de ácido láctico à concentração de 20% e 300g de carbonato de cálcio para cada armadilha. Uma flanela branca foi depositada embaixo das caixas para melhor visualização dos carrapatos. Fitas tipo dupla-face foram fixadas nas bordas para evitar possíveis fugas (Figura 1).

A outra técnica empregada para a captura dos carrapatos foi a inspeção visual no terreno, realizada com o auxílio de uma pá de jardinagem para o revolvimento do solo (Figura 1). Estes carrapatos, por apresentarem hábitos nidícolas, tendem a ficar escondidos em terrenos arenosos.

Após a coleta, os carrapatos foram armazenados em frascos de plásticos contendo areia em seu interior, até a chegada ao Laboratório de Doenças Parasitárias, onde então foram limpos, identificados e armazenados em estufas tipo BOD à temperatura de 27 ± 1 °C e umidade relativa superior a 80%.

Os carrapatos adultos foram identificados de acordo com as características morfológicas encontradas na chave dicotômica de Aragão e Fonseca (1961) e Guimarães (2001), enquanto os imaturos foram alimentados e verificados após muda para adultos.





**Figura 1.** Coleta de carrapatos *Ornithodoros rostratus* na Fazenda Nhumirim Pantanal-MS. A) Inspeção visual no solo com auxílio de uma pá de jardinagem; B) Espécime caminhando no terreno após revolvimento do solo; C) Armadilha de CO<sub>2</sub>; D) Carrapato atraído pelo CO<sub>2</sub> na armadilha

### 3.3 Obtenção das ninfas em jejum

As ninfas utilizadas no experimento originaram-se de 15 casais de carrapatos coletados no ambiente, de acordo com as técnicas descritas no item anterior. Os casais foram alimentados em dois coelhos domésticos (*Oryctolagus cuniculus*) mestiços Califórnia x Nova Zelândia, provenientes do Setor de Cunicultura do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, sem contato prévio com carrapatos e produtos acaricidas. Os animais foram mantidos em abrigos individuais e receberam alimentação adequada e água *ad libitum*.

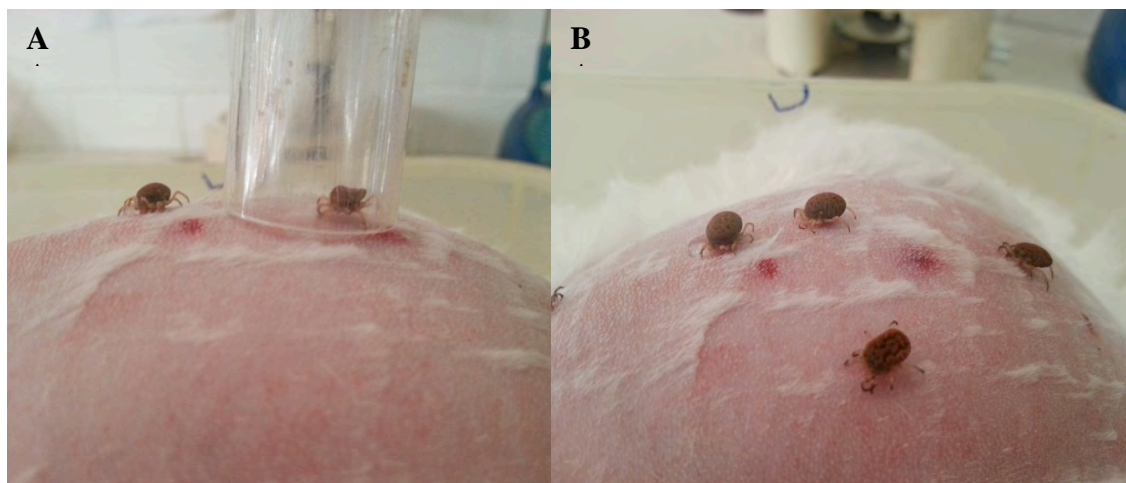
As infestações foram realizadas na região dorsal de dois coelhos, após a tricotomia local. Os carrapatos foram contidos de forma individual por um frasco plástico até o momento da fixação nos hospedeiros experimentais (Figura 2), segundo Ribeiro et al., 2013. Seguido o desprendimento, os casais foram acondicionados em placas de Petri para o acasalamento.

As posturas das fêmeas foram acompanhadas até que se finalizasse a oviposição. Posteriormente, um *pool* de 100 mg de ovos oriundos das fêmeas foi separado e acondicionado em 3 seringas hipodérmicas, cortadas na parte oposta ao êmbolo, vedadas com buchas de algodão e observadas até a eclosão larval.

Após um período de descanso de 30 dias, três coelhos foram infestados com essas larvas, por meio da técnica do saco de pano aderido ao dorso de coelhos descrita em Neitz et al. (1971). A recuperação das larvas ingurgitadas começou no mesmo dia e algumas ainda continuaram fixadas, sendo recuperadas nos dias posteriores.

Após a ecdise, 650 ninfas de primeiro instar foram separadas, acondicionadas de forma individual em tubos de ensaio vedados com bucha de algodão, identificadas e distribuídas aleatoriamente nos grupos experimentais. O primeiro instar ninfal foi escolhido para iniciar o experimento, por ser o primeiro estágio capaz de se alimentar artificialmente por meio das membranas de silicone. Dessa forma, a partir desses, todos os instares subsequentes puderam ser alimentados e avaliados até a emergência de adultos. A alimentação de larvas não pode ser evidenciada por meio de membranas de silicone.

Todos os carrapatos foram mantidos, durante a fase não parasitária, em estufas tipo BOD (Biological Oxygen Demand) em condições controladas à temperatura de  $27 \pm 1$  °C e umidade relativa superior a 80%.



**Figura 2.** Alimentação de fêmeas de *Ornithodoros rostratus* oriundas do Pantanal –MS em coelhos domésticos. A) Contenção da fêmea por um frasco até o momento da fixação; B) Desprendimento espontâneo e fixação de dois espécimes

### **3.4 Procedimentos para avaliar a técnica de alimentação artificial de *Ornithodoros rostratus* por meio de membranas de silicone**

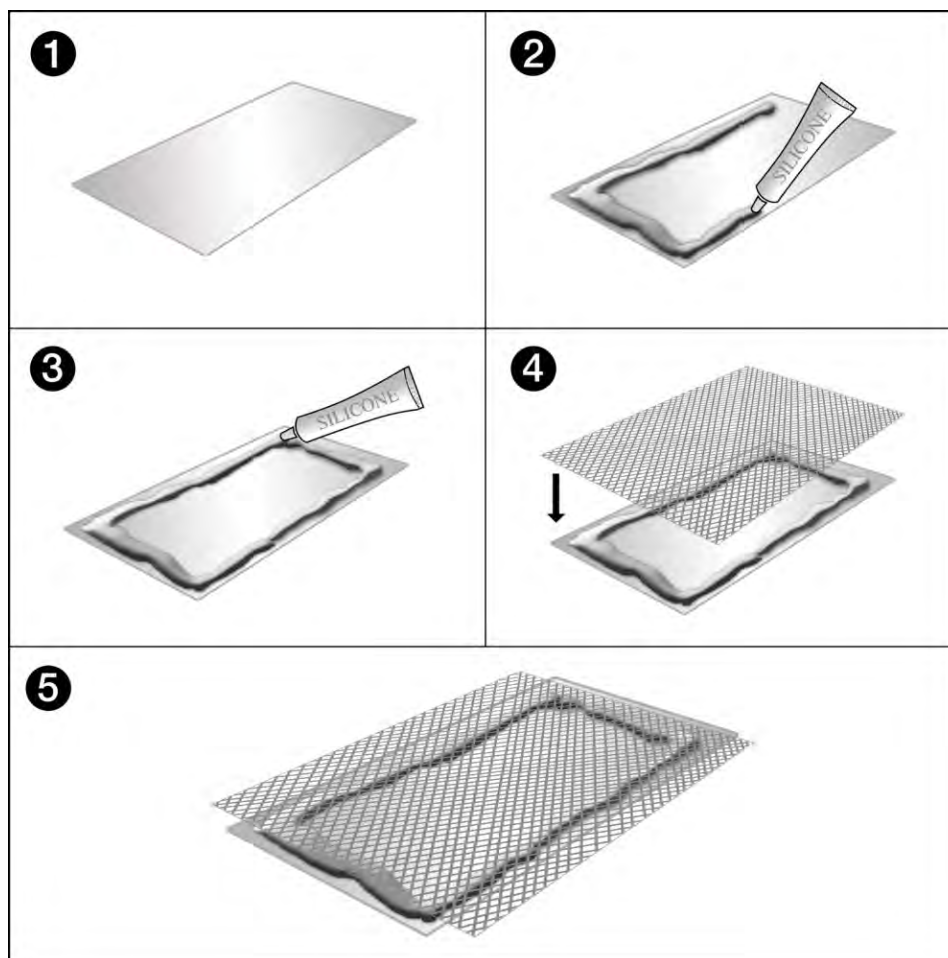
#### **3.4.1 Preparação das membranas de silicone**

As membranas de silicone utilizadas foram preparadas por meio de tecido impregnado por cola de silicone diluída, adaptada conforme descrição de Davis et al. (1983), apresentando uma espessura de 0,056 mm.

#### **3.4.2 Preparação das unidades de alimentação**

As unidades de alimentação foram confeccionadas por lâminas duplas de microscopia, que tiveram suas bordas preenchidas por uma camada de cola de silicone (cura acética), de

modo a deixar uma célula em seu interior. Posteriormente, era aplicada a membrana de silicone do mesmo tamanho da lâmina (Figura 3).



Fonte: Elaborado pelo autor

**Figura 3.** Etapas para a confecção das unidades de alimentação utilizadas para alimentar artificialmente os carrapatos *Ornithodoros rostratus*. 1) Lâmina de microscopia dupla, a ser fixada a membrana de silicone; 2 e 3) Aplicação da cola de silicone, por toda lateral da lâmina; 4 e 5) Disposição da membrana de silicone no aparato de vidro

### 3.4.3 A técnica de alimentação artificial

No momento da alimentação, essas unidades eram preenchidas, com o auxílio de agulha e seringa, com sangue previamente aquecido à temperatura de 37,5 °C (Figura 4). A faixa está em acordo com os principais trabalhos envolvendo a alimentação artificial de carrapatos, utilizando membranas (MOURA et al., 1997; FONSECA et al., 1999; KRÖBER; GUERIN, 2007; TAJERI; RAZMI, 2011). Cada unidade de alimentação requereu aproximadamente 5- 8 mL de sangue para a alimentação de 6-24 ninfas, dependendo do instar ninfal, ou até seis fêmeas. Um aparelho banho-maria foi utilizado como fonte de calor e umidade para os aparatos. Ao atingir temperatura de 37,5 °C, os aparatos de alimentação preenchidos com a fonte sanguínea eram postos em Placas de Petri apoiadas em estantes de tubos, para que as unidades pudessem ficar em contato com a superfície da água. Após, os

carrapatos em jejum, de acordo com suas fases e grupos experimentais específicos, eram colocados na superfície desse aparato e contidos por tubos tipo Eppendorf<sup>®</sup> sem a tampa, para impedir a fuga dos mesmos (Figura 4). Após a fixação dos carrapatos à membrana, esses tubos eram retirados.

O aparato era trocado a cada alimentação de dois grupos de ninfas, enquanto que para as fêmeas era permitida apenas uma única alimentação para cada grupo de seis carrapatos, em função do maior período de alimentação observado nesta fase do ciclo. Essa troca era ideal em função da sedimentação das hemácias, que tendiam a se depositar no fundo da unidade. Ao final, as unidades de alimentação eram limpas, lavadas com solução sanitizante, e podiam ser reutilizadas após a esterilização em autoclave.

Durante o experimento, os carrapatos foram alimentados sem a necessidade de nenhum tipo de fago estimulante no aparato de alimentação, sendo o estímulo desenvolvido apenas pela membrana de silicone e pelo sangue encontrado no interior do aparato.

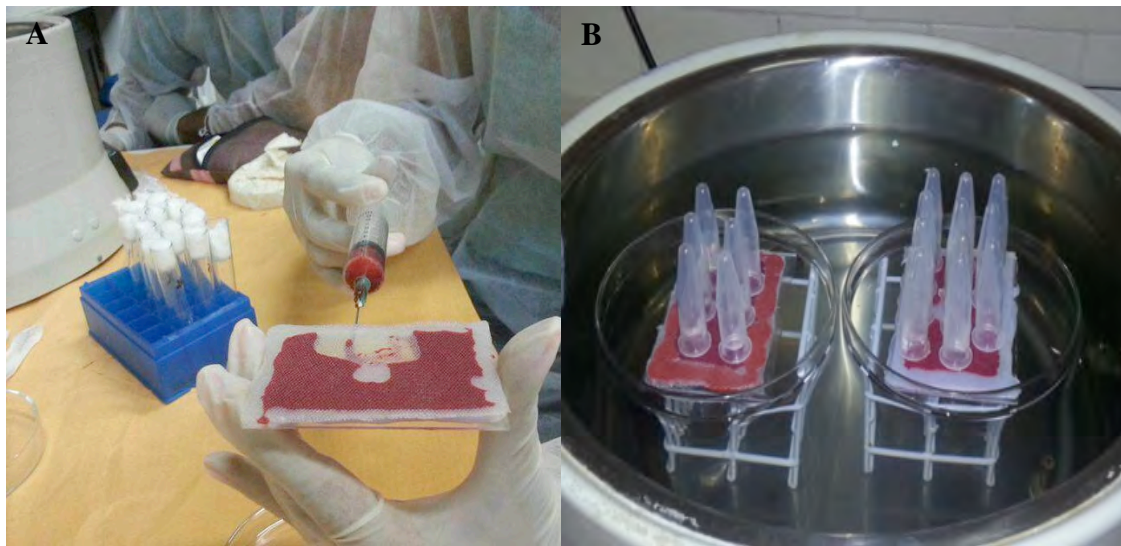
Era respeitado um período de intervalo em jejum de 30 - 40 dias entre as alimentações artificiais dos grupos de carrapatos.

#### **3.4.3.1 Ninfas**

O experimento iniciou-se com a alimentação de ninfas de primeiro instar, conforme citado no item 3.3. As ninfas em jejum de 30- 40 dias eram pesadas em balança analítica (Sartorius BL210s) e colocadas em contato com a membrana de silicone repleta com o sangue disponibilizado, de acordo com seu tratamento experimental. Após o período alimentar, era aferido o peso novamente para avaliar a diferença de pesos antes e após a alimentação, o que conferia o ganho de peso do carrapato. Em seguida, as ninfas ingurgitadas eram limpas e acondicionadas nos tubos identificados de origem, para acompanhamento do processo de muda. Após as ecdises dos espécimes alimentados artificialmente, esses permaneciam pelo mesmo período de jejum e eram alimentados artificialmente no próximo instar. Os carrapatos que não realizavam ecdise ou morriam eram retirados do experimento.

#### **3.4.3.2 Adultos**

Os exemplares foram pesados e alimentados de forma idêntica aos procedimentos supracitados no tópico referente às ninfas. A pesagem era feita imediatamente após o desprendimento dos carrapatos, para evitar possíveis erros provocados pela perda de líquido coxal ao transcorrer do tempo. As fêmeas eram colocadas em placas de Petri, juntamente com um macho em jejum, para que ocorresse o acasalamento, que era observado até o seu final, de forma a garantir o evento. Em seguida, os machos eram retirados e as fêmeas lavadas com detergente neutro e secas em papel absorvente. Em uma nova placa de Petri eram acondicionadas para o início de suas respectivas posturas. Durante a postura, os ovos eram coletados individualmente por fêmea, e diariamente, contados, pesados e acondicionados em tubos de ensaio vedados por buchas de algodão. Esse tubo era observado diariamente para acompanhamento do processo de eclosão larval.



**Figura 4.** Preparação das unidades de alimentação. A) Depósito da fonte sanguínea na célula do aparato de alimentação, com auxílio de agulha e seringa; B) Disposição dos carrapatos contidos por tubos tipo Eppendorf<sup>®</sup> nos aparatos de alimentação

#### 3.4.4 Amostras de sangue

Foram utilizadas amostras de sangue de bovinos e coelhos como fontes para os aparatos de alimentação. O sangue bovino foi selecionado por atender as necessidades em termos de volume e facilidade de obtenção, enquanto o sangue de coelhos, por ser o hospedeiro descrito para a manutenção desta espécie de carrapato em condições experimentais (RIBEIRO et al., 2013).

O sangue de bovinos utilizado neste estudo foi coletado assepticamente da veia jugular de bezerros aparentemente saudáveis, com idade inferior a 12 meses, mestiço (Holandês x Zebu), em boas condições orgânica e clinicamente saudáveis. Enquanto o sangue de coelhos foi coletado, assepticamente, da veia marginal da orelha de mestiços, Califórnia x Nova Zelândia, com idade entre 60 e 90 dias, de ambos os sexos.

Os animais eram mantidos alojados em baia e gaiolas individuais, pertencentes ao Laboratório de Doenças Parasitárias, onde recebiam feno, ração peletizada e água *ad libitum*.

As amostras de sangue eram preparadas para a alimentação dos carrapatos, de acordo com os grupos experimentais, para avaliar o efeito da dieta nos parâmetros biológicos dos carrapatos alimentados artificialmente. Este material era identificado e utilizado logo após a coleta ou conservado sob a refrigeração à temperatura de 4 °C, por um tempo máximo de 3 horas.

#### 3.5 Procedimentos para avaliar o efeito da dieta nos parâmetros biológicos de *Ornithodoros rostratus* alimentados artificialmente

O acompanhamento dos parâmetros biológicos dos carrapatos constitui a forma mais apropriada para avaliar a eficiência das técnicas de alimentação *in vitro* (CHABAUD, 1950). Dessa maneira, foram propostas diferentes dietas a serem utilizadas na alimentação artificial da espécie, esperando sugerir a que forneça dados mais próximos da realidade *in vivo*.

O experimento iniciou-se com 130 ninfas de primeiro instar de *O. rostratus*, em jejum, para cada grupo, totalizando 650 indivíduos com o grupo-controle.

### **3.5.1 Grupos experimentais e preparação das amostras de sangue**

A coleta foi realizada como descrita no item 3.4.4 e as dietas preparadas das seguintes formas:

Sangue de bovino citratado: acondicionado em tubos plásticos para a coleta de sangue tipo Vacutainer<sup>®</sup>, contendo o anticoagulante citrato de sódio, na proporção de nove partes de sangue para uma de citrato de sódio.

Sangue de bovino com antibiótico: acondicionado em tubos plásticos para a coleta de sangue tipo Vacutainer<sup>®</sup>, contendo o anticoagulante citrato de sódio, na proporção de nove partes de sangue para uma de citrato de sódio e adicionado 10 µL/ mL de antibiótico penicilina + estreptomicina (10,000 U.I e 10 mg estreptomicina/mL, SIGMA).

Sangue desfibrinado de bovino: Sangue de bovino acondicionado em tubos plásticos para coleta de sangue tipo Vacutainer<sup>®</sup>, sem anticoagulante. Seguida à coleta, o tubo era aberto e o sangue depositado em um Erlenmeyer, com esferas de vidro em seu interior. O sangue era agitado em movimentos rotacionais contínuos por 10 minutos.

Sangue de coelho citratado: acondicionado em tubos plásticos para a coleta de sangue tipo Vacutainer<sup>®</sup>, contendo o anticoagulante citrato de sódio, na proporção de nove partes de sangue para uma de citrato de sódio.

Grupo-controle - Procedeu a alimentação direta em coelhos, como descrito no item 3.3. Para cada instar foram utilizados dois coelhos, que eram substituídos a cada alimentação.

### **3.5.2 Parâmetros biológicos**

#### **3.5.2.1 Parâmetros biológicos avaliados em ninfas**

Período de pré-fixação (minutos) - definido do momento em que o carrapato foi exposto ao hospedeiro até o momento de sua fixação.

Período alimentar (minutos) - definido do momento em que o carrapato se fixou ao hospedeiro até o momento de seu desprendimento.

Ganho de peso (miligramas) - Peso obtido durante o processo de alimentação, conferido pelo peso após o desprendimento, subtraído do peso do carrapato em jejum.

Período de muda (dias) - definido do momento em que o espécime ingurgitado se desprendeu do hospedeiro até o momento em que ocorreu a ecdise.

Percentual de ecdise (%) - definido como o número de carrapatos que realizaram a ecdise em relação ao número total de indivíduos alimentados previamente.

#### **3.5.2.2 Parâmetros biológicos avaliados em fêmeas**

Período de pré-fixação - Definido no item 3.5.2.1.

Período alimentar - Definido no item 3.5.2.1.

Ganho de peso - Definido no item 3.5.2.1.

Período de pré-postura (dias) - tempo decorrido desde o desprendimento da fêmea ingurgitada até o início da oviposição.

Período de postura (dias) - intervalo de tempo compreendido entre o início da oviposição e o postura do último ovo.

Peso da postura (miligramas) - peso total da postura da fêmea.

Número de ovos por postura – contagem numérica do total de ovos da postura da fêmea.

Índice de Eficiência Reprodutiva - relação da postura total da fêmea com o seu peso inicial. Calculado segundo Bennett, 1974.

$$\text{I.E.R} = \frac{\text{Peso da massa de ovos (mg)}}{\text{Peso da fêmea ingurgitada (mg)}} \times 100$$

Período de pré-eclosão (dias) - período transcorrido entre o dia inicial da postura até a eclosão da primeira larva.

Percentual de eclosão (%) - percentual estimado de larvas que eclodiram em relação ao total de ovos.

### **3.6 Comitê de ética**

O experimento foi conduzido de acordo com o protocolo de princípios éticos em pesquisa animal, adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e aprovado pelo comitê interno de ética na experimentação animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, COMEP-UFRRJ (protocolo número: 23083.006255/2013-25).

### **3.7 Análise estatística**

Os dados do presente estudo apresentaram distribuição não normal, mesmo após a transformação logarítmica, e foram submetidos à análise não paramétrica pelo teste Kruskal-Wallis, em nível de significância de 5%. As médias foram consideradas significativamente distintas quando  $p < 0,05$ . Para os dados de comparação percentual foram aplicados o teste exato de Fisher e Qui-quadrado. A escolha dos testes estatísticos foi realizada conforme Sampaio (2002).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da técnica de alimentação artificial de *Ornithodoros rostratus* por meio de membranas de silicone

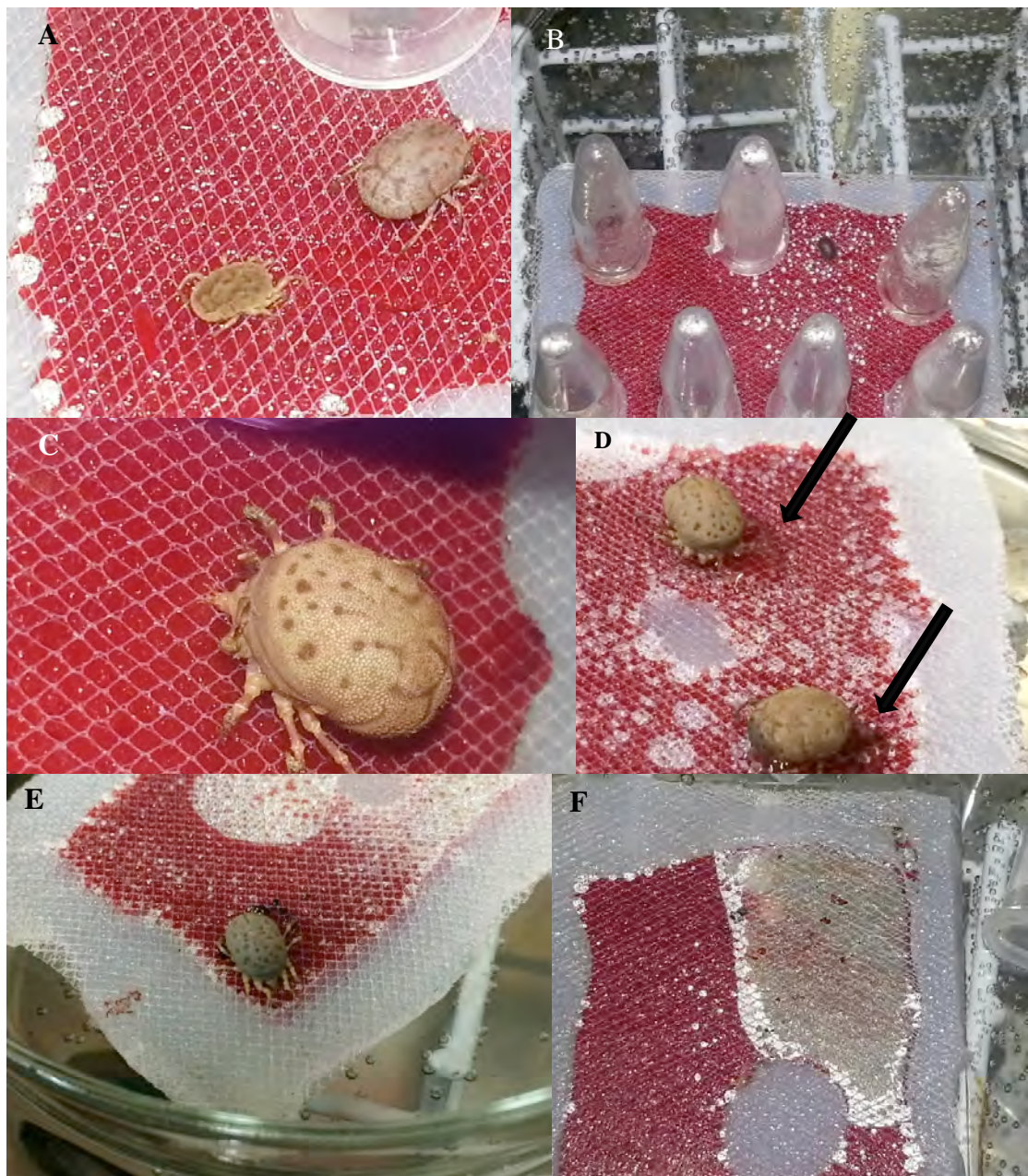
No atual estudo, não houve a necessidade de fago estimulante na unidade de alimentação para que ocorresse a fixação dos carrapatos à membrana. Este evento foi evidenciado pelo rápido estímulo dos carrapatos à alimentação no aparato alimentar. Diversos autores ressaltaram a importância dos estímulos específicos na alimentação artificial de carrapatos utilizando membranas sintéticas, testando, dessa forma, diferentes alternativas para aperfeiçoar a ingestão de sangue, envolvendo principalmente a regulação de fatores olfatórios (WALADDE et al., 1993; VOIGT et al., 1993; KUHNERT, 1995). O fato da ausência do fago estimulante não opor o carrapato à procura pela fonte sanguínea no presente trabalho, ampara o estudo de Butler et al. (1984), no qual afirmaram que a membrana de silicone fornece estímulo suficiente para promover a alimentação artificial do carrapato, na ausência de fago estimulante. Em contrapartida, os resultados encontrados em Hokama et al. (1987), verificaram ser necessária a utilização de fago estimulantes para a alimentação artificial de ninfas e adultos da mesma espécie de argasídeo estudada por Butler et al. (1984), porém quando utilizado Parafilm<sup>®</sup> em substituição ao silicone. Moura et al. (1997) e Fonseca et al. (1999) averiguaram que as membranas de silicone tratadas com vestígios de sangue e líquido resultante da depenagem de aves em abatedouro foram fago estimulantes muito eficientes na alimentação artificial de *Amblyomma cajennense* e *Argas miniatus*, respectivamente.

O presente trabalho obteve sucesso em alimentar artificialmente 520 carrapatos em jejum, durante seis instares ninfais e adultos, sem a necessidade de utilizar hospedeiros para prévio ingurgitamento. A prévia alimentação em hospedeiros experimentais constitui um estímulo para o processo de ingurgitamento *in vitro* de carrapatos, sendo observado principalmente na alimentação artificial por meio de tubos e ponteiras plásticas (RANGEL, 2011).

A redução do conteúdo dos aparatos de alimentação e abaulamento dos idiossomas dos carrapatos foram fatores que puderam confirmar a ingestão da fonte sanguínea no presente trabalho (Figura 5). Outro fato foi a liberação do líquido coxal por ninfas e fêmeas alimentadas artificialmente (Figura 5). Esse líquido tem como finalidade realizar um balanço hídrico no carrapato, além de conter substâncias que estimulam a atividade do macho ao acasalamento (SONENSHINE, 1991). Esse mecanismo é relatado em algumas espécies de argasídeos, e acontece somente após a alimentação. Ribeiro et al., (2013) relataram este evento em ninfas de *O. rostratus* a partir do segundo instar, imediatamente após a alimentação em hospedeiros experimentais. Dessa forma, a liberação deste líquido caracteriza um indicativo positivo do ingurgitamento satisfatório do carrapato.

A taxa de alimentação dos carrapatos no aparato proposto foi de 100%. Além disso, os carrapatos alimentados artificialmente não apresentaram nenhum tipo de alteração morfológica após a alimentação ou no seu posterior desenvolvimento, apoiando os resultados descritos por De La Vega et al. (2000).





**Figura 5.** Alimentação artificial de *Ornithodoros rostratus* utilizando membranas de silicone. A) Fêmeas no momento inicial e final da alimentação; B) Alimentação de ninfas de primeiro instar; C) Observação do abaulamento do idiossoma da fêmea durante a alimentação artificial; D) Fêmeas no momento final da alimentação artificial e liberação do líquido coxal; E e F) Redução da fonte sanguínea pelo consumo dos carrapatos nos aparatos de alimentação

#### 4.2 Avaliação do efeito da dieta nos parâmetros biológicos de *Ornithodoros rostratus* alimentados artificialmente

As médias dos períodos de pré-fixação das ninfas de primeiro ao sexto instar, alimentadas com diferentes dietas (sangue citratado de bovinos, sangue citratado de bovino com antibiótico, sangue desfibrinado de bovino e sangue citratado de coelhos), se mantiveram entre períodos curtos de  $1 - 4 \pm 4,4$  minutos, e estão apresentados nas Tabelas 1 a 6. Estes

dados evidenciaram que o estímulo de fixação dos carrapatos à membrana foi similar entre os grupos alimentados artificialmente e o grupo alimentado diretamente sobre o hospedeiro. As médias do período de alimentação de ninfas variaram entre  $9,0 \pm 2,1$  e  $28,8 \pm 14,3$  minutos para ninfas de primeiro instar alimentadas artificialmente com sangue citratado de bovino e ninfas de sexto instar do grupo-controle, respectivamente. As médias obtidas para esse parâmetro se mantiveram equivalentes independente da dieta oferecida, porém o tempo transcorrido para o ingurgitamento total aumentava conforme o avanço dos instares ninfais, sendo encontrados períodos menores em ninfas de primeiro e segundo instar. Ribeiro et al. (2013) observaram médias próximas às encontradas no presente trabalho, que variaram de  $17,3 \pm 7,0$  a  $39,2 \pm 11,4$  minutos (N1-N5) durante a alimentação em hospedeiros experimentais.

As médias de ganho de peso das ninfas (N1- N6) podem ser observadas nas Tabelas de 1 a 6. A utilização de sangue citratado de coelhos elevou o desempenho deste parâmetro em ninfas a partir do segundo instar. As médias de ganho de peso encontradas para ninfas de segundo, terceiro, quarto, quinto e sexto instares quando utilizado sangue citratado de coelhos na alimentação artificial foram de  $3,5 \pm 1,5$  mg,  $5,3 \pm 3,1$  mg,  $11,2 \pm 7,4$  mg,  $27,01 \pm 18,6$  mg e  $35,5 \pm 26,3$  mg, respectivamente, sendo estatisticamente semelhante ( $p > 0,05$ ) ao grupo-controle. Todos os grupos experimentais apresentaram diferenças estatísticas ( $p < 0,05$ ) nas médias dos pesos das ninfas (N1 –N6) aferidos antes e após as alimentações. Estes resultados garantiram o sucesso da ingestão de uma quantidade significativa de sangue pelos carrapatos, independente da dieta utilizada. Diversos trabalhos utilizam este tipo de aferimento como técnica para avaliar a ingestão de sangue pelos carrapatos (MOURA et al., 1997; FONSECA et al., 1999; ABEL, 2004; RANGEL, 2008; RANGEL et al., 2008; SAKAI, 2010; RANGEL, 2011; VALIM, 2014; RIBEIRO et al., 2014). Porém, há trabalhos que evidenciaram essa ingestão a partir de outras técnicas, como a avaliação por meio da ingestão de esferas fluorescentes, técnicas moleculares e marcação do nível de capilares (KOCAN et al. 2005), contudo, a técnica utilizada demonstrou ser de fácil aplicação e baixo custo.

As médias dos períodos de muda de ninfas estão apresentadas nas Tabelas de 1 - 6. As ninfas alimentadas artificialmente com sangue citratado de coelho não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) quando comparadas ao grupo-controle para este parâmetro, exceto em ninfas de segundo instar, sendo em sua maioria os períodos mais baixos encontrados. Ribeiro et al. (2013) observaram médias de período de muda que variaram de  $5,7 \pm 1,2$  dias a  $13,3 \pm 2,7$  dias (N1-N5), após a alimentação direta em hospedeiros experimentais.

Ribeiro et al. (2013) descreveram o ciclo biológico da espécie em questão considerando cinco instares ninfais como o padrão, porém verificaram ninfas de sexto instar. Contudo, no atual estudo houve o aparecimento de um grande número de ninfas de sexto instar, por isso estas foram consideradas nesse estudo. Durante o estudo, também foi observado o surgimento de dois instares adicionais aos relatados para a espécie (N7 e N8). Duas ninfas de oitavo instar foram verificadas no grupo alimentado artificialmente com sangue citratado de bovino, enquanto ninfas de sétimo instar foram encontradas nos demais grupos, inclusive no grupo- controle. Este fato nos leva a crer em uma muda adicional, proporcionado pela falta de nutrientes adequados à dieta da espécie, ou deficiente em alguns constituintes, como já relatado por outras espécies de argasídeos e para espécie em questão (MANGO; GALUN, 1977). No grupo-controle, este evento pode ser explicado pelo fato dos carrapatos utilizados não serem de uma colônia estabelecida em laboratório.

Nos grupos de ninfas alimentadas artificialmente com sangue citratado de bovinos, sangue de bovino com antibiótico, sangue de bovino desfibrinado e sangue de coelhos ocorreram 213, 220, 312 e 394 (N1-N6) ecdises ao longo do ciclo de vida, respectivamente. O grupo-controle apresentou 377 (N1-N6) ecdises, apresentando resultados inferiores ao grupo

alimentado artificialmente com sangue citratado de coelhos, que dentre todos os grupos experimentais apresentou um maior número de ecdises. O grupo alimentado artificialmente com o sangue bovino citratado apresentou maior número de mortes/ ou carrapatos que não realizaram muda ao longo do ciclo (117/130), seguido de forma decrescente pelo grupo que recebeu o sangue bovino com antibiótico (110/130) e sangue bovino desfibrinado (104/130). O grupo alimentado com sangue citratado de coelhos (90/130) e o grupo-controle (83/100) apresentaram os menores índices de mortalidade. Diante desses resultados, sugere-se que a dieta fornecida pode ter influenciado a realização da ecdise e a mortalidade dos carrapatos. Assim, o grupo de carrapatos que realizou um maior número ecdises e apresentou menor mortalidade ao longo do seu ciclo de vida, pode apresentar uma maior capacidade de adaptação e/ou sobrevivência ao sistema *in vitro*.

Por meio dos parâmetros relacionados com a mortalidade, ecdises, e sobrevivência, foi possível plotar uma curva de sobrevivência dos integrantes de cada grupo experimental, em cada fase do ciclo biológico (Figura 6). A curva elaborada demonstra maior perda de indivíduos na fase inicial dos grupos alimentados artificialmente com sangue de bovinos com antibiótico e sangue citratado de bovino. Enquanto os demais grupos caracterizam uma taxa mais constante de sobrevivência ao longo dos instares ninfais.

Não foram observadas diferenças significativas ( $p>0,05$ ) entre as médias dos percentuais de ecdise encontrados nos grupos que se alimentaram artificialmente com sangue citratado de coelhos, sangue desfibrinado de bovinos e grupo-controle. A muda para machos ocorreu a partir do quarto instar em todos os grupos experimentais, enquanto fêmeas só puderam ser observadas em ecdises a partir do quinto instar ninfal, indiferentemente ao tratamento. A emergência do macho a partir de instares mais jovens se deve provavelmente pelo domínio espacial do macho para a cópula, na reprodução ou talvez pela exigência de um maior tempo de maturação para os órgãos reprodutivos das fêmeas e conseqüentemente mais nutrientes (GUGLIELMONE; HADANI,1980), dessa forma a diferença da dieta no estudo não interferiu neste fato. O número de adultos emergidos ao final do ciclo biológico da espécie variou dentro de cada grupo experimental.

Não foram observadas diferenças significativas quanto ao ganho de peso nos grupos de fêmeas que receberam diferentes dietas ( $p>0,05$ ) (Tabela 7). As fêmeas mantidas artificialmente com sangue citratado de coelhos e sangue desfibrinado bovino (23,8 e 26,3 minutos) não diferiram estatisticamente ( $p>0,05$ ) quanto ao período alimentar do ingurgitamento direto sobre o hospedeiro, assim como na média do ganho de peso (89,8 e 122,5 mg) e na média do período de postura (7 e 7,9 dias). O número de ovos por postura também se mostrou estatisticamente semelhante ao controle ( $p>0,05$ ). O ritmo médio de oviposição de fêmeas de *O. rostratus* alimentadas, artificialmente, por meio de membranas de silicone e grupo-controle, pode ser observado na Figura 7. A maior média de período de postura foi apresentada pelo grupo alimentado artificialmente com sangue de bovino desfibrinado, com 12,2 dias, chegando a 17 dias de oviposição. Este grupo apresentou diferença estatística significativa quando comparado ao grupo-controle para este parâmetro ( $p<0,05$ ).

No atual trabalho foram observados que alguns parâmetros relativos às ninfas e fêmeas apresentaram um desvio muito grande em relação à média, demonstrando grande variabilidade dentro dos grupos experimentais. Este evento é evidenciado pela grande diferença de pesos entre os espécimes, por serem esses alimentados em jejum.

O presente estudo demonstrou que a utilização de sangue citratado de coelhos elevou o desempenho da alimentação *in vitro* da espécie e evidenciou parâmetros semelhantes aos observados em hospedeiros experimentais, além de sugerir alta capacidade de sobrevivência e/ou adequação ao sistema artificial, dentre as demais dietas propostas. Entretanto, o grupo que recebeu o sangue bovino desfibrinado apresentou boa capacidade de sobrevivência, sendo

sugerido como uma dieta alternativa na impossibilidade do uso de sangue citratado de coelhos ou até mesmo para a utilização em estudos envolvendo patógenos.

Todos os grupos experimentais foram capazes de chegar ao estágio adulto e realizarem posturas viáveis, originando larvas. Mesmo havendo diferenças em alguns parâmetros biológicos, o que já era esperado considerando uma situação *in vitro*, a técnica de alimentação artificial foi capaz de manter uma população de carrapatos da espécie somente por meio artificial, sem a necessidade de infestações em hospedeiros experimentais, além de demonstrar condições necessárias para a condução de estudos envolvendo a transmissão *in vitro* de agentes.

**Tabela 1.** Parâmetros biológicos de ninfas de primeiro instar de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle.

Parâmetros Biológicos	Média ± Desvio Padrão				
	Sangue Citratado Bovino	Sangue Bovino com Antibiótico	Sangue Desfibrinado Bovino	Sangue Citratado Coelho	Controle
	Limite mínimo-Limite máximo				
	n				
Período de Pré-fixação (minutos)	1,1 ± 0,9 <sup>a</sup> 1 – 10 130	1 ± 0 <sup>a</sup> 1 – 1 130	1 ± 0 <sup>a</sup> 1 – 1 130	1 ± 0 <sup>a</sup> 1 – 1 130	1 ± 0 <sup>a</sup> 1 – 1 130
Período Alimentar (minutos)	9,0 ± 2,1 <sup>c</sup> 5 – 18 130	14,7 ± 7,6 <sup>a</sup> 6 – 36 130	11,0 ± 2,5 <sup>b</sup> 2 – 17 130	10,0 ± 2,5 <sup>b</sup> 4 – 17 130	14,1 ± 2,9 <sup>a</sup> 9 – 20 130
Ganho de peso (miligramas)	1,1 ± 0,5 <sup>b</sup> 0 - 2,5 130	0,8 ± 0,5 <sup>c</sup> 0,1 - 2,4 130	1,1 ± 0,6 <sup>b</sup> 0,1 - 2,8 130	1,1 ± 0,6 <sup>b</sup> 0,1 - 2,9 130	1,3 ± 0,4 <sup>a</sup> 0,3 - 2,8 130
Período de Muda (dias)	8,5 ± 1,3 <sup>b</sup> 7 – 14 130	14,2 ± 3,2 <sup>a</sup> 9 – 23 130	9,9 ± 2,6 <sup>b</sup> 7 – 19 130	7,2 ± 1,0 <sup>c</sup> 6 - 13 130	6,7 ± 0,6 <sup>c</sup> 6 – 9 130
Percentual de Ecdise (%)	73,8 <sup>a</sup>	56,1 <sup>b</sup>	73,1 <sup>a</sup>	81,5 <sup>a</sup>	80 <sup>a</sup>

Médias seguidas por pelo menos uma letra minúscula nas colunas, não diferiram entre si, pelo teste Kruskal-Wallis ou teste exato de Fisher, ao nível de 5% de significância. n = número de espécimes alimentados.

**Tabela 2.** Parâmetros biológicos de ninfas de segundo instar de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle.

Parâmetros Biológicos	Média ± Desvio Padrão				
	Sangue Citratado Bovino	Sangue Bovino com Antibiótico	Sangue Desfibrinado Bovino	Sangue Citratado Coelho	Controle
	Limite mínimo-Limite máximo				
	n				
Período de Pré-fixação (minutos)	3,5 ± 4,4 <sup>a</sup> 1 – 28 87	1,3 ± 0,9 <sup>b</sup> 1 – 4 69	1,3 ± 0,9 <sup>b</sup> 1 – 6 88	1,7 ± 0,8 <sup>a</sup> 1 – 5 106	1,1 ± 0,4 <sup>b</sup> 1 – 5 99
Período Alimentar (minutos)	14,5 ± 8,1 <sup>b</sup> 5 – 60 87	18,3 ± 8,1 <sup>a</sup> 7 - 40 69	20,9 ± 13,6 <sup>a</sup> 1 – 70 88	13,5 ± 6,6 <sup>b</sup> 1 – 41 106	16,2 ± 5,6 <sup>a</sup> 3 – 28 99
Ganho de peso (miligramas)	2,4 ± 1,2 <sup>b</sup> 0 - 6,3 87	1,3 ± 0,8 <sup>c</sup> 0,1 - 3,6 69	1,6 ± 0,8 <sup>c</sup> 0,1 - 3,7 88	3,5 ± 1,5 <sup>a</sup> 0,1 - 7,9 106	3,3 ± 1,4 <sup>a</sup> 0,1 - 7,6 99
Período de Muda (dias)	9,4 ± 2,1 <sup>a</sup> 7 – 16 87	9,1 ± 2,0 <sup>a,b</sup> 7 – 16 69	8,6 ± 1,7 <sup>b</sup> 7 – 17 88	7,2 ± 2,1 <sup>c</sup> 4 – 15 106	8,1 ± 1,6 <sup>b</sup> 7 – 13 99
Percentual de Ecdise (%)	51,7 <sup>c</sup>	79,7 <sup>b</sup>	77,3 <sup>b,a</sup>	86,8 <sup>a</sup>	97 <sup>a</sup>

Médias seguidas por pelo menos uma letra minúscula nas colunas, não diferiram entre si, pelo teste Kruskal-Wallis ou teste exato de Fisher, ao nível de 5% de significância. n = número de espécimes alimentados.

**Tabela 3.** Parâmetros biológicos de ninfas de terceiro instar de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle.

Parâmetros Biológicos	Média ± Desvio Padrão				
	Sangue Citratado Bovino	Sangue Bovino com Antibiótico	Sangue Desfibrinado Bovino	Sangue Citratado Coelho	Controle
	Limite mínimo-Limite máximo				
	n				
Período de Pré-fixação (minutos)	1 ± 0 <sup>b</sup> 1 - 1 39	1,0 ± 0,3 <sup>b</sup> 1 - 3 52	1,3 ± 1,3 <sup>b</sup> 1 - 7 67	1,1 ± 0,4 <sup>b</sup> 1 - 4 79	2,2 ± 2,1 <sup>a</sup> 1 - 12 95
Período Alimentar (minutos)	11,8 ± 2,7 <sup>b</sup> 7 - 17 39	13,7 ± 5,3 <sup>b</sup> 6 - 31 52	12,9 ± 4,3 <sup>b</sup> 3 - 22 67	14,8 ± 6,2 <sup>b</sup> 4 - 34 79	25,4 ± 11,9 <sup>a</sup> 4 - 59 95
Ganho de peso (miligramas)	2,9 ± 1,7 <sup>b</sup> 0,2 - 6,3 39	3,7 ± 2,1 <sup>b</sup> 0,1 - 7,5 52	3,2 ± 1,9 <sup>b</sup> 0,2 - 9,7 67	5,3 ± 3,1 <sup>a</sup> 0 - 16,6 79	8,4 ± 4,2 <sup>a</sup> 0,4 - 25,6 95
Período de Muda (dias)	9,4 ± 2,0 <sup>a</sup> 8 - 14 39	10,0 ± 2,2 <sup>a</sup> 8 - 16 52	8,7 ± 1,3 <sup>a</sup> 6 - 13 67	8,4 ± 2,0 <sup>b</sup> 7 - 18 79	8,0 ± 1,0 <sup>b</sup> 6 - 11 95
Percentual de Ecdise (%)	58,9 <sup>b</sup>	63,5 <sup>b</sup>	88,0 <sup>a</sup>	93,6 <sup>a</sup>	91,6 <sup>a</sup>

Médias seguidas por pelo menos uma letra minúscula nas colunas, não diferiram entre si, pelo teste Kruskal-Wallis ou teste exato de Fisher, ao nível de 5% de significância. n = número de espécimes alimentados.

**Tabela 4.** Parâmetros biológicos de ninfas de quarto instar de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle.

Parâmetros Biológicos	Média ± Desvio Padrão Limite mínimo-Limite máximo n				
	Sangue Citratado Bovino	Sangue Bovino com Antibiótico	Sangue Desfibrinado Bovino	Sangue Citratado Coelho	Controle
Período de Pré-fixação (minutos)	1,2 ± 0,4 <sup>b</sup> 1 – 2 23	4 ± 4,4 <sup>a</sup> 1 – 22 31	1,8 ± 1,6 <sup>a,b</sup> 1 – 8 59	2,1 ± 1,2 <sup>a</sup> 1 – 6 74	2,5 ± 2,1 <sup>a</sup> 1 – 12 86
Período Alimentar (minutos)	13 ± 4,0 <sup>c</sup> 4 – 19 23	14,8 ± 5,1 <sup>a,b,c</sup> 4 – 31 31	17,4 ± 4,4 <sup>a,b</sup> 8 – 28 59	24,2 ± 17,0 <sup>a</sup> 6 – 115 74	19,1 ± 10,7 <sup>a</sup> 2 – 51 86
Ganho de peso (miligramas)	6,0 ± 3,4 <sup>b</sup> 0,3 - 13,1 23	7,0 ± 3,5 <sup>a</sup> 0,2 - 13,2 31	6,3 ± 4,9 <sup>b</sup> 0,1 - 20,3 59	11,2 ± 7,4 <sup>a</sup> 0,1 – 35 74	16,7 ± 11,4 <sup>a</sup> 0,7 - 48,2 86
Período de Muda (dias)	9,3 ± 1,4 <sup>b</sup> 8 – 13 23	12,9 ± 4,0 <sup>a</sup> 10 – 26 31	9,1 ± 1,4 <sup>b</sup> 7 – 13 59	8,6 ± 1,7 <sup>b</sup> 7 – 13 74	10,1 ± 2,2 <sup>b</sup> 7 – 18 86
Percentual de Ecdise (%)	82,6 <sup>a</sup>	74,2 <sup>a</sup>	72,9 <sup>a</sup>	83,8 <sup>a</sup>	68,6 <sup>a</sup>

Médias seguidas por pelo menos uma letra minúscula nas colunas, não diferiram entre si, pelo teste Kruskal-Wallis ou teste exato de Fisher, ao nível de 5% de significância. n = número de espécimes alimentados.



**Tabela 5.** Parâmetros biológicos de ninfas de quinto instar de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle.

Parâmetros Biológicos	Média ± Desvio Padrão Limite mínimo-Limite máximo n				
	Sangue Citratado Bovino	Sangue Bovino com Antibiótico	Sangue Desfibrinado Bovino	Sangue Citratado Coelho	Controle
Período de Pré-fixação (minutos)	2,1 ± 1,1 <sup>a</sup> 1 – 5 19	1,6 ± 0,7 <sup>a</sup> 1 – 4 23	2,3 ± 1,5 <sup>a</sup> 1 – 7 40	3,3 ± 3,4 <sup>a</sup> 1 – 16 56	2,4 ± 1,6 <sup>a</sup> 1 – 6 35
Período Alimentar (minutos)	20,3 ± 7,1 <sup>a</sup> 8 – 33 19	15,2 ± 3,6 <sup>b</sup> 7 – 21 23	22,4 ± 10,0 <sup>a</sup> 3 – 40 40	21 ± 12,2 <sup>a</sup> 9 – 81 56	20,0 ± 12,0 <sup>a</sup> 3 – 60 35
Ganho de peso (miligramas)	10,2 ± 6,2 <sup>b</sup> 0,7 - 21,5 19	16,9 ± 8,4 <sup>a,b</sup> 0,1 - 34,3 23	16,9 ± 10,4 <sup>a</sup> 0,3 - 41,3 40	27,0 ± 18,6 <sup>a</sup> 0,2 - 74,7 56	34,1 ± 29,7 <sup>a</sup> 0,1 - 119,5 35
Período de Muda (dias)	14,1 ± 3,5 <sup>a</sup> 10 – 22 19	9,2 ± 2,1 <sup>b</sup> 8 – 16 23	11,4 ± 2,8 <sup>a</sup> 8 – 19 40	12,1 ± 3,9 <sup>a</sup> 8 – 26 56	12,5 ± 2,3 <sup>a</sup> 9 – 18 35
Percentual de Ecdise (%)	89,5 <sup>a</sup>	86,9 <sup>a</sup>	82,5 <sup>a</sup>	80,3 <sup>a</sup>	68,6 <sup>a</sup>

Médias seguidas por pelo menos uma letra minúscula nas colunas, não diferiram entre si, pelo teste Kruskal-Wallis ou teste exato de Fisher, ao nível de 5% de significância. n = número de espécimes alimentados.

**Tabela 6.** Parâmetros biológicos de ninfas de sexto instar de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle.

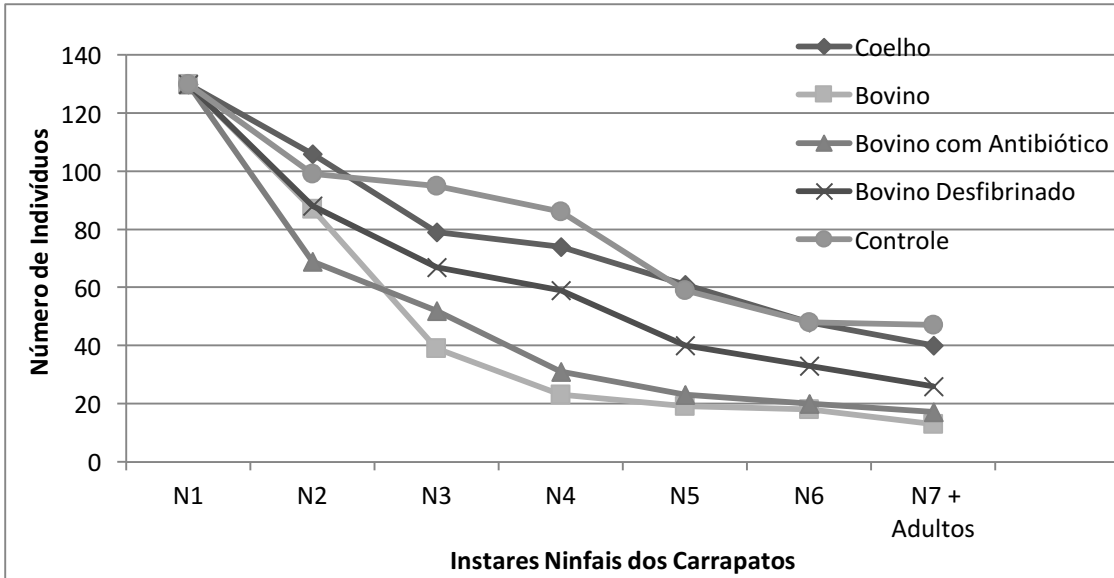
Parâmetros Biológicos	Média ± Desvio Padrão				
	Sangue Citratado Bovino	Sangue Bovino com Antibiótico	Sangue Desfibrinado Bovino	Sangue Citratado Coelho	Controle
	Limite mínimo-Limite máximo				
	n				
Período de Pré-fixação (minutos)	1,6 ± 0,8 <sup>a</sup> 1 – 3 15	2,4 ± 1,2 <sup>a</sup> 1 – 5 16	2,3 ± 1,1 <sup>a</sup> 1 - 5 19	2,6 ± 1,7 <sup>a</sup> 1 – 9 23	3,6 ± 2,9 <sup>a</sup> 1 – 10 7
Período Alimentar (minutos)	27,7 ± 3,9 <sup>a</sup> 17 – 34 15	23,9 ± 11,2 <sup>a</sup> 4 – 47 16	16,9 ± 10,1 <sup>b</sup> 7 - 39 19	20,6 ± 8,7 <sup>a</sup> 8 – 35 23	28,8 ± 14,3 <sup>a</sup> 11 – 52 7
Ganho de peso (miligramas)	16,9 ± 9,6 <sup>a</sup> 0,5 – 40 15	35,9 ± 18,2 <sup>a</sup> 11 – 66 16	22,5 ± 19,8 <sup>a</sup> 1 - 76,1 19	35,5 ± 26,3 <sup>a</sup> 0,3 – 104 23	44,2 ± 19,9 <sup>a</sup> 9,7 - 67,5 7
Período de Muda (dias)	12,3 ± 5,2 <sup>a</sup> 8 – 25 15	12,9 ± 3,2 <sup>a</sup> 9 – 22 16	14,9 ± 5,1 <sup>a</sup> 10 – 26 19	12,1 ± 2,2 <sup>a</sup> 8 – 17 23	10,3 ± 1,7 <sup>a</sup> 8 – 13 7
Percentual de Ecdise (%)	86,6 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	63,2 <sup>a</sup>	65,2 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>

Médias seguidas por pelo menos uma letra minúscula nas colunas, não diferiram entre si, pelo teste Kruskal-Wallis ou teste exato de Fisher, ao nível de 5% de significância. n = número de espécimes alimentados.

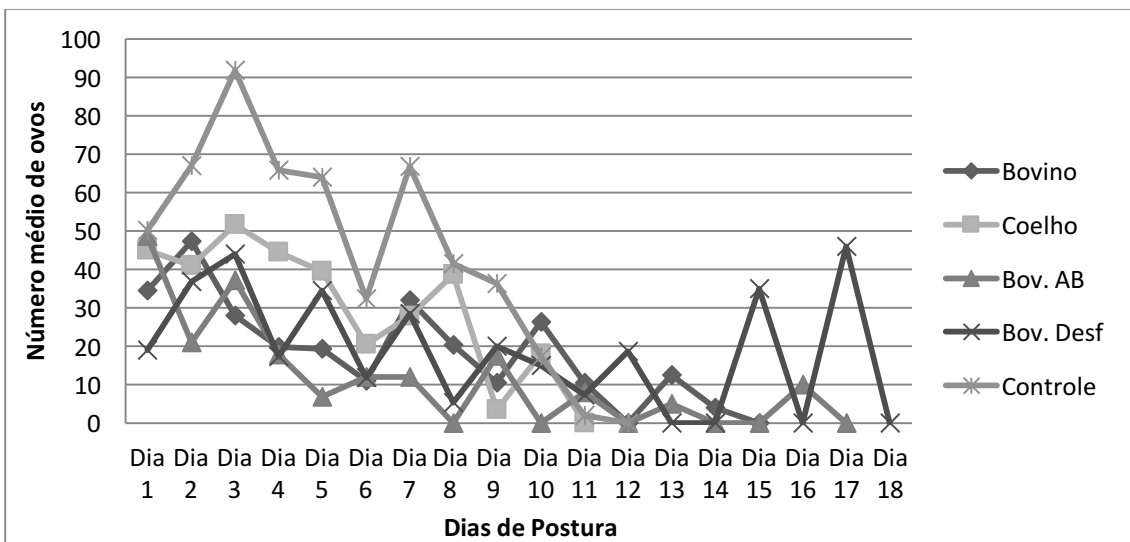
**Tabela 7.** Parâmetros biológicos de fêmeas de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle.

Parâmetros Biológicos	Média ± Desvio Padrão Limite mínimo-Limite máximo n				
	Sangue Citratado Bovino	Sangue Bovino com Antibiótico	Sangue Desfibrinado Bovino	Sangue Citratado Coelho	Controle
Ganho de peso (miligramas)	76,3 ± 30,2 <sup>a</sup> 24,9 – 106,2 8	82,4 ± 8,7 <sup>a</sup> 72,6 – 100,3 6	99,3 ± 26,7 <sup>a</sup> 61,2 – 137,5 7	89,8 ± 37,0 <sup>a</sup> 32,1-182,2 17	122,5 ± 49,1 <sup>a</sup> 15,4 – 190,6 18
Período Pré-Fixação (minutos)	5,2 ± 6,6 <sup>a</sup> 1 – 22 8	3 ± 1,8 <sup>a</sup> 2 – 7 6	4 ± 3,8 <sup>a</sup> 1 – 13 7	2,2 ± 2,5 <sup>a</sup> 1 – 11 17	2,4 ± 1,4 <sup>a</sup> 1 – 6 18
Período Alimentar (minutos)	33,1 ± 15,7 <sup>a</sup> 19 – 59 8	24,5 ± 3,8 <sup>b</sup> 19 – 29 6	29,3 ± 5,9 <sup>a,b</sup> 20 – 37 7	23,8 ± 6,5 <sup>b</sup> 7 – 33 17	26,3 ± 9,1 <sup>b</sup> 6 – 51 18
Período de Pré- Postura (dias)	10 ± 1,7 <sup>a</sup> 9 – 13 4	10,2 ± 2,6 <sup>a</sup> 7 – 15 6	12,5 ± 1, <sup>a</sup> 10 – 15 4	11,1 ± 3,0 <sup>a</sup> 6 – 16 12	9,3 ± 1,5 <sup>b</sup> 6 – 11 14
Peso da Postura (mg)	25,4 ± 7,4 <sup>a,b</sup> 18 - 37,5 4	13,5 ± 4,3 <sup>b</sup> 8,4 - 21,6 6	27,7 ± 13,2 <sup>a,b</sup> 16,2 - 49,9 4	29,1 ± 13,7 <sup>a,b</sup> 10,7 – 54,2 12	51,2 ± 20,5 <sup>a</sup> 11,2 - 78,4 14
Número de Ovos por Postura	254,7 ± 70,7 <sup>a,b</sup> 167 - 363 4	139,3 ± 41,1 <sup>b</sup> 92 - 212 6	263 ± 117,2 <sup>a,b</sup> 160 - 445 4	268,2 ± 143,6 <sup>a,b</sup> 65 – 506 12	455,9 ± 185,7 <sup>a</sup> 97 - 719 14
Período de Postura (dias)	11,5 ± 2,1 <sup>a</sup> 9 - 14 4	8,2 ± 4,7 <sup>a</sup> 1 - 16 6	12,2 ± 3,2 <sup>a</sup> 8 - 17 4	7 ± 1,3 <sup>a</sup> 5 – 10 12	7,9 ± 2,0 <sup>a</sup> 5 - 11 14
Índice de Eficiência Reprodutiva (%)	20,7 ± 4,1 <sup>a,b</sup> 14,7 - 25,4 4	11,3 ± 4,5 <sup>b</sup> 5,7 -19,7 6	20,4 ± 8,1 <sup>a,b</sup> 11,4 - 33,3 4	20,8 ± 7,8 <sup>a,b</sup> 7,8 - 36,9 12	26,2 ± 9,3 <sup>a</sup> 8,3 - 39,3 14
Período de Pré-Eclosão (dias)	14 ± 1,2 <sup>b</sup> 13 - 16 4	16,2 ± 1,5 <sup>a,b</sup> 14 – 18 6	16,7 ± 1,1 <sup>a,b</sup> 15 - 18 4	17,7 ± 1,4 <sup>a</sup> 15 – 21 12	13,6 ± 0,8 <sup>b</sup> 12 - 15 14
Eclosão (%)	42,5 ± 19,2 <sup>a</sup> 20 - 70 4	26,7 ± 26,7 <sup>a</sup> 5 – 80 6	40 ± 12,2 <sup>a</sup> 20 - 50 4	50,8 ± 31,5 <sup>a</sup> 10 – 95 12	53,9 ± 20,5 <sup>a</sup> 20 - 100 14

Médias seguidas por pelo menos uma letra minúsculas nas colunas, não diferiram entre si, pelo teste Kruskal-Wallis ou teste exato de Fisher, ao nível de 5% de significância. n = número de espécimes alimentados.



**Figura 6.** Gráfico de sobrevivência durante os estágios de vida dos carrapatos *Ornithodoros rostratus* alimentados artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo controle (Coelho- Sangue citratado de coelhos; Bovino- Sangue citratado de bovino; Bovino com Antibiótico - Sangue de bovino com antibiótico; Bovino Desfibrinado- Sangue desfibrinado de bovino; Controle - grupo-controle)



**Figura 7.** Ritmo médio de oviposição de fêmeas de *Ornithodoros rostratus* alimentadas artificialmente por meio de membranas de silicone e grupo-controle (Bovino- Sangue citratado de bovino; Coelho- Sangue citratado de coelhos; Bov. AB - Sangue de bovino com antibiótico; Bov. Desf.- Sangue desfibrinado de bovino; Controle- grupo-controle)

## 5 CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos na alimentação artificial de *Ornithodoros rostratus* pode-se concluir que:

O aparato alimentar proposto foi eficiente quanto ao estímulo de fixação e satisfatório quanto ao ingurgitamento dos carrapatos, sendo possível a manutenção de colônias de *Ornithodoros rostratus*, utilizando somente alimentação artificial por meio de membranas de silicone.

O sangue citratado de coelho é a fonte mais eficiente para manter colônias de *O. rostratus* em condições artificiais de alimentação, se aproximando da biologia de alimentação *in vivo* da espécie.

## CAPÍTULO II

**INFECÇÃO *IN VITRO* DE *Rickettsia parkeri*  
(Rickettsiales: Rickettsiaceae) EM *Ornithodoros rostratus*  
ARAGÃO, 1911, POR MEIO DE ALIMENTAÇÃO  
ARTIFICIAL EM MEMBRANAS DE SILICONE**

## RESUMO

RIBEIRO, C.C.D.U. **Infecção *in vitro* de *Rickettsia parkeri* (Rickettsiales:Rickettsiaceae) em *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911, por meio de alimentação artificial em membranas de silicone.** 2015. 97p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias, Parasitologia Veterinária). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

O presente trabalho teve como objetivo avaliar a eficiência da técnica de alimentação artificial, descrita no primeiro capítulo, na infecção *in vitro* de *R. parkeri* para carrapatos *O. rostratus* e verificar o potencial de transmissão de *R. parkeri* por carrapatos infectados artificialmente quando ninfas para cobaios. A infecção *in vitro* de *R. parkeri* para o carrapato *O. rostratus* foi realizada utilizando o sistema de alimentação artificial por meio de membranas de silicone previamente descrito no capítulo 1. Foram utilizadas 42 ninfas de diferentes instares e pesos homogêneos, divididas em dois grupos experimentais e grupo-controle. O grupo 1 foi direcionado para a avaliação da técnica de alimentação artificial na infecção *in vitro* de *R. parkeri* para ninfas de *O. rostratus* e o grupo 2 para avaliar ao potencial de transmissão de *Rickettsia parkeri* por *O. rostratus* infectados artificialmente quando ninfas para cobaios. Os grupos 1 e 2 foram alimentados artificialmente com sangue de coelho, contendo  $5 \times 10^5$  de células VERO infectadas com *R. parkeri*. Foi realizada a PCR para avaliar a infecção nos carrapatos do grupo 1. A avaliação da transmissão nos cobaios foi realizada por meio da técnica de RIFI e pelos sinais clínicos apresentados pelos hospedeiros. Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que *R. parkeri* pode persistir no carrapato *O. rostratus* alimentado artificialmente com sangue infectado, após a realização da ecdise. Este fato foi verificado por meio da realização da PCR, em 14 amostras de carrapatos infectados do grupo 1. A técnica detectou positividade para 13/14 (92,8 %) e 7/14 (50 %) dos carrapatos infectados por meio artificial, utilizando os marcadores que amplificam os genes *gltA* e *ompA*, respectivamente. Apenas um cobaio utilizado como hospedeiro para o grupo de carrapatos infectados apresentou febre (acima de 39,5 °C), por um período de dois dias (9<sup>o</sup> e 14<sup>o</sup> dia) após a infestação. A apresentação de edema escrotal foi verificada a partir do 7<sup>o</sup> dia, em três dos quatro cobaios infestados com carrapatos do grupo 2, assim como a perda de apetite. As análises sorológicas por meio da RIFI demonstraram que 100% (4/4) dos animais que receberam ninfas e adultos infectados apresentaram anticorpos reativos a partir do 15<sup>o</sup> dia PI até o 30<sup>o</sup> dia PI. Esses resultados confirmam os sinais clínicos apresentados pelos cobaios. O estudo demonstrou que o sistema de alimentação artificial foi capaz de promover a infecção *in vitro* de ninfas do carrapato *O. rostratus* por *R. parkeri*, além de verificar que ninfas e adultos de *O. rostratus* infectados por *R. parkeri* por meio artificial possuem poder infectante para cobaios.

**Palavras-chave:** Argasídeo, Carrapato, Alimentação *In vitro* e Infecção Experimental.

## ABSTRACT

RIBEIRO, C.C.D.U. ***In vitro* infection of *Rickettsia parkeri* (Rickettsiales: Rickettsiaceae) for the tick *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911 (Acari: Argasidae) by artificial feeding using silicone membranes.** 2015. 97p. Thesis (Doctor Science of Veterinary Science, Veterinary Parasitology). Instituto de Veterinária, Departamento de Parasitologia Animal, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2015.

This study aimed to verify the *in vitro* infection of *R. parkeri* to *Ornithodoros rostratus* nymphs through artificial feeding using silicone membranes and evaluate the transmission of *Rickettsia parkeri* by tick *O. rostratus* artificially infected to guinea pig. *R. parkeri in vitro* infection to *O. rostratus* was performed using the artificial feeding system through silicone membranes previously described in chapter 1. Forty two different instar nymphs were divided into three experimental groups of homogeneous weights. Group 1 was directed to the assessment of the artificial feeding technique in the infection *in vitro* of *R. parkeri* to *Ornithodoros rostratus* nymphs and group 2 was used to evaluate the transmission capacity of *Rickettsia parkeri* to guinea pigs by artificially infected *O. rostratus* nymphs. Groups 1 and 2 were artificially fed with rabbit blood containing  $5 \times 10^5$  of VERO cells infected with *R. parkeri*. PCR was performed to assess infection in group 1 ticks. Evaluation of infection in guinea pigs was carried out by the IFA technique, and clinical signs presented by the hosts. Group 3 was the control group. The results obtained in this study indicate that *R. parkeri* can persist in the tick *O. rostratus* artificially fed with infected blood, after molting. This fact was verified by PCR analysis on 14 samples of infected ticks in group 1. The technique resulted positive for 13/14 (92.8%) and 7/14 (50%) of infected ticks by artificial feeding, using primers to amplify the *gltA* and *ompA* genes, respectively. Only one guinea pig used as a host for the group of infected ticks had fever (over  $39.5^\circ\text{C}$ ) for a period of two days (days 9 and 14) after infestation. Scrotal edema was observed from day 7 in three of four guinea pigs infected with ticks in group 2, as well as loss of appetite. Serological analysis by IFA showed that 100% (4/4) of the animals receiving infected nymphs and adults presented reactive antibodies from day 15 PI until day 30 PI. These results confirm the clinical signs presented by the guinea pigs. The study demonstrated that the artificial feeding system was able to promote *in vitro* infection of *R. parkeri* for tick nymphs of *O. rostratus* and to verify that nymphs and adults of *O. rostratus* infected of *R. parkeri* by artificial feeding can have infective to guinea pigs .

**Keywords:** Argasidae, Tick, *In vitro* Feeding and Experimental Infection.



## 1 INTRODUÇÃO

A interação carrapato - *Rickettsia* tem sido um ponto de interesse para muitos pesquisadores, que concentram a maior parte de seus estudos no papel dos carrapatos como transmissores deste patógeno (PAROLA et al., 2013). A grande maioria das espécies do gênero *Rickettsia* é transmitida por carrapatos ixodídeos e poucos estudos têm sido dirigidos para averiguar a transmissão por carrapatos argasídeos.

O uso de hospedeiros experimentais para estudos envolvendo patógenos, ainda é o método de escolha para a obtenção de condições mais próximas da realidade fisiológica da transmissão. No entanto, as dificuldades relacionadas às características biológicas dos carrapatos, manutenção de hospedeiros experimentais e questões éticas, podem tornar esse método relativamente difícil (BONNET; LIU, 2012; LIU; BONNET, 2014). Dessa forma, ferramentas que busquem mimetizar a utilização desses hospedeiros são de extrema importância.

O carrapato *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911, é uma espécie de carrapato argasídeo com uma ampla distribuição na América do Sul. Apresenta baixa especificidade parasitária e possui relatos de parasitismo em humanos, além de ser considerado um possível vetor de *Rickettsia rickettsii*, agente causador da febre maculosa em humanos (HOOGSTRAAL, 1985).

*Rickettsia parkeri* é uma espécie membro do Grupo da Febre maculosa, isolada, primeiramente, em carrapatos da espécie *Amblyomma maculatum* Koch, 1844. Este patógeno causa em cobaias (*C. porcellus*) sintomas semelhantes à infecção *R. rickettsii*, porém brandos e sem mortalidade (PARKER et al., 1939). Esta bactéria constituiu-se em um modelo de estudo de baixa patogenicidade, garantindo maior segurança na condução dos experimentos.

O estudo teve como objetivo avaliar a eficiência da técnica descrita no primeiro capítulo na infecção *in vitro* de *R. parkeri* para carrapatos *O. rostratus* e verificar o potencial de transmissão de *R. parkeri* por carrapatos infectados artificialmente quando ninfas para cobaias.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 O Gênero *Rickettsia*

Os organismos do gênero *Rickettsia* são classificados como bactérias Gram-negativas e intracelulares obrigatórias, inseridas na ordem Rickettsiales, família Rickettsiaceae (LA SCOLA; RAOULT, 1997; GALVÃO et al., 2005). Essas bactérias são pleomórficas e ocorrem na forma de bastonetes curtos (0,3 x 1 a 2 µm) ou cocos (0,3 µm de diâmetro). Não se coram adequadamente pelo Método de Gram, porém são facilmente visualizadas à microscopia óptica quando coradas pelo método de Giemsa, Gimenez, Laranja de Acridina entre outros corantes (BROOKS et al., 2014).

O gênero é dividido em quatro grupos, de acordo com padrões antigênicos, morfológicos, moleculares e ecológicos: o Grupo Tifo, composto pelas espécies *Rickettsia prowazekii* e *Rickettsia typhi*, associadas com piolhos e pulgas; o Grupo da Febre Maculosa (GFM), composto por mais de 20 espécies associadas aos carrapatos em sua maioria; Grupo Bellii, representado pela *Rickettsia bellii* e o Grupo Canadenses, composto pela *Rickettsia canadenses* (PAROLA et al., 2013).

A Febre Maculosa, também conhecida como febre das montanhas rochosas, é uma enfermidade que tem como principal agente etiológico *Rickettsia rickettsii*, uma bactéria que parasita o endotélio vascular de seres humanos, animais domésticos e silvestres (SANGIONI, 2010). Essa espécie é considerada a mais letal, dentre as espécies do grupo da Febre Maculosa. Porém, em seres humanos, além da *R. rickettsii*, a patogenicidade de pelo menos 14 espécies do grupo da febre maculosa já foi relatada (*R. aeschlimannii*, *R. africae*, *R. akari*, *R. australis*, *R. conorii*, *R. felis*, *R. helvetica*, *R. honei*, *R. japonica*, *R. marmionii*, *R. mongolotimonae*, *R. parkeri*, *R. sibirica*, *R. slovacica*) (RAOULT; ROUX, 1997; RAOULT et al., 2002).

Os carrapatos *Dermacentor andersoni* e *D. variabilis* são os principais transmissores da *Rickettsia rickettsii* nos Estados Unidos, e carrapatos do complexo *Amblyomma cajennense* são os vetores mais comuns na América do Sul e Central, porém o carrapato *Rhipicephalus sanguineus*, também tem sido apontado como um vetor em algumas áreas do México e do estado do Arizona, nos Estados Unidos (DEMMA et al., 2005; EREMEEVA et al., 2011).

No Brasil, os carrapatos *A. cajennense* e *Amblyomma aureolatum* são os principais incriminados pela transmissão de *R. rickettsii* ao homem (SZABÓ et al. 2013a). A suspeita de uma terceira espécie de carrapato, *Rhipicephalus sanguineus*, estar envolvida na epidemiologia da enfermidade foi levantada por Piranda et al. (2008).

As manifestações clínicas mais comuns da enfermidade causada pela espécie *R. rickettsii* são febre, náuseas, vômitos, mialgia, anorexia e dores de cabeça. A taxa de letalidade é de 5-10% nos Estados Unidos e 10-40% no Brasil (GALVÃO et al., 2005).

O Diagnóstico de riquetsioses transmitidas por carrapatos, ainda, baseia-se, principalmente, na suspeita clínica (febre com ou sem erupção cutânea e / ou com ou sem papúla típica, no local da picada do carrapato) e detecção de anticorpos por técnicas sorológicas, como imunofluorescência indireta (IFI). Outras técnicas, como o cultivo e técnicas de biologia molecular, especialmente, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e sequenciamento subsequente, são incorporados em pesquisa (OTEO et al., 2014).

A reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) é o teste considerado como padrão-ouro para o diagnóstico dos agentes rickettsiais, e utiliza antígenos espécies-específicas de *Rickettsia*. É um teste sensível e rápido, porém é avaliado como uma técnica subjetiva (GALVÃO et al., 2005).

O diagnóstico molecular de *Rickettsia* se baseia na amplificação de um segmento do genoma que codifica o gene de antígeno 17 Kda, e/ou o gene da enzima citrato sintase (*gltA*), comum a todas as espécies de *Rickettsia*. Enquanto, os genes que codificam proteínas de superfície da membrana *Omp*, existem apenas nas espécies do Grupo da Febre Maculosa, como *OmpA* e *OmpB* (GALVÃO et al., 2005). A PCR também é realizada para a detecção de *Rickettsia* em artrópodes, assim como teste de imunofluorescência direta para triagem e o teste de hemolinfa (LA SCOLA; RAOULT, 1997).

### 2.1.1 *Rickettsia parkeri*

*Rickettsia parkeri* é uma espécie membro do Grupo da Febre Maculosa, isolada primeiramente em carrapatos da espécie *Amblyomma maculatum* Koch, 1844, coletados em gado na Costa do Golfo em 1937. Este patógeno causa em cobaios (*C. porcellus*) sintomas semelhantes à *R. rickettsii*, porém brandos e sem mortalidade (PARKER et al., 1939). Lackman et al. (1949) confirmaram estes sintomas, por meio de inoculação experimental de *R. parkeri* em cobaios, caracterizando febre branda por um curto período de tempo, testículos rosados com edema leve e sem letalidade nos animais. Enquanto os sintomas verificados em infecção por *R. rickettsii* demonstravam febre alta por longo período, edema escrotal com necrose local, em alguns casos, e mortalidade nos animais.

Nos Estados Unidos, *Amblyomma maculatum* é o principal vetor de *R. parkeri*, detectado em 8% - 43% dos carrapatos adultos, coletados ao longo da Costa do Golfo e na região do Atlântico Sul. No Uruguai, Brasil e Argentina, o patógeno foi detectado em carrapatos da espécie *Amblyomma triste* Koch, 1844 (PAROLA et al., 2013). Recentemente, Lado et al. (2014) detectaram pela primeira vez *Rickettsia parkeri* em carrapatos *Amblyomma tigrinum* Koch, 1844 e *Amblyomma dubitatum* Neumann, 1899 oriundos do Uruguai. No Brasil, Silveira et al. (2005) e Ogrzewalska et al. (2009) isolaram *Rickettsia parkeri* em carrapatos da espécie *Amblyomma triste* e *Amblyomma nodosum* Neumann, 1899, respectivamente, por meio da técnica de cultivo em células Vero.

Embora sua patogenicidade tenha sido suspeita para os seres humanos ou especulada durante décadas, somente 65 anos após seu isolamento, Paddock et al. (2004) relataram o primeiro caso reconhecido de infecção por *R. parkeri* em humanos (PAROLA et al., 2005). Desde esse relatório, casos confirmados da infecção por *R. parkeri* foram identificados nos estados de Mississippi e Virgínia nos Estados Unidos (SUMNER et al., 2007), Uruguai e Argentina (BARBIERI et al., 2014).

Em 2009, um novo agente rickettsial, denominado de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica, foi isolado a partir de amostra de pele no local do parasitismo do carrapato, de um paciente com uma doença febril exantemática, em área de Mata Atlântica, no estado de São Paulo. A cepa detectada apresentou alta similaridade filogenética com *R. africae*, *R. parkeri* e *R. sibirica* (SPOLIDORIO et al., 2010). Esta nova cepa vem sendo chamada pela comunidade científica de *R. parkeri* Cepa Mata Atlântica.

No ano seguinte, um segundo caso clínico foi reportado no estado da Bahia, nordeste do Brasil (BARBIERI et al., 2014) com manifestações clínicas semelhantes à relatada por Spolidorio et al. (2010). Esses dois casos foram caracterizados por febre média, lesão papular típica, conhecida como escaras de inoculação, sem relatos de mortes. Essas características muito se assemelham aos casos clínicos atribuídos a *R. parkeri*, no Uruguai e Argentina (BARBIERI et al., 2014).

Sabatini et al. (2010) detectaram este mesmo agente em 13,6% (8/59) dos carrapatos *A. ovale* Koch, 1844, e 1,9% (1/54) de *R. sanguineus* coletados no estado de São Paulo. Os autores sugeriram que o carrapato *A. ovale* é o vetor de *Rickettsia* sp. cepa Mata Atlântica neste estado. Medeiros et al. (2011) relataram a presença desta mesma cepa, também, no

estado de Santa Catarina, infectando *A. ovale*, *A. aureolatum* Pallas, 1772 e *R. sanguineus* coletados de animais domésticos e silvestres, em diferentes regiões da área de Mata Atlântica. Posteriormente, Szabó et al. (2013b) conseguiram isolar esta cepa em cultivo de células Vero, oriundas de carrapatos *A. ovale* coletados de cães do município de Peruíbe- SP.

Recentes trabalhos avaliando a transmissão experimental deste patógeno, por meio de vetores competentes, têm ajudado a fornecer informações sobre seu comportamento e biologia, além de elucidar aspectos da interação vetor-patógeno (NIERI, 2012; KRAWCZAK, 2012; BRUSTOLIN, 2014).

## 2.2 Relação *Rickettsia* - Argasídeos

Na América Latina, todas as espécies de carrapatos apontadas como vetores comprovados de *Rickettsia* estão inseridos dentro dos gêneros *Amblyomma*, *Rhipicephalus*, *Haemaphysalis* e *Dermacentor*, pertencentes à família Ixodidae. No caso das rickettsioses humanas, as principais espécies envolvidas como vetores na epidemiologia desta enfermidade são *Amblyomma cajennense*, *Amblyomma triste*, *Amblyomma ovale*, *Amblyomma aureolatum* e *Rhipicephalus sanguineus* (OTEO et al., 2014).

Na literatura, os relatos de infecção natural de argasídeos por *Rickettsia* spp. são pouco expressivos. No entanto, as espécies *Ornithodoros parkeri* e *Ornithodoros rostratus*, quando infectados experimentalmente com *R. rickettsii*, foram capazes de transmitir a infecção para animais susceptíveis, sugerindo um possível papel como vetores de agentes rickettsiais (PAROLA et al., 2013).

Loftis et al. (2005) isolaram em ninfas e adultos de *Carios kelleyi* Colley & Kohls 1941 coletados em prédios comunitários, em Jackson, Iowa, uma espécie de *Rickettsia* do Grupo da Febre Maculosa, intimamente relacionada com *Rickettsia peacockii* e *R. rickettsii*. Essa espécie de carrapatos é associada à habitats de morcegos, entretanto há relatos de parasitismo em humanos. Os autores conseguiram demonstrar a transmissão transestadial e transovariana deste patógeno, porém seu potencial patogênico é desconhecido. Rehacek et al. (1977) isolaram *Rickettsia slovacica*, também um patógeno do Grupo da Febre Maculosa, em *Argas persicus* coletados de ratazanas na Armênia.

*Rickettsia felis* e duas novas espécies de *Rickettsia* foram isoladas de carrapatos da espécie *Carios capensis* Neumann, 1901, coletados em pelicanos marrons, na Costa da Carolina do Sul. O DNA das espécies de *Rickettsia* spp. foi detectado em larvas não ingurgitadas, implicando em uma possível transmissão vertical do agente, por esta espécie de carrapato (REEVES et al., 2006). Dietrich et al. (2014) citaram a espécie *Carios capensis* como transmissor de *Rickettsia* spp. para aves marinhas de ilhas do Oceano Índico. Os autores também detectaram esta *Rickettsia* em carrapatos *Amblyomma loculosum* Neumann, 1907, coletados dos mesmos animais. Do total, 143 de 318 carrapatos testados, molecularmente, foram positivos para *Rickettsia* spp. correspondendo 47%  $\pm$  8% a carrapatos da espécie *A. loculosum* e 43%  $\pm$  8% a *C. capensis*. Os autores concluíram que estudos de genotipagem são necessários para caracterizar plenamente *Rickettsia* sp. identificada.

Recentemente, outra nova espécie foi descrita, isolada a partir de *Ornithodoros erraticus*, coletada de pombos em Portugal. A espécie foi denominada de *Rickettsia lusitaniae*, e apresentou similaridade genética com *Rickettsia felis* e *Rickettsia hoogstraalii* (MILHANO et al., 2014).

Socolovschi et al. (2012), utilizando ferramentas moleculares, detectaram uma espécie nova de *Rickettsia* em carrapatos da espécie *Argas vespertilionis*. Estes argasídeos foram coletados do piso de um sótão infestado de morcego, no sudoeste da França. A espécie está associada a abrigos de morcegos na Europa, África e Ásia e tem sido relatada na literatura parasitando seres humanos.

Lemos-Monteiro et al. (1932a) avaliaram a infecção experimental de *Rickettsia rickettsii* no carrapato *Ornithodoros rostratus* e *Argas persicus*, utilizando cobaias como hospedeiros experimentais. Os autores avaliaram o carrapato *O. rostratus* quanto à infecção do cobaio pelo carrapato infectado, duração do poder infectante pela picada do carrapato e poder infectante do líquido coxal. De acordo com o trabalho experimental, foi concluído que é possível, embora nem sempre, conseguir a infecção experimental de *O. rostratus* alimentando-o em cobaias, em fase infectante; o parasitismo de *O. rostratus* pode ser infectante para o cobaio após 13 dias de sua infecção; um carrapato que infecta o cobaio com 13 dias pode não infectar mais com o passar do tempo; no líquido coxal existem formas do patógeno com capacidade imunizante para os cobaias; e o período de incubação na infecção experimental pela picada do carrapato é mais longo que quando observado após injeção de formas infectantes, na cavidade peritoneal. A transmissão para o carrapato *Argas persicus* não foi alcançada.

### **2.3 Infecção por meio da alimentação artificial de agentes da família Rickettsiaceae**

As mudanças observadas na intensificação dos movimentos humanos e animais, combinadas com as mudanças socioeconômicas e ambientais, bem como a distribuição geográfica de várias espécies de carrapato, têm contribuído para a crescente ameaça global de doenças emergentes ou reemergentes, transmitidas por carrapatos (DANTAS-TORRES et al., 2012). Com isso, surge a necessidade imprescindível de novos estudos, que venham aprofundar o entendimento dos processos biológicos envolvidos na transmissão dos agentes patogênicos, transmitidos pelas diferentes espécies de carrapatos.

Na busca por métodos alternativos que ofereçam êxito nesses tipos de estudos, diversas metodologias têm sido elaboradas na tentativa de infectar carrapatos com patógenos. Uma delas é a injeção de patógenos através da cutícula, geralmente considerada não precisa ou pouco prática na infecção de rotina, devido à baixa taxa de sobrevivência dos carrapatos (KOCAN et al., 1986). A utilização da alimentação artificial de carrapatos, por meio de tubos repletos de suspensões infecciosas, ou mesmo membranas, possibilita e amplia estudos sobre a intrínseca relação entre patógeno-vetor. Esta técnica apresenta vantagens perante as demais, por permitir a avaliação direta da concentração de patógenos na amostra de sangue ingerido pelos carrapatos, além de permitir ensaios repetidos com um grande número de carrapatos (BONNET; LIU, 2012).

Tubos capilares demonstraram ser muito eficientes em estudos envolvendo a transmissão de patógenos, a partir de variações na técnica de alimentação artificial proposta por Chabaud (1950). Burgdorfer (1957) foi o primeiro a tentar a transmissão de um patógeno por meio da técnica de alimentação artificial por tubos capilares. Posteriormente, diversos trabalhos foram publicados descrevendo este tipo de estudo (ALEKSEEV, 1971; WALKER et al. 1979; INOKUMA; KEMP, 1998; FINGERLE et al., 2002; BROADWATER et al., 2009; KOKAN et al., 2005; BILLETER et al., 2012). Bonnet e Liu (2012) afirmaram que as técnicas de alimentação artificial, por meio de membranas são as melhores para estudos desse tipo, pois promovem condições de infecção ao carrapato, mais próximas da realidade que qualquer outro método.

Estudos de transmissão de patógenos por meio de alimentação artificial de espécies da família Rickettsiaceae, se restringem a Macaluso et al. (2001) e Goddard et al. (2012).

Macaluso et al. (2001) infectaram fêmeas, parcialmente, ingurgitadas do carrapato *Dermacentor variabilis* com *Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia rhipicephali*, cultivadas *in vitro*. Os autores avaliaram o volume da solução ingerida pelos carrapatos, a disseminação das riquetsias do intestino para outros órgãos e a ocorrência de transmissão transovariana. Para quantificar o volume médio da solução ingerida pelos carrapatos, utilizou-se aminoácido

marcado, diluído em meio BSK e suplementado com soro de coelho. Os tubos capilares foram posicionados sobre o aparelho bucal dos carrapatos. Após o período de 24 horas, à temperatura de 27 °C e umidade relativa de 92%, 15 de 18 carrapatos ingeriram volume médio entre 0,06 e 6,77 µL da solução. No entanto, a ingestão da solução não apresentou correlação positiva com o ganho de peso durante a alimentação. Nos experimentos envolvendo a transmissão de *R. rickettsii* e *R. rhipicephali* para fêmeas, parcialmente, ingurgitadas de *D. variabilis*, os autores submeteram os espécimes a alimentação artificial por um período 12 horas. Ao término da alimentação *in vitro*, os carrapatos foram infestados em coelhos para completarem o ingurgitamento. Foi observada a infecção por riquetsias no intestino, hemolinfa e glândula salivar de 40% dos carrapatos. A eficiência da transmissão transovariana de riquetsias em carrapatos foi verificada através da PCR em 85% e 69% dos carrapatos infectados por *R. rickettsii* e *R. rhipicephali*, respectivamente.

Goddard et al. (2012) avaliaram a sobrevivência de *Rickettsia parkeri* em percevejos (*Cimex* sp.), após a alimentação com sangue infectado de aves. Neste trabalho, dois grupos de 15 percevejos adultos e dois grupos de 15 percevejos de quarto instar foram alimentados com sangue infectado e não infectado. Duas semanas após a alimentação, dois *pools* de percevejos de cada grupo tiveram suas superfícies esterilizadas, foram macerados e colocados em cultura de células Vero, na tentativa de crescimento do organismo. O restante dos percevejos foi processado por reação em cadeia da polimerase, após muda. O resultado do estudo indicou que nenhum percevejo imaturo foi positivo na PCR, sugerindo que, possivelmente, os organismos não sobreviveram ao processo de muda. Após quatro semanas, nenhum organismo foi observado nas culturas de células de qualquer um dos grupos. No entanto, dois percevejos adultos foram positivos na PCR. Os autores concluíram que *Rickettsia parkeri* pode sobreviver em percevejos adultos por um período, porém a viabilidade do organismo não pôde ser determinada.

## 3 MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1 Local de execução do experimento

O experimento foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias, Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), localizado no prédio do Projeto de Sanidade Animal, situado no município de Seropédica -RJ.

### 3.2 Obtenção do inóculo de *Rickettsia parkeri*

A cepa At24 de *R. parkeri*, originalmente isolada do carrapato *Amblyomma triste*, no município de Paulicéia, estado de São Paulo, foi gentilmente cedida pelo Pesquisador Doutor Adriano Pinter dos Santos, da Superintendência de Controle de Endemias (SUCEN/SP), que mantém um cultivo bem estabelecido da espécie em seu laboratório.

### 3.3 Manutenção do isolado de *Rickettsia parkeri*

A cepa de *Rickettsia parkeri* utilizada como modelo para a infecção dos carrapatos eram mantidas em alíquotas de 1 mL em nitrogênio líquido. Para o seguinte estudo, uma alíquota foi descongelada e inoculada em um frasco de 75 cm<sup>2</sup> contendo monocamada de células Vero. O crescimento de *Rickettsia parkeri* foi mantido em monocamada de cultura de células Vero nutrida em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), suplementado com 5% de soro fetal bovino inativado, 1% de L-Glutamina, pH 7,45 em estufa a 30 °C. O crescimento do cultivo de *Rickettsia parkeri* foi acompanhado diariamente, a partir da coloração de Giménez (Giménez, 1964) e observado em microscopia óptica, até que a infecção estivesse em 100% das células, por volta do sexto ao sétimo dia.

No momento em que a monocamada apresentou-se 100% infectada, a cultura foi despreendida do fundo do frasco, transferida para um tubo falcon 15 mL e centrifugada a 400 xg por 10 minutos, à temperatura de 4 °C. O meio Dubecco's modified Eagle's medium (DMEM) foi totalmente retirado e as células ressuspensas em sangue de coelho, à concentração de 5 x 10<sup>5</sup> de células Vero infectadas com *R. parkeri*, por mL de sangue.

### 3.4 Manutenção dos animais

#### 3.4.1 Coelhos

Para a manutenção da colônia de *O. rostratus* foram utilizados coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) mestiços (Califórnia x Nova Zelândia), cedidos pelo setor de Cunicultura do Instituto de Zootecnia da UFRRJ, com idade de 60 a 90 dias, de ambos os sexos, pesando entre 1,5 a 3,0 kg e sem contato prévio com carrapatos ou produtos acaricidas. Os coelhos foram mantidos em gaiolas individuais, com comedouros e bebedouros, onde receberam ração peletizada e água *ad libitum*. Diariamente foi realizada a limpeza das gaiolas, para a remoção de sobras de ração, fezes e urina.

#### 3.4.2 Cobaias

Os Cobaias (*Cavia porcellus*), por serem considerados animais-modelo para estudos com riquetsias (WEISS; MOULDER, 1984) foram utilizados no experimento para alimentação dos carrapatos infectados por *R. parkeri*, por meio da alimentação artificial. Os animais escolhidos para o experimentos foram machos, brancos, com peso corporal

aproximado de 500 g. Estes foram oriundos de criadouro comercial, e permaneceram individualmente em caixas plásticas apropriadas, onde receberam ração e água à vontade, e, diariamente, foi realizada a higienização adequada dos recipientes.

### 3.5 Manutenção da colônia de *Ornithodoros rostratus*

Os carrapatos *O. rostratus* utilizados no experimento foram coletados na fazenda da Nhumirim da EMBRAPA- Pantanal, região da Nhecolândia, localizada no Pantanal do Mato Grosso do Sul (latitude 18° 59' S, longitude 56° 39' O). A partir dessa coleta, realizada no ano de 2012, foi estabelecida uma colônia de segunda geração de laboratório.

Para certificar que a colônia estava negativa para espécies do gênero *Rickettsia*, um pool de larvas e ninfas foi testado, por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR), usando como alvo o gene *ompA*. Essa avaliação resultou em produtos não amplificados.

A manutenção da colônia de carrapatos desta espécie foi realizada de acordo com Ribeiro et al. (2013). Os coelhos eram infestados com carrapatos na região dorsal, após tricotomia local. Os carrapatos eram mantidos em contato com a pele dos hospedeiros, por meio de contenção individual, até o momento da fixação. Após o desprendimento, as larvas, ninfas e adultos ingurgitados eram limpos e acondicionados em tubos de ensaio vedados com buchas de algodão. Todos os exemplares foram mantidos em condições controladas de  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e umidade relativa superior a 80%, para acompanhamento dos parâmetros biológicos relativos à fase não parasitária.

### 3.6 Grupos Experimentais

Foram utilizadas 42 ninfas de diferentes instares, com pesos homogêneos, divididas em três grupos. O grupo 1 foi direcionado para a avaliação da técnica de alimentação artificial, por meio de membranas de silicone na infecção *in vitro* de *R. parkeri* para ninfas de *Ornithodoros rostratus*, o grupo 2 foi utilizado para avaliar a capacidade de transmissão de *Rickettsia parkeri* por *O. rostratus* infectados artificialmente, quando ninfas, para cobaios e o grupo-controle. Dessa maneira, os grupos foram conduzidos da seguinte forma:

Grupo 1 - composto por 14 ninfas de *O. rostratus* alimentadas artificialmente com sangue de coelho, contendo  $5 \times 10^5$  de células VERO infectadas com *R. parkeri*;

Grupo 2 - composto por 14 ninfas de *O. rostratus* alimentadas artificialmente com sangue de coelho, contendo  $5 \times 10^5$  de células VERO infectadas com *R. parkeri*;

Grupo - controle - constituído por 14 ninfas alimentadas artificialmente com sangue de coelho, contendo  $5 \times 10^5$  de células VERO não infectadas.

### 3.7 Procedimentos experimentais

A infecção *in vitro* de *R. parkeri* para o carrapato *O. rostratus* foi realizada utilizando o sistema de alimentação artificial, por meio de membranas de silicone, previamente descrito no capítulo 1.

O sangue utilizado na alimentação foi coletado assepticamente da veia marginal da orelha de coelhos mantidos no biotério do Laboratório de Doenças Parasitárias. Esta fonte foi escolhida por ser a mais apropriada para a técnica de alimentação artificial da espécie em questão (vide capítulo 1). O anticoagulante utilizado nas amostras de sangue foi o citrato sódico.



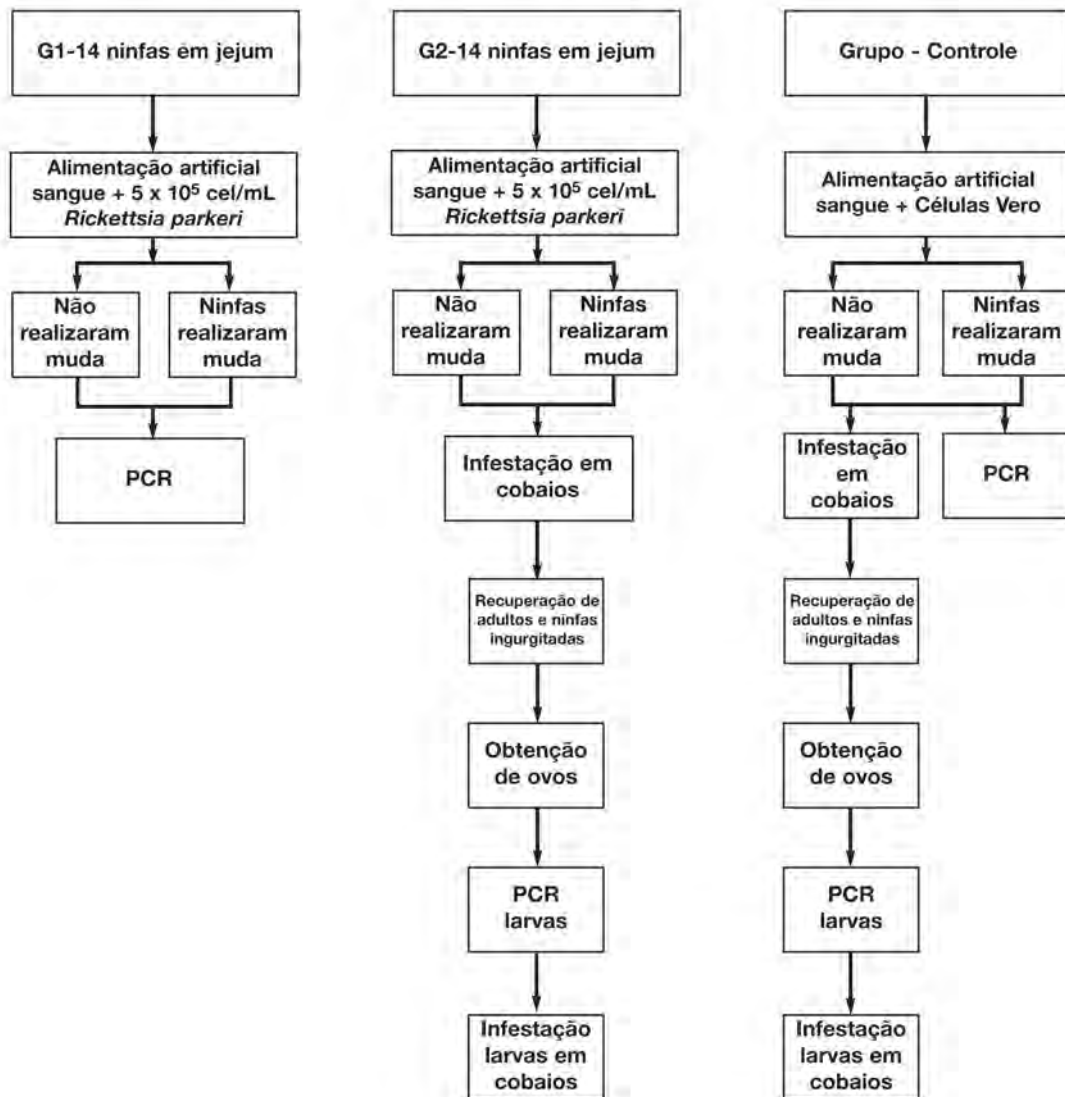
No momento inicial, as ninfas foram pesadas em balança analítica e submetidas à alimentação artificial, em um aparato alimentar repleto com o sangue disponibilizado, de acordo com seu tratamento experimental. Um aparelho banho-maria foi utilizado como fonte de calor e umidade para os aparatos. Neste estudo foi considerado 32 °C como temperatura ideal para viabilidade da *R. parkeri* e umidade relativa do ar 80-90%. Os três grupos foram trabalhados em momentos diferentes para evitar contaminações por aerossóis.

Ao final do período das respectivas alimentações, os carrapatos passaram por um protocolo de lavagem com solução de hipoclorito de sódio 1% e água destilada. Posteriormente, todos foram pesados em balança analítica para avaliação do ganho de peso. Essas ninfas foram então acondicionadas em tubos de ensaio vedados com buchas de algodão, identificadas e mantidas em B.O.D sob a temperatura de 27 °C e umidade relativa de 80%, para subseqüente visualização dos parâmetros referentes à ecdise.

Após a realização da ecdise, os exemplares do grupo experimental 1 foram conservados em RNAlater<sup>®</sup> até o momento da extração do DNA. Os carrapatos do grupo 2 permaneceram em descanso por um período de 30 dias, até que ocorresse a infestação nos cobaios. A avaliação da infecção dos animais alimentados com carrapatos foi realizada por meio da técnica de Imunofluorescência Indireta (considerada padrão ouro de diagnóstico da infecção) e pelos sinais clínicos apresentados pelos cobaios. O grupo- controle foi dividido para a referência padrão de cada grupo experimental, no qual sete carrapatos foram utilizados para realização da PCR e sete foram submetidos à alimentação em cobaios. Os cobaios foram observados de forma idêntica aos utilizados como hospedeiros do grupo infectado.

Após a alimentação nos cobaios, os carrapatos do grupo 2 foram acompanhados para a determinação do período de ecdise. As possíveis fêmeas (oriundas das ecdises de ninfas) foram alocadas em placas de Petri, com machos da colônia para a realização do acasalamento e acompanhamento da oviposição. Após a oviposição, foram coletados 60 mg de ovos (600 ovos), aproximadamente, de um *pool* de quatro fêmeas e divididos em quatro alíquotas de 15 mg cada. Duas alíquotas de larvas foram encaminhadas para a realização da técnica da PCR e duas para infestação em cobaios, para verificação de uma possível transmissão transovariana.

O fluxograma dos procedimentos experimentais pode ser verificado na Figura 8.



**Figura 8.** Fluxograma dos procedimentos experimentais

### 3.8 Procedimentos para avaliar a infecção *in vitro* de *Rickettsia parkeri* para ninfas de *Ornithodoros rostratus*

#### 3.8.1 Detecção de DNA de *R. parkeri* nos carrapatos infectados

As ninfas mantidas em RNAlater<sup>®</sup> foram lavadas em água destilada por três vezes e reidratadas em 200 µL de PBS (phosphate buffered saline). Em seguida foram adicionadas sete esferas de óxido de zircônio de 2 mm e 80 mg de esferas de vidro para a trituração em Minibeadbeater BIOSPEC<sup>®</sup> por 1 minuto. Para a extração do DNA foi utilizada a metodologia Fenol/Fenol-Clorofórmio (Anexo1). Em cada bateria de extração de DNA havia algumas amostras de carrapatos não infectados, utilizadas como controle.

A presença de DNA rickettsial foi detectada por reação em cadeia da polimerase (PCR) usando os primers CS-78 (GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT) e CS-323 (GCTTCCTTAAAATTCAATAAATCAGGAT) que amplifica um fragmento de 401 pb do gene rickettsial *gltA* (LABRUNA et al., 2004) e os primers *Rr190.70p* (ATGGCGAATATTTCTCCAAA) e *Rr190.602n*(AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT) que amplifica um fragmento de 532 pb do gene *ompA* (REGENERY et al., 1991). Em cada tubo de reação continha 3 µL de DNA (amostra padronizada a 100 ng/µL). As condições da PCR são encontradas no Quadro 1. Após o acréscimo do DNA, cada reação da PCR foi ao aparelho termociclador para ser processada segundo o protocolo específico para cada gene, conforme demonstrado no Quadro 2. Os produtos amplificados foram visualizados em gel de agarose 1,5% corados com brometo de etídio e visualizados sob a luz ultravioleta.

Reagentes	<i>gltA</i>	<i>OmpA</i>
Tampão “buffer” 10 X	2,5 µL	2,5 µL
Nucleotídeos trifosfatados (Dntp 2,5 mM)	2 µL	2 µL
MgCl <sub>2</sub> (50 mM)	1,25 µL	1,25 µL
<i>primers</i> (10 mM F+R)	2 µL	2 µL
<i>Taq Platinum</i> polimerase	0,15µL	0,15µL
H2O mili Q q.s.p.	14,2 µL	14,2 µL
TOTAL	25 µL	25 µL

**Quadro 1.** Volumes dos reagentes empregados na Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

<b>Etapas</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>
Desnaturação inicial	95 °C	5 minutos
Número de ciclos	40	
Desnaturação	95 °C	40 segundos
Anelamento	60 °C	45 segundos
Extensão	72 °C	45 segundos
Extensão Final	72 °C	5 minutos

**Quadro 2.** Protocolo do termociclador, de acordo com o gene alvo utilizado na PCR.

### **3.9 Procedimentos para avaliar a transmissão de *Rickettsia parkeri* pelo carrapato *Ornithodoros rostratus*, infectado artificialmente, para cobaias**

#### **3.9.1 Infestação em cobaias**

No total, foram utilizados nove cobaias machos, brancos, e sem histórico de contato com carrapato. Os estágios de ninfas e adultos de *O. rostratus* foram mantidos em contato com a pele dos hospedeiros, por meio de contenção individual, até o momento da fixação. Enquanto as larvas foram infestadas por meio da técnica de pano aderida ao dorso dos cobaias, adaptada de Neitz et al. (1971) (Figura 9).

Para a infestação dos carrapatos do grupo 2 (infectado) foram utilizados quatro cobaias e para as larvas em jejum, dois cobaias. Enquanto para o grupo-controle, foram utilizados dois cobaias para carrapatos adultos e ninfas e um cobaio para infestação de larvas. Em cada capuz foi colocado, aproximadamente, 15 mg de larvas de um *pool* de fêmeas de cada grupo (infectado e controle).

Ao final do experimento, os cobaias foram eutanasiados, autoclavados e descartados.

#### **3.9.2 Sinais clínicos**

A observação de sinais clínicos e a aferição da temperatura retal foram realizadas diariamente, do dia 0 ao 30° dia após infecção (DPI) (Figura 9).

#### **3.9.3 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)**

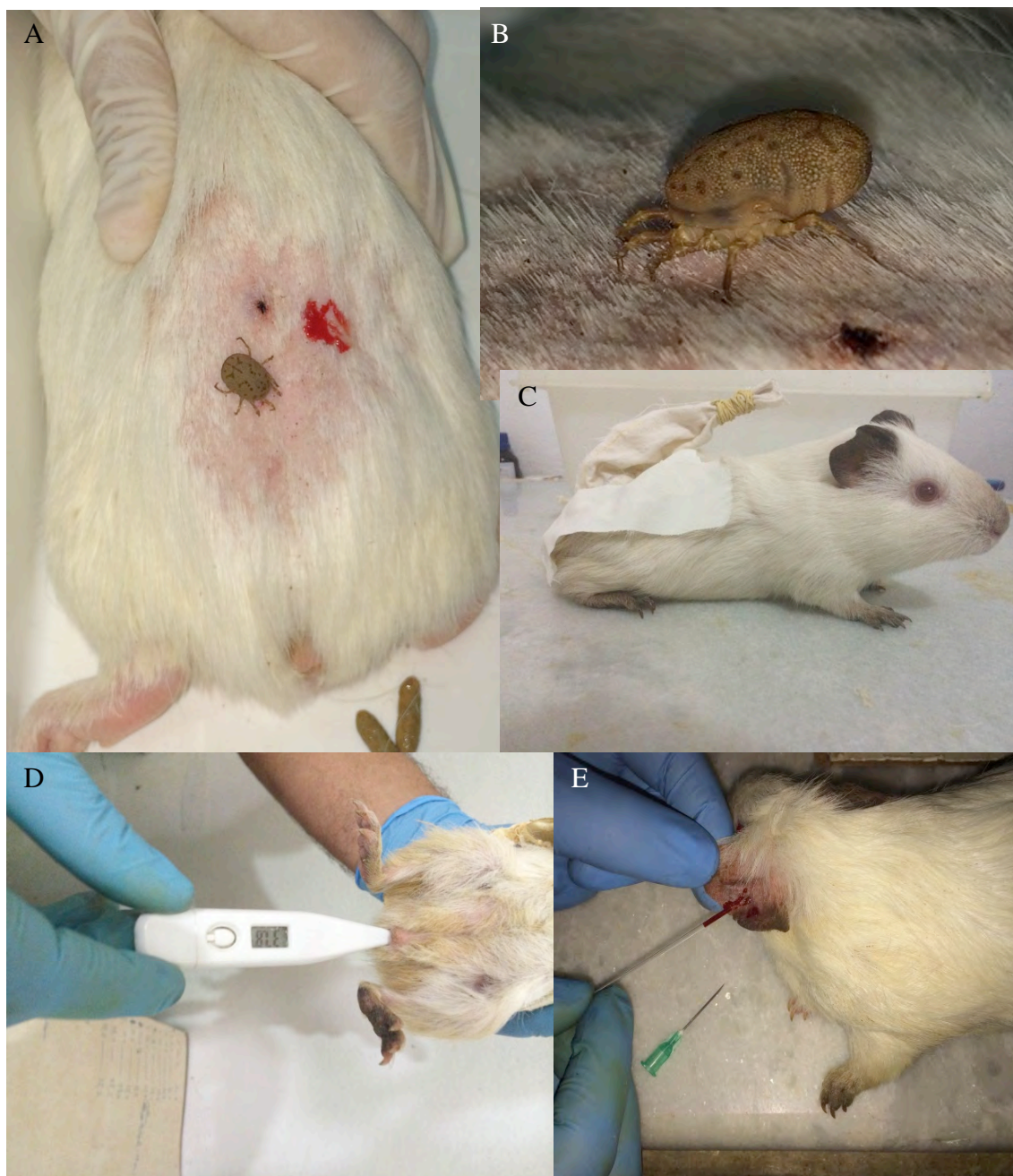
Amostras de sangue foram coletadas de cada cobaio, assepticamente, da veia marginal da orelha, ao 0, 5, 10, 15, 20 e 30° DPI (Figura 9). As reações foram realizadas utilizando-se lâminas confeccionadas com antígeno bruto de *R. parkeri*, cultivada em células Vero, conforme descrito por Horta et al. (2007) (adaptado) e o conjugado anti-Guinea pig IgG (KPL®). Os soros foram diluídos em PBS 1: 64. Dessa maneira, 10 µL do soro foram dispostos em cada poço das lâminas, essas foram armazenadas em câmara úmida, dentro de uma estufa bacteriológica sob 37 °C, durante 30 minutos. Após este tempo, as lâminas foram lavadas com PBS e secas ao ar. Depois da secagem, foram adicionados nos orifícios 10 µL de conjugado e armazenadas sob as mesmas condições, por mais 30 minutos. Em seguida, foram lavadas duas vezes por imersão, por 10 minutos, em uma cuba coberta por papel alumínio, para evitar a luminosidade. As lâminas foram secas ao abrigo da luz, sob a temperatura ambiente. Após, as lâminas foram montadas com glicerina tamponada e lamínula, para posterior leitura em microscópio equipado com luz ultravioleta. Os soros não reativos na diluição 1:64 foram considerados negativos.

### **3.10 Comitê de ética**

O experimento foi conduzido de acordo com o protocolo de princípios éticos em pesquisa animal, adotado pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e pelo comitê interno de ética na experimentação animal da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (protocolo número: 95/2014).

### **3.11 Análise estatística**

Os dados do presente estudo apresentaram distribuição normal. Todos os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA). As médias foram consideradas, significativamente, distintas quando  $P < 0,05$ . A escolha dos testes estatísticos foi realizada conforme Sampaio (2002).



**Figura 9.** Alimentação de carrapatos *Ornithodoros rostratus* infectados quando ninfas por *Rickettsia parkeri*, em cobaios e demais procedimentos experimentais. A e B) Alimentação de ninfas de *Ornithodoros rostratus* em cobaios; C) Infestação de larvas pela técnica do saco de pano; D) Aferimento da temperatura retal; E) Coleta de sangue por meio da veia marginal da orelha, com auxílio de tubos capilares

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 Avaliação da infecção *in vitro* de *Rickettsia parkeri* para ninfas de *Ornithodoros rostratus*

#### 4.1.1 Detecção de DNA de *Rickettsia parkeri* nos carrapatos infectados

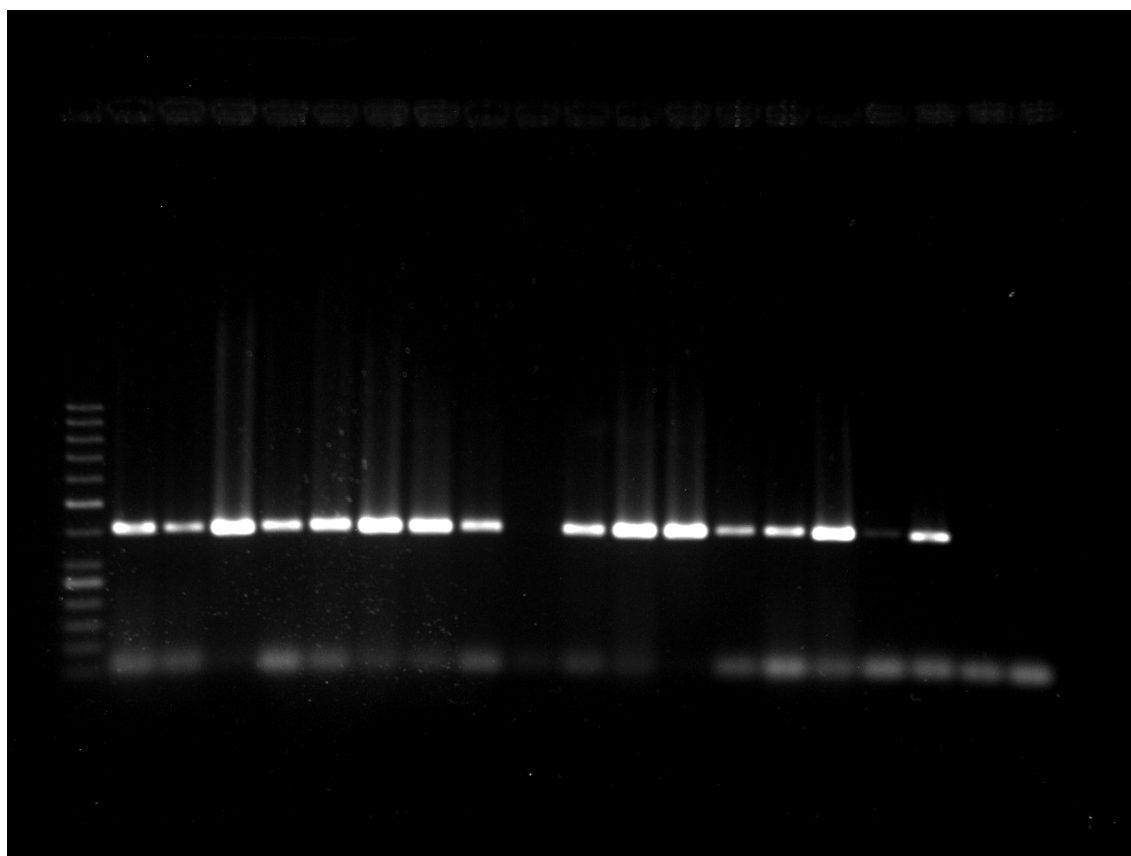
Este é o primeiro estudo sobre a transmissão experimental de *Rickettsia parkeri*, por meio de alimentação artificial para o carrapato *Ornithodoros rostratus*. O estudo elaborado por Goddard et al. (2012) foi o único na literatura que visou desenvolver técnicas para a transmissão experimental de *R. parkeri* por meio de alimentação artificial, contudo esse estudo se constituiu na avaliação de uma possível capacidade vetorial desse patógeno por percevejos.

Os resultados obtidos no presente estudo indicaram que *R. parkeri* pode persistir no carrapato *O. rostratus* alimentado artificialmente com sangue infectado, após a realização da ecdise. Este fato foi verificado por meio da realização da PCR em 14 amostras de carrapatos infectados do grupo1 (sete fêmeas, três machos, duas ninfas, uma ninfa que não realizou muda e uma ninfa morta). A técnica detectou positividade para 13 (92,8 %) e 7 (50 %) dos carrapatos infectados por meio artificial, utilizando os marcadores que amplificam os genes *gltA* e *ompA*, respectivamente (Tabela 8; Figura 10 e 11). Foi possível afirmar que não houve positividade em carrapatos do grupo-controle quando realizada a PCR, utilizando o marcador *ompA*. Desse modo, o estudo demonstrou que houve a transmissão transtadiária ninfa-ninfa e ninfa-adulto. Goddard et al. (2012) avaliaram de igual forma a transmissão artificial de *R. parkeri* em um vetor não incriminado. Os autores indicaram que nenhum percevejo imaturo foi positivo na PCR, sugerindo que, possivelmente, os organismos não sobreviveram ao processo de muda, entretanto foi verificado que em adultos houve a persistência do patógeno até duas semanas após a infecção, por meio de alimentação artificial. A avaliação da transmissão de *Rickettsia* spp. para o carrapato *O. rostratus*, desenvolvida por Lemos-Monteiro et al. (1932a), demonstrou que é possível, embora nem sempre, conseguir a infecção experimental de *O. rostratus*, alimentando-o em cobaias, em fase infectante, sendo menor o número de casos positivos que negativos. Os resultados do presente estudo podem ser confrontados com infecções experimentais que avaliaram a transmissão transtadiária de *R. parkeri* à espécies altamente susceptíveis, como *A. ovale* e *A. triste*, no Brasil. Esses estudos verificaram que houve 100% de transmissão transtadiária de *R. parkeri* cepa Mata Atlântica e *R. parkeri* cepa At 24, em *A. ovale* e *A. triste*, respectivamente (KRAWCZAK, 2012; NIERI, 2012).

A amostra de carrapato infectado considerada negativa pela técnica da PCR, utilizando o marcador do gene *gltA*, possivelmente não foi amplificada em função da presença de contaminantes observada em grande quantidade, durante a dosagem, utilizando espectrofotômetros. Enquanto a verificação da negatividade em carrapatos que foram testados pela técnica, utilizando *ompA* como gene alvo, pode ser explicada pela diferença de sensibilidade entre os marcadores moleculares utilizados.

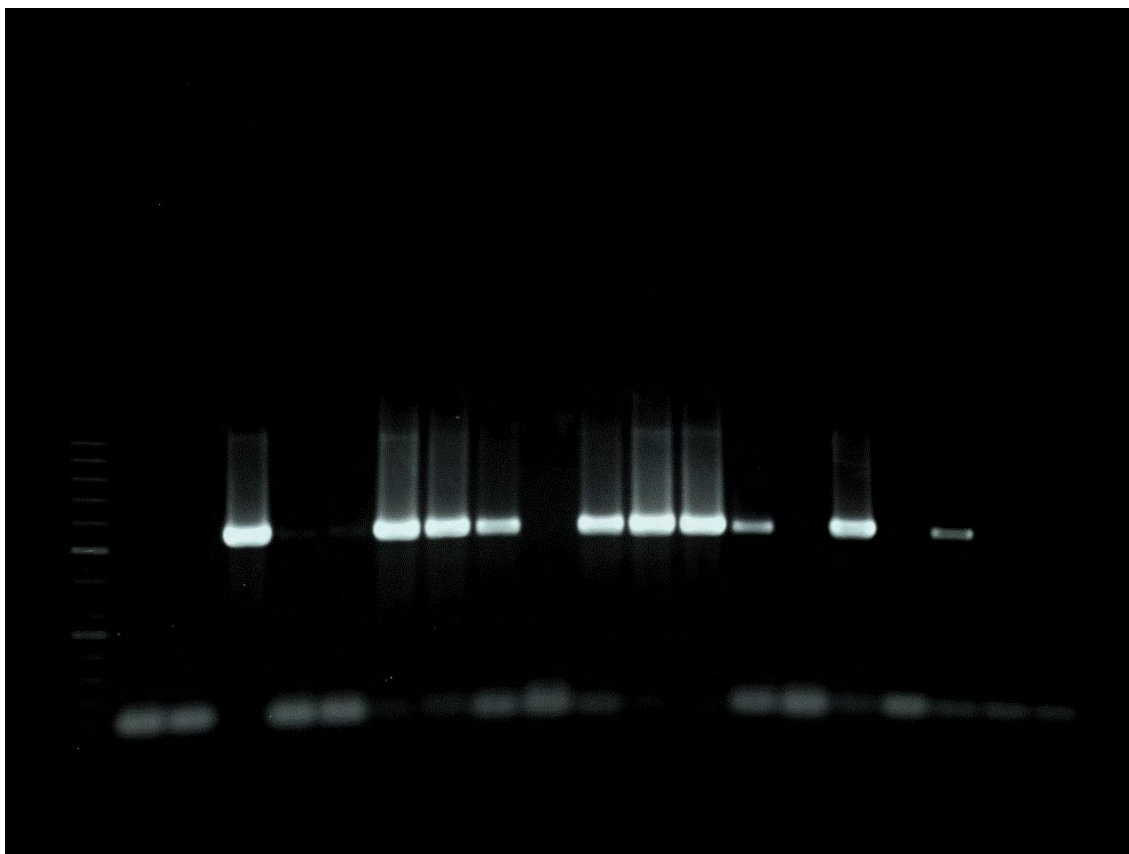
**Tabela 8.** Resultado da PCR de ninfas e adultos de *Ornithodoros rostratus* infectados por *Rickettsia parkeri*, por meio da alimentação artificial, após a realização da ecdise ninfal.

	N° carrapatos positivos/ N° carrapatos testados	
	Gene <i>gltA</i>	Gene <i>ompA</i>
Ninfa	2/2	1/2
Ninfa sem muda	0/1	1/1
Machos	3/3	2/3
Fêmeas	7/7	2/7
Morta	1/1	1/1
Total	13/14	7/14



**Figura 10.** Gel de agarose 1,5% com padrão de peso, controles negativos (C- 19, 20), positivos (C+18), 14 amostras oriundas da infecção artificial de *Ornithodoros rostratus* por *Rickettsia parkeri* (2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,14,15,16,17) com 13 bandas amplificadas para o gene *gltA* e 2 (8, 13) amostras de carrapatos infectados





**Figura 11.** Gel de agarose 1,5% com padrão de peso, controles negativos (C- 19, 20), positivos (C+18), 14 amostras oriundas da infecção artificial de *Ornithodoros rostratus* por *Rickettsia parkeri* (2,3,4,5,6,7,9,10,11,12,14,15,16,17) com 7 bandas amplificadas para o gene *ompA* e 2 (8, 13) amostras de carrapatos infectados

## **4.2 Avaliação da transmissão de *Rickettsia parkeri* pelo carrapato *Ornithodoros rostratus*, infectado artificialmente, para cobaios**

### **4.2.1 Infestação e sinais clínicos em cobaios**

Trinta dias após a ecdise, os carrapatos oriundos da infecção *in vitro* foram alimentados em quatro cobaios. A alimentação dos carrapatos nos cobaios se apresentou da forma esperada, por ser esta uma espécie já descrita como hospedeiro deste carrapato em trabalhos experimentais (GUGLIELMONE; HADANI, 1980). O bom desempenho obtido na alimentação em cobaios é reforçado pela pouca especificidade parasitária relatada para *O. rostratus*. Não foram observadas mortes após o período de ecdise dos carrapatos. Esse fato evidencia que a infecção do carrapato por *R. parkeri* não provocou efeito letal sobre sua biologia. O cobaio demonstrou ser um hospedeiro eficiente para alimentar carrapatos da espécie, e isso contribuiu de forma positiva para a avaliação da infecção dos carrapatos infectados por *R. parkeri*, por meio da alimentação artificial.

Para a avaliação dos sinais clínicos nos cobaios, foi verificada a temperatura retal, apetite, consumo de água e observação de possíveis edemas e/ou eritemas escrotais. Apenas um cobaio utilizado como hospedeiro para o grupo de carrapatos infectados apresentou febre (acima de 39,5 °C), por um período de dois dias (9º e 14º dia) após a infestação. Os demais

animais não apresentaram febre, porém as temperaturas dos animais que receberam os carrapatos infectados apresentaram diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), quando comparadas aos animais do grupo-controle. A média das temperaturas aferidas dos animais infestados com os carrapatos do grupo 2 foi de 38,5 °C (36,1 – 39,6), enquanto dos infestados com o grupo-controle foi 38 °C (36,9 – 38,6) (Figura 12). Parker et al. (1939) e Lackman et al. (1949) observaram um leve aumento da temperatura retal e edema escrotal, quando utilizaram os mesmos hospedeiros em infecções experimentais com o patógeno. Os coelhos utilizados para alimentação de *A. triste* e *A. ovale*, vetores naturais *R. parkeri* (cepa At 24 e cepa Mata Atlântica) no Brasil, não adoeceram e nem apresentaram sintomas clínicos indicativos da enfermidade, no entanto, os autores atribuem este fato a fatores intrínsecos do próprio hospedeiro (NIERI, 2012; KRAWCZAK, 2012).

A presença de testículos rosados, edema escrotal e ponto de necrose (Figura 14), sugerindo reação escrotal em cobaios, foi verificada a partir do 7º dia, em três dos quatro cobaios infestados com carrapatos do grupo 2, assim como perda de apetite, semelhante às características observadas por Lackman et al. (1949).

Foram verificadas em dois cobaios lesões semelhantes às relatadas pelo parasitismo de carrapatos infectados por *Rickettsia*, conhecida como escaras de inoculação ou lesão papular (PAROLA et al., 2013). Essas lesões foram observadas até o 15º dia após a infecção (Figura 14). No grupo-controle não foi verificado nenhum dos sinais citados.

As quatro fêmeas alimentadas nos cobaios foram separadas após a coleta e expostas aos machos, para que ocorresse o acasalamento. Seguida a oviposição, as posturas foram aliquotadas em forma de *pool* e deixadas em descanso, por um período médio de 25 dias pós-eclosão larval, para posterior infestação em cobaios. A técnica adaptada de Neitz et al. (1971), utilizada para infestar as larvas de *O. rostratus* em cobaios, demonstrou ser eficiente e se ajustou às condições experimentais. A recuperação se iniciou em algumas horas, até a finalização do ingurgitamento de todos os espécimes. Foram recuperadas 98 larvas ingurgitadas do cobaio 1 e 98 do segundo cobaio, enquanto no grupo-controle essa recuperação foi de 87 larvas.

Nenhum animal infestado por larvas apresentou febre ou sinais clínicos característicos da enfermidade. As médias das temperaturas aferidas dos animais infestados com as larvas do grupo 2 e controle não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) (Figura 13).

#### 4.2.2 Reação de imunofluorescência indireta (RIFI)

A Reação de Imunofluorescência indireta (RIFI) é o teste considerado como padrão-ouro para o diagnóstico dos agentes rickettsiais (GALVÃO et al., 2005). Dessa forma, foi utilizado para validar a transmissão *R. parkeri* para cobaios por larvas, ninfas e adultos de *O. rostratus* infectados quando ninfas, por meio artificial.

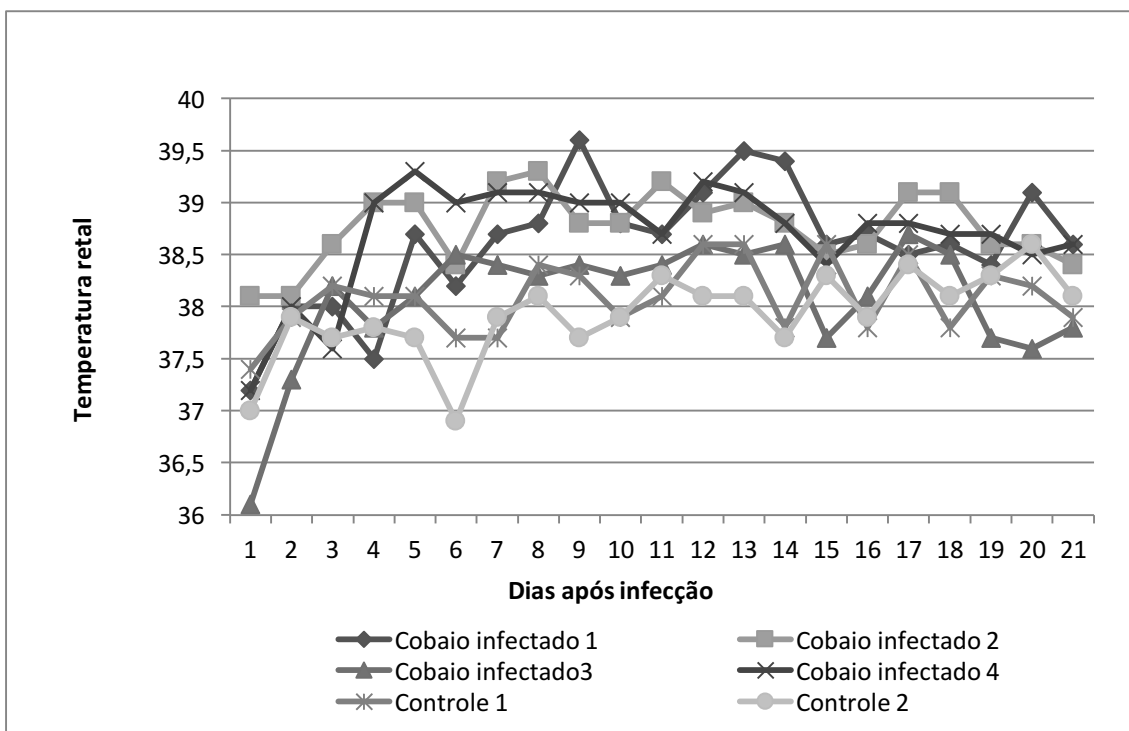
As análises sorológicas, por meio da RIFI, demonstraram que 100% (4/4) dos animais que receberam ninfas e adultos infectados apresentaram anticorpos reativos a partir do 15º dia PI até o 30º dia PI. Esses resultados confirmam os sinais clínicos apresentados pelos cobaios.

Os dados do presente estudo evidenciaram a possibilidade de transmissão de *R. parkeri* por meio de carrapatos *O. rostratus* infectados quando ninfas para os cobaios. Esses dados acrescentam os estudos desenvolvidos por Lemos-Monteiro et al. (1932a), o qual consideraram que a transmissão experimental de *R. rickettsii* por carrapatos *O. rostratus* pode ser infectante para o cobaio, após o 13º dia de sua infecção, e que um carrapato que infecta o cobaio com 13 dias pode não infectar mais com o passar do tempo, ou que nem todo o parasitismo dessa espécie possa transmitir o patógeno.

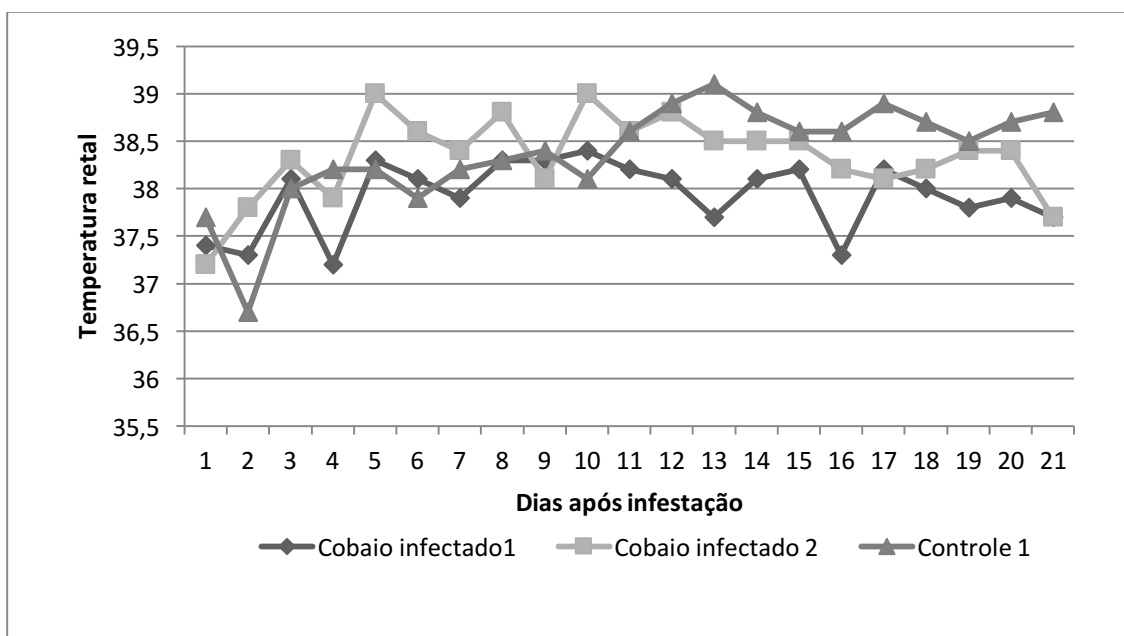
Krawczak (2012) e Brustolin (2014) averiguaram, por meio da RIFI, a transmissão experimental de *R. parkeri* (cepa Mata Atlântica) para hospedeiros susceptíveis por vetores naturais infectados pelo patógeno. Os autores concluíram, por meio desses estudos, que larvas e ninfas de *A. ovale* possuem alta competência vetorial, observando a soroconversão de 80% (8/10) dos coelhos infestados com ninfas e 100% de cobaios infestados por larvas e ninfas infectadas de *A. ovale*, respectivamente. Entretanto, Krawczak (2012) verificou que adultos de *A. ovale* não apresentaram a mesma capacidade, soroconvertendo, apenas, metade dos coelhos infestados.

No presente estudo, foi verificado que 100% (2/2) dos animais infestados com larvas oriundas dessas fêmeas não soroconverteram. As amostras de larvas em jejum, submetidas à técnica de reação em cadeia da polimerase, provenientes das fêmeas infectadas, apresentaram-se negativas, não amplificando bandas para o gene *ompA*. Este fato confirma a ausência da soroconversão nas amostras de cobaios infestados com larvas. Dessa forma, não foi observada a transmissão transovariana nesse estudo. Piranda (2008) afirma que a transmissão transovariana depende do grau de infecção nos tecidos do ovário, quando maciça a transmissão se dá com sucesso (100%), e quando branda essa taxa pode variar. Quantificar o volume ingerido pelos carrapatos durante a alimentação pode ser uma forma de conhecer e testar a dose infectante, para estudos envolvendo a transmissão de patógenos. Macaluso et al. (2001) obtiveram sucesso na técnica de transmissão de *Rickettsia* para ovos e larvas de carrapatos *D. variabilis*. Observada por meio da reação em cadeia da polimerase, a infecção foi detectada em 85% e 69% dos ovos das fêmeas expostas à *R. montana* e *R. rhipicephali*, respectivamente. Os autores utilizaram a técnica da alimentação artificial para avaliar a eficiência da transmissão transovariana de espécies de *Rickettsia* por carrapatos infectados artificialmente e quantificaram o volume ingerido por meio da incorporação de aminoácidos radiomarcados. Foi verificado que a ingestão de líquido não se correlacionou com o ganho de peso, durante alimentação artificial.

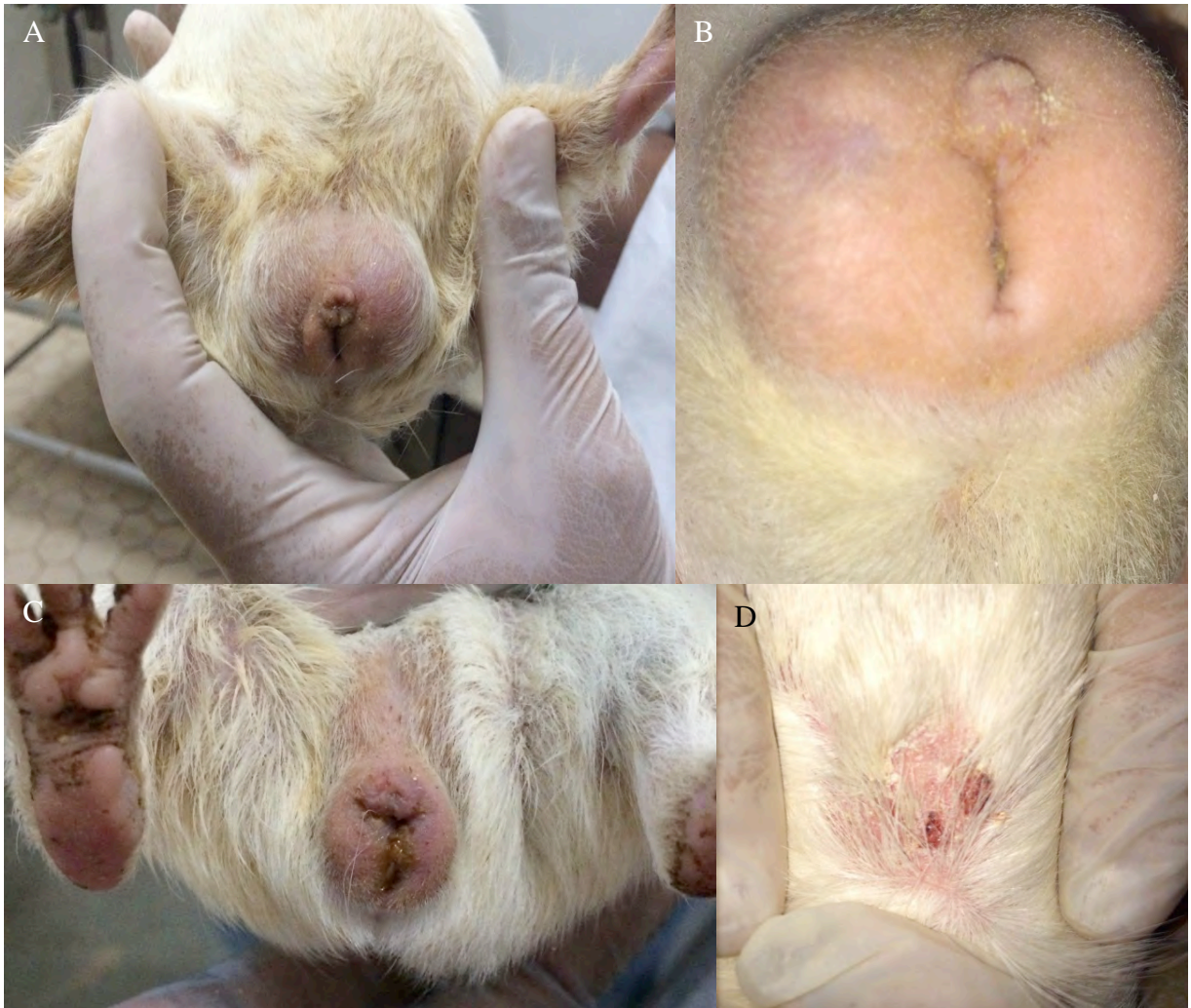
Entretanto, diversos outros fatores podem estar interligados a não ocorrência da transmissão transovariana, no presente estudo, como número de carrapatos testados, a fisiologia do vetor ou até a coinfeção de possíveis espécies do gênero *Rickettsia* não patogênicas, que possam vir a interferir na transmissão transovariana da *R. parkeri* (MACALUSO et al., 2002).



**Figura 12.** Valores da temperatura retal aferida em cobaios infestados com ninfas e adultos de *Ornithodoros rostratus* infectados com *Rickettsia parkeri* na fase ninfal por meio de alimentação artificial



**Figura 13.** Valores da temperatura retal aferida em cobaios infestados com larvas de *Ornithodoros rostratus* infectadas com *Rickettsia parkeri* na fase ninfal por meio de alimentação artificial



**Figura 14.** A e B) Edema escrotal e ponto de necrose sugerindo reação escrotal em cobaios infestados com ninfas e adultos de *Ornithodoros rostratus* infectados artificialmente por *Rickettsia parkeri* quando ninfas; C) Testículos de cobaio infestado com carrapatos não infectados (controle); D) Lesões semelhantes a escaras típicas de inoculação em cobaios, deixadas no local da fixação do carrapato *Ornithodoros rostratus* infectado

Embora *O. rostratus* nunca tenha sido relatado como vetor de *Rickettsia parkeri*, este modelo de estudo, envolvendo a transmissão do patógeno, por meio de alimentação artificial para o carrapato, demonstrou ser uma ferramenta útil para estudos envolvendo a interação vetor-patógeno.

Ressalta-se que a real probabilidade de carrapatos desta espécie adquirirem este agente, de forma natural, é relativa. Por outro lado, este trabalho desperta o interesse de considerar maiores estudos na transmissão de agentes patogênicos por carrapatos da família Argasidae, pelo fato de poucos trabalhos serem encontrados na literatura, observando a importância da transmissão de espécies do gênero *Rickettsia* por esses carrapatos.

## 5 CONCLUSÕES

O sistema de alimentação artificial por meio de membranas de silicone foi capaz de promover a infecção *in vitro* de *R. parkeri* para ninfas do carrapato *O. rostratus*.

Foi determinado que ninfas e adultos da espécie *O. rostratus* infectada artificialmente, possuem poder infectante para cobaias, os quais foram avaliados clinicamente e por meio de sorologia.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBASSY, M.M.; STEIN, K.J.; OSMAN, M. Artificial Feeding Technique for Experimental Infection of *Argas* Ticks (Acari: Argasidae). *Journal of Medical Entomology*, v. 31, n.2, p. 202-202, 1994
- ABEL, I. *Alimentação artificial de fêmeas de Amblyomma cajennense (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) através de tubos capilares*. 2004. 56f. Tese de Doutorado. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro.
- AESCHLIMANN, A.; GRANDJEAN, O. Observations on fecundity in *Ornithodoros moubata*, Murray (IXODOIDEA: ARGASIDAE). Relationships between mating and oviposition. *Acarologia*, t. XV, fasc. 2, p. 206-21, 1973.
- ALEKSEEV, A.N. Artificial dosaged feeding of *Ixodes persulcatus* Sch. ticks the main vectors of tickborne encephalitis. *Parazitologiya*, v. 5, n. 5, p. 392-400, 1971.
- ALMEIDA, A.P.; LEITE, R.C.; LABRUNA, M.B. Pesquisa de *Rickettsia* spp, *Borrelia* spp. e agentes da família Anaplasmataceae em *Ornithodoros rostratus* (ACARI: ARGASIDAE) pela técnica da PCR, na região do Pantanal – Brasil. *Suplemento Boletim Epidemiológico Paulista*, v. 6, n. 8, p. 40, 2009.
- ALMEIDA, A.P.; MARCILI, A.; LEITE, R.C.; NIERI-BASTOS, F.A.; DOMINQUES, L.N.; MARTINS, J.R.; LABRUNA, M.B. Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). *Ticks and Tick Borne Disease*, v. 3, p. 203–206, 2012.
- ARAGÃO, H.; FONSECA, F. Ixodological notes. VIII. List and key to the representatives of the Brazilian ixodological fauna [in Portuguese]. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 59, p. 115-29, 1961.
- ARAGÃO, H.B. Comissão de Linhas Telegráficas Estratégicas de Matto-Grosso ao Amazonas. Publicação: 36, *Zoologia Ixodidas*, anexo n. 5, p. 1-19, 1916.
- ARAGÃO, H.B. Ixidodidas brasileiros e de alguns países limitrophes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 31, p. 759-844, 1936.
- ARAGÃO, H.B. Notas sobre ixódidas brasileiros. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 3, n. 2, p. 145-195, 1911.
- ARAGÃO, H.B. Notas sobre os *Ornithodoros rostratus*, *O. brasiliensis* e *O. turicata*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 25, n. 3, p. 227-236, 1931.
- BALASHOV, Y. S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) – vectores of diseases of man and animals. *Miscellaneous publications of the Entomological Society of America*, v. 8, n. 5, p. 162-376, 1972.
- BARBIERI, A. R.; JONAS FILHO, M.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOUZA, J. C.; SZABÓ, M. P.; LABRUNA, M. B. Epidemiology of *Rickettsia* sp. strain Atlantic rainforest in a spotted fever-endemic area of southern Brazil. *Ticks and tick-borne diseases*, v. 5, n. 6, p. 848-853, 2014.

BARRE, N.; APRELON, R.; EUGENE, M. Attempts to feed *Amblyomma variegatum* ticks on artificial membranes. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 849, p. 384–390, 1998.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOARES, J.F.; MARCILI, A.; FAMADAS, K. M.; FACCINI, J. L. H.; DOYLE, R. L.; MARTINS, J.R.; RECK, Jr. J.; GUGLIELMONE A. A.; LABRUNA, M. B. *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae): description of larva, redescription of male and female, and neotype designation. *Zootaxa*, v. 3178, p. 22-32, 2012.

BARROS-BATTESTI, D.M.; ARZUA, M.; BECHARA, G.H. *Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies*. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223 pp.

BARROS-BATTESTI, D.M.; RAMIREZ, D.G.; LANDULFO, G.A.; FACCINI, J.L.H.; DANTAS-TORRES, F.; LABRUNA, M. B.; VENZAL, J.M.; ONOFRIO, V.C. Immature argasid ticks: diagnosis and keys for Neotropical region. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 22, n. 4, p. 443-456, 2013.

BECK, A.F.; HOLSCHER, K.H.; BUTLER, J.F. Life cycle of *Ornithodoros turicata americanus* (ACARI: ARGASIDAE) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology*, v. 23, n. 3, p. 313-319, 1986.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (ACARIDA: IXODIDAE): (Influence of tick size on egg production). *Acarology*, v. 16, n. 1, p. 52-61, 1974.

BILLETER, S.A.; KASTEN, R.W.; KILLMASTER, L.F.; BREITSCHWERDT, E.B.; LEVIN, M.L.; LEVY, M.G.; KOSOY, M.Y.; CHOMEL, B.B. Experimental infection by capillary tube feeding of *Rhipicephalus sanguineus* with *Bartonella vinsonii* subspecies *berkhoffii*. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases*, v. 35, n. 1, p. 9–15, 2012.

BONNET, S.; BRISSEAU, N.; HERMOUET, A.; JOUGLIN, M.; CHAUVIN, A. Experimental in vitro transmission of *Babesia* sp. (EU1) by *Ixodes ricinus*. *Veterinary Research*, v. 40, n. 3, 21, 2009.

BONNET, S.; JOUGLIN, M.; MALANDRIN, L.; BECKER C.; AGOULON, A.; L'HOSTIS, M.; CHAUVIN, A. Transstadial and transovarial persistence of *Babesia divergens* DNA in *Ixodes ricinus* ticks fed on infected blood in a new skin-feeding technique. *Parasitology*, v. 134, p. 197-207, 2007.

BONNET, S.; LIU, X.Y. Laboratory artificial infection of hard ticks: a tool for the analysis of tick-borne pathogen transmission. *Acarologia*, v. 52, p. 453–464, 2012.

BOUWKNEGT, C.; VAN RIJN, P.A.; SCHIPPER, J.J.M.; HÖ LZEL, D.; BOONSTRA, J.; NIJHOF, A.M.; VAN ROOIJ, E.M.A.; JONGEJAN, F. Potential role of ticks as vectors of bluetongue virus. *Experimental and Applied Acarology*, v. 52, p. 183–192, 2010.

BROADWATER, A.H.; SONENSHINE, D.E.; HYNES, W.L.; CERAUL, S.; DE SILVA, A.M. Glass capillary tube feeding: A method for infecting nymphal *Ixodes scapularis* (Acari:



Ixodidae) with the Lyme Disease Spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Journal of Medical Entomology*, v. 39, p. 285-292, 2009.

BROOKS, G. F.; CARROLL, K. C.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A.; MIETZNER, T. A. *Microbiologia Médica de Jawetz, Melnick & Adelberg*. 26. Ed. Porto Alegre: AMGH, 2014. 872p.

BROWN, S.J. Pathological consequences of feeding by haematophagous arthropods: comparison of feeding strategies. *American Entomologist*, v. 72, p. 4-14, 1989.

BRUMPT, E. Biologia de alguns Ixodídeos Brasileiros, I- *Ornithodoros rostratus* de Beaufort- Aragão. *Annaes Paulista de medicina e cirurgia*, v. 4, n. 2, p. 25-29, 1915.

BRUSTOLIN, J. M. *Infecção experimental de Rickettsia parkeri (cepa mata atlântica) em Cavia porcellus*. 73f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2014.

BURESOVA, V.; FRANTA, Z.; KOPACEK, P.A. Comparison of Chryseobacterium indologenes pathogenicity to the soft tick *Ornithodoros moubata* and hard tick *Ixodes ricinus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 3, p. 96-104, 2006.

BURGDORFER, W. Artificial feeding of ixodid ticks for studies on the transmission of disease agents. *Journal of Infectious Diseases*, v. 100, n. 3, p. 212-214, 1957.

BURGDORFER, W. Hemolymph test. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 19, p. 1010-1014, 1970.

BUTLER, J.F.; HESS, W.R.; ENDRIS, R.G.; HOLCHER, K.H. In vitro feeding of Ornithodoros ticks for rearing and assessment of diseases transmission. In Griffiths D.A.; C.E. Bowman (ed.), *Acarology VI*, Vol 2. Ellis Horwood, West Sussex, England, p. 1075-1081, 1984.

CAMICAS, J.L., HERVY, J.P.; ADAM, F.; MOREL, P.C. *Les tiques du monde. Nomenclature, stades décrits, hôtes, répartition (Acarida, Ixodida)*. Orstom, Paris, 1998.

CAMICAS, J.L.; MOREL, P.C. Position systématique et classification des tiques (Acarida: Ixodida). *Acarologia*, v. 18, p. 410-420, 1977.

CANÇADO, P.H.; PIRANDA, E.M.; MOURÃO, G.M.; FACCINI, J.L. Spatial distribution and impact of cattle-raising on ticks in the Pantanal region of Brazil by using the CO<sub>2</sub> tick trap. *Parasitology Research*, v. 103, p. 371-7, 2008.

CANÇADO, P. H. D. *Carrapatos de Animais Silvestres e Domésticos no Pantanal Sul Mato-grossense (Sub-região da Nhecolândia): Espécies, Hospedeiros e Infestações em Áreas com Manejos Diferentes*. 2008, 65f. Tese (doutorado). Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2008.

CARMICHAEL, J.R.; FUERST, P.A. Molecular Detection of *Rickettsia bellii*, *Rickettsia montanensis*, and *Rickettsia rickettsii* in a *Dermacentor variabilis* Tick from Nature. *Vector-borne and Zoonotic Diseases*, v. 10, n. 2, p. 111-5, 2010.

CHABAUD, A. G. Sur la nutrition artificielle des tiques. *Annales de Parasitologie Humaine et Comparee*, v. 25, n. 1-2, p. 42-47, 1950.

CLIFFORD, C.M.; KOHLS, G.M.; SONENSHINE, D.E. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). I. The genera and subgenera. *Annals of the Entomological Society of America*, v. 57, p. 429–437, 1964.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, B.B.; OTRANTO, D. Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. *Trends in parasitology*, v. 28. p. 437–446, 2012.

DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V.C; BARROS-BATTESTI, D.M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. *Systematic & Applied Acarology*, v. 14, p. 30-46, 2009.

DAVIS, E.L.; BUTLER, J.F.; ROBERTS, R.H.; REINERT, J.F.; KLEINE, D.L. Laboratory blood feeding of *Culicoides mississippiensis* (Diptera: Ceratopogonidae) through a reinforced membrane. *Journal of Medical Entomology*, v. 20, p. 177-182, 1983.

DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PENA, A.; VENZAL, J.M.; KOCAN, K.M.; SONENSHINE, D.E. Overview: Ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. *Frontiers in bioscience: a journal and virtual library*, v. 13, p. 6938-6946, 2007.

DE LA VEGA, R.; CAMEJO, A.; FONSECA, A. H. An automatic system to feed ticks through membranes. *Revista de Salud Animal*, v. 26, n. 3, p. 202-205, 2004.

DE LA VEGA, R.; DIAZ, G.; FINLAY, L. Artificial Feeding in *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) through micropipettes. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 916, n. 1, p. 315-319, 2000.

DEMMA, L.J.; TRAEGER, M.D.; NICHOLSON, W.L.; PADDOCK, C.D.; BLAU, D.M.; EREMEEVA, M.E.; DASCH, G.A.; LEVIN, M.L.; SINGLETON, J.; ZAKI, S.R.; CHEEK, J.E.; SWERDLOW, D.L.; MCQUISTON, J.H. Rocky Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *The New England Journal of Medicine*, v.353, n. 6, p. 587-594, 2005.

DIETRICH, M.; LEBARBENCHON, C.; JAEGER, A.; LE ROUZIC, C.; BASTIEN, M.; LAGADEC, E.; ... & TORTOSA, P. *Rickettsia* spp. in Seabird Ticks from Western Indian Ocean Islands, 2011–2012. *Emerging infectious diseases*, v. 20, n. 5, p. 838 - 842, 2014.

EL SHOURA, M.S. The life cycle of *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* (ACARI: IXODOIDEA: ARGASIDAE) in the laboratory. *Journal of Medical Entomology*, v. 24, n. 2, p. 229-234, 1987.

EREMEEVA, M.E.; ZAMBRANO, M.L.; ANAYA, L.;BEATI, L.;KARPATHY, S.E.;SANTOS-SILVA, M.M.; et. al. *Rickettsia rickettsii* in *Rhipicephalus* ticks, Mexicali, Mexico. *Journal of Medical Entomology*, v. 48, p. 418–21, 2011.

ESTRADA- PEÑA, A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission. *Experimental and Applied Acarology*, v .23, p. 685-715, 1999.

FILIPPOVA, N.A. *Argasid ticks (Argasidae)*. Fauna SSSR 4 (3), Nauka, Moscow, Zoological Institute, Leningrad, p. 255, 1966. In Russian.

FINGERLE, V.; RAUSER, S.; HAMMER, B.; KAHL, O.; HEIMERL, C.; SPECHTEL, U.; GERN, L.; WILSKE, B. Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of

- different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in artificially infected I nymphs. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 40, p. 1456–1463, 2002.
- FLECHTMANN, C.H.W. *Ácaros de importância médico-veterinária*. São Paulo: Nobel, 1973. 192 pp.
- FONSECA, A. H.; DUTRA, A.E. A.; PINA, I.G. Uso de sangue de frangos e de bovinos na alimentação de *Argas (Persicargas) miniatus* (Koch, 1848) (Acari: Argasidae), através de membrana de silicone. *Revista Brasileira de Ciência Veterinária*, v. 6, n. 3, p. 167-170, 1999.
- GALVÃO, M.A.M.; SILVA, L.J.; NASCIMENTO, E.M.M.; CALIC, S.B.; DE SOUSA, R.; BACELLAR F. Riquetsioses no Brasil e Portugal: ocorrência, distribuição e diagnóstico. *Revista de Saúde Pública*, v.39, n.5, p. 850-856, 2005.
- GIMÉNEZ, D.F. Staining rickettsiae in yolk-sac cultures. *Biotechnic & Histochemistry*, v. 39, n. 3, p. 135-140, 1964.
- GODDARD, J.; VARELA-STOKES, A.; SMITH, W.; EDWARDS, K. T. Artificial infection of the bed bug with *Rickettsia parkeri*. *Journal of medical entomology*, v. 49, n. 4, p. 922-926, 2012.
- GUGLIELMONE, A.A.; HADANI, A. Ciclo biológico de *Ornithodoros rostratus* (Aragão,1911) bajo condiciones de laboratorio. *Revista Medicina Veterinária* (Bs. Aires), v. 61, p. 254-257, 1980.
- GUGLIELMONE, A.A; ROBBINS, R.G; APANASKEVICH, D.A; PETNEY, T.N.; ESTRADA-PEÑA, A.; HORAK, I.G; SHAO, R.; BARKER, S.C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, v. 2528, p. 1–28, 2010.
- GUIMARÃES, J.H.; TUCCI, E.C.; BARROS-BATTESTI, D.M. *Ectoparasitos de Importância em Medicina Veterinária*. Editora Plêiade –FAPESP, 2001. 204 pp.
- HABEDANK, B.; HIEPE, T.; MONTAG, C. Untersuchungen zur In-vitro-Fütterung von Zecken Argasidae und Ixodidae. *Österr. Ges. Tropenmedizin Parasitologie*, v. 16, p. 107-114, 1994.
- HINDLE, E.; MERRIMAN, G. The sensory perceptions of *Argas persicus* (Oken). *Parasitology*, v. 5, n. 3, p. 203-216, 1912.
- HOKAMA, Y., LANE, R.S.; HOWARTH, J.A. Maintenance of adult and nymphal *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae) by artificial feeding through a parafilm membrane. *Journal of Medical Entomology*, v. 24, p. 319-323, 1987.
- HOOGSTRAAL, H. Argasid and Nutalliellid ticks as parasites and vectors. *Advances in Parasitology*, v. 24, p. 135-238, 1985.
- HOOGSTRAAL, H.; OLIVER, R.M.; GUIRGIS, S.S. Larva, nymph, and cycle of *Ornithodoros (Alectorobius) muesebecki* (Ixodoidea: Argasidae), a vírus- infected parasite of birds and petroleum industry employees in the Arabian Gulf. *Annals of entomological society of América*, v. 63, n. 6, p. 1762-1768, 1970.

HORTA, M. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; LINARDI, P. M.; SCHUMAKER, T. T. *Rickettsia* infection in five areas of the state of São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 7, p. 793-801, 2007.

INOKUMA, H.; KEMP, D. H. Establishment of *Boophilus microplus* infected with *Babesia bigemina* by using in vitro tube feeding technique. *The Journal of Veterinary Medical Science*, v. 64, n. 4, p. 509-512, 1998.

KEIRANS, J.E. *A manual of acarology*, 3rd ed, Texas Tech Univ. Press, 2009. 807pp.

KEMP, D.H.; KOUDSTAAL, D.; ROBERTS, J.A.; KERR, J. D. Feeding of *Boophilus microplus* larvae on a partially defined medium through thin slices of cattle skin. *Parasitology*, v. 70, n. 2, p. 243-254, 1975.

KHAN, M. H.; SRIVASTAVA, S. C. Life history of *Ornithodoros savignyi* Audouin. *Indian Veterinary Journal*, v. 65, n. 3, p. 192-195, 1988.

KIRCH, H. J.; TEEL, P. D.; KLOFT, W. J.; DELOACH, J. R. Artificial feeding of *Ornithodoros concanensis* (Acari: Argasidae) nymphs on bovine blood and morphological changes in erythrocytes undergoing hemolysis in the tick midgut. *Journal of medical entomology*, v. 28, n. 3, p. 450-455, 1991.

KLOMPEN, J.S.H.; OLIVER, J.H. Systematic relationships in the soft ticks (Acari: Ixodida: Argasidae). *Systematic Entomology*, v. 18, p. 313-331, 1993.

KOCAN, K.M.; YOSHIOKA, J.; SONENSHINE, D.E.; DE LA FUENTE, J.; CERAUL, S.M.; BLOUIN, E. F.; ALMAZÁN, C. Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *Journal of Medical Entomology*, v. 42, n. 5, p. 864-874, 2005.

KOCAN, K. M.; YOSHIOKA, J.; SONENSHINE, D. E.; DE LA FUENTE, J.; CERAUL, S. M.; BLOUIN, E. F.; ALMAZÁN, C. Capillary tube feeding system for studying tick-pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). *Journal of Medical Entomology*, v. 42, n. 5, p. 864-874, 2005.

KOCAN, K.M.; WICKWIRE, K.B.; HAIR, J.A.; EWING, S.A.; BARRON, S. J. Percutaneous infection of nymphal *Dermacentor andersoni* with *Anaplasma marginale*. *American Journal of Veterinary Research*, v. 47, n. 8, p. 1662-1664, 1986.

KORSBUS, J.; MUNDERLOH, U.; BEY, R.; KURTTI, T. Experimental infection of dogs with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto using *Ixodes scapularis* ticks artificially infected by capillary feeding. *Medical Microbiology and Immunology (Berl.)*, v. 193, p. 27-34, 2004.

KRAWCZAK, F. S. *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*. 88f. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

KRÖBER, T.; GUERIN, P.M. In vitro feeding assays for hard ticks. *Trends in parasitology*, v. 23, n. 9, p. 445-449, 2007.

KUHNERT, F. Feeding of Hard Ticks In Vitro: New Perspectives for Rearing and for the Identification of Systemic Acaricides. *Altex*, v. 13, n. 2, p. 76-87, 1995.

KUHNERT, F.; DIEHL, P.A.; GUERIN, P.M. The life-cycle of the bonttick *Amblyomma hebraeum* in vitro. *International Journal for Parasitology*, v. 25, p. 887-89, 1995.

LA SCOLA, B.; RAOULT, D. L. Laboratory diagnosis of Rickettsioses: Current approaches diagnosis of old and new Rickettsial Diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 11, p. 2715-2727, 1997.

LABRUNA, M. B.; VENZAL, J. M. *Carios fonsecai* sp. nov.(Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. *Acta Parasitologica*, v. 54, n. 4, p. 355-363, 2009.

LABRUNA, M.B., WHITWORTH, T.; HORTA, M.C.; BOUYER, D.H.; MCBRIDE, J.W.; CAMARGO, L.M., et al. *Rickettsia bellii* and *Rickettsia amblyommii* in *Amblyomma* ticks from the State of Rondônia, Western Amazon, Brazil. *Journal of Medical Entomology*, v. 41, p. 1073-81, 2004.

LACKMAN, D. B.; PARKER, R. R.; GERLOFF, R. K. Serological characteristics of a pathogenic rickettsia occurring in *Amblyomma maculatum*. *Public Health Reports (1896-1970)*, p. 1342-1349, 1949.

LADO, P.; CASTRO, O.; LABRUNA, M. B.; VENZAL, J. M. First molecular detection of *Rickettsia parkeri* in *Amblyomma tigrinum* and *Amblyomma dubitatum* ticks from Uruguay. *Ticks and tick-borne diseases*, v. 5, n.6, p. 660-662, 2014.

LANDULFO, G. A.; PEVIDOR, L. V.; DOS SANTOS SAMPAIO, J.; LUZ, H. R.; ONOFRIO, V. C.; FACCINI, J. L. H.; BARROS-BATTESTI, D. M. Life cycle of *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) under laboratory conditions. *Experimental and Applied Acarology*, v. 58, n. 1, p. 69-80, 2012.

LÉGER, E.; VOUREC'H, G.; VIAL, L.; CHEVILLON, C.; MCCOY, K. D. Changing distributions of ticks: causes and consequences. *Experimental and Applied Acarology*, v. 59, n. 1-2, p. 219-244, 2013.

LEMOS-MONTEIRO, J.; FONSECA, F.; PRADO, A. Typho endêmico de São Paulo. VI. Pesquisas sobre a possibilidade da transmissão experimental do vírus por Ixodidae. *Brasil Médico*, n. 3, p. 49-52, 1932a.

LEMOS-MONTEIRO, J.; FONSECA, F.; PRADO, A. Typho endêmico de São Paulo. VII. Pesquisas dos vírus em alguns arthropodos sob condições naturais. *Brasil Médico*, n. 8, p. 169-172, 1932b.

LIU, X.Y.; BONNET, S.I. Hard Tick Factors Implicated in Pathogen Transmission. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, n. 1, e. 2566, 2014.

LOFTIS, A. D.; GILL, J. S.; SCHRIEFER, M. E.; LEVIN, M. L.; EREMEEVA, M. E.; GILCHRIST, M. J. R.; DASCH, G. A. Detection of *Rickettsia*, *Borrelia*, and *Bartonella* in *Carios kelleyi* (Acari: Argasidae). *Journal of medical entomology*, v. 42, n. 3, p. 473-480, 2005.

- MACALUSO, K.R.; SONENSHINE, D.E.; CERAUL, S.M.; AZAD, A.F. Infection and transovarial transmission of *Rickettsia* in *Dermacentor variabilis* ticks acquired by artificial feeding. *Vector Borne and Zoonotic Diseases*, v. 1, n. 1, p. 45-53, 2001.
- MACALUSO, K.R.; SONENSHINE, D.E.; CERAUL, S.M.; AZAD, A.F. Rickettsial Infection in *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) Inhibits Transovarial transmission of a Second *Rickettsia*. *Journal of Medical Entomology*, v. 39, n. 6, p. 809-813, 2002.
- MANCEBO, O.A.; MONZON C.M.; GUGLIELMONE, A.A.; LAMBERTI, J.C. *Ornithodoros rostratus* (Aragão, 1911) (Ixodoidea: Argasidae): Nuevo hallazgo em Argentina. *Veterinaria Argentina*, v. 19, n. 188, p. 591- 595, 2002.
- MANGO, C.K.A.; GALUN, R. Suitability of laboratory hosts for rearing of *Ornithodoros moubata* ticks (ACARI: ARGASIDAE). *Journal of Medical Entomology*, v. 14, n. 3, p. 305-308, 1977.
- MANZANO-ROMÁN, R.; DÍAZ-MARTÍN, V.; DE LA FUENTE, J.; PÉREZ-SÁNCHEZ, R. Soft ticks as pathogen vectors: Distribution, surveillance and control. *Parasitology*, p. 125-162, 2012. InTech, Ed.; <http://www.intechopen.com/books/parasitology/soft-ticks-as-pathogen-vectors-distributionsurveillance-and-control->.
- MARTINS, T. F.; VENZAL, J. M.; TERASSINI, F. A.; COSTA, F. B., MARCILI, A.; CAMARGO, L. M., BARROS BATTESTI, D.M.; LABRUNA, M. B. New tick records from the state of Rondônia, western Amazon, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, v. 62, n. 1, p. 121-128, 2014.
- MATSUMOTO, K.; BROUQUI, P.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Experimental Infection models of ticks of the *Rhipicephalus sanguineus* group with *Rickettsia conorii*. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*, v. 5, n. 4, p. 363-372, 2005.
- MCCOY, B. N.; RAFFEL, S. J.; LOPEZ, J. E.; SCHWAN, T. G. Bloodmeal size and spirochete acquisition of *Ornithodoros hermsi* (Acari: Argasidae) during feeding. *Journal of medical entomology*, v. 47, n. 6, p. 1164, 2010.
- 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. Spotted fever group *Rickettsia* infecting ticks (Acari: Ixodidae) in the state of Santa Catarina, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 106, n. 8, p. 926-930, 2011.
- MILHANO, N.; PALMA, M.; MARCILI, A.; NÚNCIO, M. S.; CARVALHO, I. L.; SOUSA, R. *Rickettsia lusitaniae* sp. nov. isolated from the soft tick *Ornithodoros erraticus* (Acarina: Argasidae). *Comparative immunology, microbiology and infectious diseases*, v. 37, n. 3, p. 189-193, 2014.
- MOURA, S.T.; FONSECA, A.H.; FERNANDES, C.G.N.; BUTLER, J.F. Artificial feeding of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) through silicone membrane. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 92, n. 4, p. 545-548, 1997.
- NAVA, S.; LARESCHI, M.; REBOLLO, C.; USHER, C.B.; BEATI, L.; ROBBINS, R.G.; DURDEN, L.A.; MANGOLD, A.J.; GUGLIELMONE, A.A. The ticks (ACARI: IXODIDA: ARGASIDAE, IXODIDAE) of Paraguay. *Annals of Tropical Medicine & Parasitology*, v. 101, n. 3, p. 255-270, 2007.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; TERASSINI, F. A.; MANGOLD, A. J.; CAMARGO, L. M. A.; LABRUNA, M. B. Description of a new argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in Brazilian Amazon. *Journal of Parasitology*, v. 96, n. 6, p. 1089-1101, 2010.

NEITZ, W.O.; BOUGHTON, F.; WALTERS, H.S. Laboratory investigations on the kanroo paralysis ticks (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, n. 3, p. 215-224, 1971.

NIERI, F.A.B. *Avaliação da Infecção por Rickettsia spp. em Amblyomma triste Koch (Acari: Ixodidae) e em algumas espécies de Ornithonyssus sambon (Acari: Macronyssidae)*. 66 f. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

OGRZEWALSKA, M.; PACHECO, R. C.; UEZU, A.; RICHTZENHAIN, L. J. ; FERREIRA, F.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in *Amblyomma nodosum* ticks (Acari: Ixodidae) from Brazil. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 103, p. 413-425, 2009.

OSBORNE, R.W.; MELLOR, P.S. Use a silicone membrane feeding technique in the laboratory maintenance of a colony of *Ornithodoros moubata*. *Tropical Animal Health and Production*, v. 17, p. 31-38, 1985.

OSBORNE, R.W.; MELLOR, P.S. Development and mortality of *Ornithodoros moubata* after feeding through an artificial membrane. *Tropical Animal Health and Production*, v. 18, p. 41-47, 1986.

OTEO, J. A.; NAVA, S.; SOUSA, R. D.; MATTAR, S.; VENZAL, J. M.; ABARCA, K.; ... & ZAVALA-CASTRO, J. Guías Latinoamericanas de la RIICER para el diagnóstico de las rickettsiosis transmitidas por garrapatas. *Revista chilena de infectología*, v. 31, n. 1, p. 54-65, 2014.

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. *Rickettsia parkeri*: a newly recognized cause of spotted fever rickettsiosis in the United States. *Clinical Infectious Diseases*, v. 38, p. 805–811, 2004.

PAINE, S. H.; KEMP, D. H.; ALLEN, J. R. In vitro feeding of *Dermacentor andersoni* (Stiles): effects of histamine and other mediators. *Parasitology*, v. 86, n. 03, p. 419-428, 1983.

PARDI, M. C.; ROCHA, U. F. Lesões causadas na pele de porcos pelas picadas de *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911 (Acari, Argasidae). Importância econômica. *Revista da Faculdade de Medicina Veterinária* (Universidade de São Paulo), v. 5, n. 1, p. 35-40, 1953.

PARKER, R. R.; KOHLS, G. M.; COX, G. W.; DAVIS, G. E. Observations on an infectious agent from *Amblyomma maculatum*. *Public Health Reports (1896-1970)*, p. 1482-1484, 1939.

PAROLA, P.; DAVOUST, B.; RAOULT, D. Tick-and flea-borne rickettsial emerging zoonoses. *Veterinary research*, v. 36, n. 3, p. 469-492, 2005.

PAROLA, P.; PADDOCK, C. D.; SOCOLOVSCHI, C.; LABRUNA, M. B.; MEDIANNIKOV, O.; KERNIF, T.; ... & RAOULT, D. Update on tick-borne rickettsioses around the world: a geographic approach. *Clinical microbiology reviews*, v. 26, n. 4, p. 657-702, 2013.

PIRANDA, E. M. P. *Estudos biológicos de Rhipicephalus sanguineus e interação Rickettsia rickettsii, R. sanguineus e cães em condições laboratoriais*. 74f. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 2008.

PIRANDA, E. M.; FACCINI, J. L. H.; PINTER, A.; SAITO, T. B.; PACHECO, R. C.; HAGIWARA, M. K.; LABRUNA, M. B. Experimental infection of dogs with a Brazilian strain of *Rickettsia rickettsii*: clinical and laboratory findings. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 103, n. 7, p. 696-701, 2008.

POSPELOVA-SHTROM, M.V. On the Argasidae system (with description of two new subfamilies, three new tribes and one new genus). *Meditinskaya Parasitologiya i Parazitarnye Bolezni*, v. 15, p. 47–58, 1969.

PURNELL, R. E.; JOYNER, L. P. Artificial feeding technique for *Rhipicephalus appendiculatus* and the transmission of *Theileria parva* from the salivary secretion. *Nature*, v. 216, p. 484 – 485, 1967.

RANGEL, C. P. *Alimentação artificial de fêmeas parcialmente ingurgitadas de Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) por meio de tubos capilares*. 34f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 2008.

RANGEL, C.P.; CUNHA, N.C.; REZENDE, J.; SILVA, F.J.M.; CORRÊA, F.N.; TEIXEIRA, R.C.; SILVA, J.B.; BAËTA, B.A.; FONSECA, A. H. Alimentação artificial por meio de tubos capilares de fêmeas parcialmente ingurgitadas do carrapato *Dermacentor (Anocentor) nitens*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 17, n. 1, p. 35-39, 2008.

RAOULT, D.; FOURNIER, P. E.; ABBOUD, P.; CARON, F. First documented human *Rickettsia aeschlimannii* infection. *Emerging Infectious Diseases*, v. 8, n. 7, p. 748-749, 2002.

RAOULT, D.; ROUX, V. Rickettsioses as paradigms of new or emerging infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, v. 10, n. 4, p. 694-719, 1997.

RANGEL, C. P. *Feeding efficiency in vitro of females of Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae)*. 2011. 60p. Tese de Doutorado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2011.

REEVES, W. K.; LOFTIS, A. D.; SANDERS, F.; SPINKS, M. D.; WILLS, W.; DENISON, A. M.; DASCH, G. A. *Borrelia*, *Coxiella*, and *Rickettsia* in *Carios capensis* (Acari: Argasidae) from a brown pelican (*Pelecanus occidentalis*) rookery in South Carolina, USA. *Experimental & applied acarology*, v. 39, n. 3-4, p. 321-329, 2006.

REGNERY, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 5, p. 1576-1589, 1991.

REHACEK, J.; URVÖLGYI, J.; KOVACOVA, E. Massive occurrence of rickettsiae of the spotted fever group in fowl tick, *Argas persicus*, in the Armenian SSR. *Acta virologica*, v. 21, n. 5, p. 431-438, 1977.



- RIBEIRO, C. C. D. U.; FACCINI, J. L. H.; CANÇADO, P. H. D.; PIRANDA, E. M.; BARROS-BATTESTI; D. M.; LEITE, R. C. Life cycle of *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae) under experimental conditions and comments on the host-parasite relationship in the Pantanal wetland region, Brazil. *Experimental and Applied Acarology*, v. 61, n. 1, p. 139-146, 2013.
- RIBEIRO, C.C.D.U ; BAETA, B.A. ; VALIM, J. R.A.; TEXEIRA, R. C.; CEPEDA, P. B.; SILVA, J.B.; FONSECA, A. H. Use of plastic tips in artificial feeding of *Dermacentor (Anocentor) nitens* females Neumann, 1897 (Acari: Ixodidae). *Ticks and Tick-borne Diseases*, v. 5, n. 6, p. 689-692, 2014.
- RUHETA, M. R.; INOUE, N.; FUJISAKI, K. Advances in the artificial feeding of *Ornithodoros moubata* (Acari: Ixodidae) and the follow up of its life cycle after feeding on fetal bovine serum. *The Journal of Protozoology Research*, v. 15, p. 57-62, 2005.
- SABATINI, G. S.; PINTER, A.; NIERI-BASTOS, F. A.; MARCILI, A.; LABRUNA, M. B. 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*, n. 47, v. 5, p. 913-916, 2010.
- SAKAI, R. K. *Alimentação artificial de fêmeas de Rhipicephalus sanguineus (Acari: Ixodidae) por meio de tubos capilares*. 36f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 2010.
- SAMPAIO, I.B.M. *Estatística aplicada à experimentação animal*. 2.ed. Belo Horizonte: Fundação de Estudo e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 2002. 256p.
- SANGIONI, L. A. Rickétsias. In: MONTEIRO, S. G. *Parasitologia na Medicina Veterinária*, 1ª edição. São Paulo: Roca, 2010. p. 169-179.
- SANTOS, A.S.BACELLAR, F. SANTOS-SILVA, M. Ultrastructural study of the infection process of *Rickettsia conorii* in the salivary glands of the vector tick *Rhipicephalus sanguineus*. *Vector Borne Zoonotic Disease*, v. 2, p. 165-177, 2002.
- SCHUMAKER, T. T. S.; BARROS, D. M. Life cycle of *Ornithodoros (Alectorobius) talaje* (Acari: Argasidae) in laboratory. *Journal of medical entomology*, v. 32, n. 3, p. 249-254, 1995.
- SCHWAN, E. V.; HUTTON, D.; SHIELDS, K. J. B.; TOWNSON, S. Artificial feeding and successful reproduction in *Ornithodoros moubata moubata* (Murray, 1877) (Acarina: Argasidae). *Experimental & applied acarology*, v. 13, n. 2, p. 107-115, 1991.
- SILVEIRA, I.; PACHECO, R. C.; SZABÓ, M. P. J.; CASTRO, M. B; PETERKA, C. R. L.; VERONEZ, V. A.; ... & LABRUNA, M. B. Isolamento de *Rickettsia parkeri* em cultura de células Vero a partir do carrapato *Amblyomma triste*. In *Abstracts and Program of the XIX Congresso Brasileiro de Parasitologia*, v. 31, 2005.
- SOARES, C.A.G.; LIMA, C.M.R.; DOLAN, M.C.; PIESMAN, J.; BEARD, C.B.; ZEIDNER, N.S. Capillary feeding of specific dsRNA induces silencing of the isac gene in nymphal *Ixodes scapularis* ticks. *Insect Molecular Biology*, v. 14, n. 4, p. 443-452, 2005.
- SOCOLOVSKI, C.; KERNIF, T.; RAOULT, D.; PAROLA, P. Borrelia, Rickettsia, and Ehrlichia species in bat ticks, France, 2010. *Emerging infectious diseases*, v. 18, n. 12, p. 1966- 1975, 2012.

SONENSHINE, D. E.; ANASTOS, G. Observations on the life history of the bat tick *Ornithodoros kelleyi* (ACARINA : ARGASIDAE). *The Journal of Parasitology*, v.46, p.449-454, 1960.

SONENSHINE, D.E. *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York, 447pp, 1991.

SONENSHINE, D.E. *Biology of Ticks*. Oxford University Press, New York, 465pp, 1993.

SPOLIDORIO, M.G.; LABRUNA, M.B.; MANTOVANI, E.; BRANDÃO, P.E.; RICHTZENHAIN, L.J.; YOSHINARI N.H. Novel spotted fever group rickettsiosis, Brazil. *Emerging Infectious Diseases*, v. 16, n. 3, p. 521-523, 2010.

STONE, B. F.; COMMINS, M. A.; KEMP, D. H. Artificial feeding of the Australian paralysis tick *Ixodes holocyclus* and collection of paralyzing toxin. *International journal for parasitology*, v. 13, n. 5, p. 447-454, 1983.

SUMNER, J.W.; DURDEN L.A.; GODDARD, J.; GULF COAST ticks (*Amblyomma maculatum*) and *Rickettsia parkeri*, United States. *Emerging Infectious Diseases*, v. 13, n. 5, p. 751-753, 2007.

SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, p. 1-9, 2013a.

SZABÓ, M. P. J.; NIERI-BASTOS, F. A.; SPOLIDORIO, M. G.; MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. M.; LABRUNA, M. B. In vitro isolation from *Amblyomma ovale* (Acari: Ixodidae) and ecological aspects of the Atlantic rainforest *Rickettsia*, the causative agent of a novel spotted fever rickettsiosis in Brazil. *Parasitology*, v. 140, n. 6, p. 719-728, 2013b.

TAJERI, S.; RAZMI, G. R. *Hyalomma anatolicum anatolicum* and *Hyalomma dromedarii* (Acari: Ixodidae) imbibe bovine blood in vitro by utilizing an artificial feeding system. *Veterinary parasitology*, v. 180, n. 3, p. 332-335, 2011.

TARSHIS, I.B. A preliminary study on feeding *Ornithodoros savignyi* (Audouin) on human blood through animal-derived membranes (Acarina: Argasidae). *Annals of the Entomological Society of America*, v. 51, p. 294-299, 1958.

VALIM, J.R.A. *Ponteiras plásticas na alimentação de fêmeas de Rhipicephalus sanguineus parcialmente ingurgitadas*. 58f. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, Rio de Janeiro. 2014.

VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A. Larval feeding performance of two Neotropical *Ornithodoros* ticks (ACARI: ARGASIDAE) on reptiles. *Experimental and Applied Acarology*, v.39, p. 315-320, 2006.

VIAL, L. Biological and ecological characteristics of soft ticks (IXODIDA: ARGASIDAE) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. *Parasite*, v. 16, p. 191-202, 2009.

VOIGT, V.W.P.; YOUNG, A.S.; MWAURA, S.N., NYAGA S.G.; NJIHIA G.M., MWAKIMA, F.N.; MORZARIA, S.P. In vitro feeding of instars of the ixodid tick

*Amblyomma variegatum* on skin membranes and its application to the transmission of *Theileria mutans* and *Cowdria ruminantium*. *Parasitology*, v. 107, p. 257-263, 1993.

WALADDE, S.M., OCHIENG, S.A.; GICHUHI, P.M. Artificial membrane feeding of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus* to repletion. *Experimental and Applied Acarology*, v. 11, p. 297-306, 1991.

WALADDE, S.M.; YOUNG, A.S.; OCHIENG', S.A.; MWAURA S.N.; MWAKIMA, F.N. Transmission of *Theileria parva* to cattle by *Rhipicephalus appendiculatus* adults fed as nymphae in vitro on infected blood through an artificial membrane. *Parasitology*, v. 107, p. 249-256, 1993.

WALKER, A.R.; BROWN, C.G.D.; BELL, L. J.; McKELLAR, S.B. Artificial infection of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with *Theileria parva*. *Research in Veterinary Science*, v. 26, n. 1, p. 264-265, 1979.

WEISS, E.; MOULDER, J. W. The rickettsias and chlamydias. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, v. 1, p. 687-739, 1984.

WIRTZ, H.P.; BARTHOLD, E. Simplified membrane feeding of *Ornithodoros moubata* (Acarina: Argasidae) and quantitative transmission of microfilariae of *Dipetalonema viteae* (Nematoda: Filarioidea) to the ticks. *Zeitschrift fuer Angewandte Zoologia*, v. 73, n.1, p. 1-11, 1986.

YOUNG, A. S.; WALADDE, S. M.; MORZARIA, S. P. Artificial feeding systems for ixodid ticks as a tool for study of pathogen transmission. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 791, n. 1, p. 211-218, 1996.

## ANEXOS

### **Anexo 1. Extração de DNA de Carrapatos (Fenol/Fenol-clorofórmio)**

Lavar os carrapatos em água sanitária 1%, álcool 70% e 2x em água destilada.

1 – Colocar 200 mg de Beads autoclavados (para larva e ninfa) ou 7 esferas de zircônio [2,0 a 2,5 mm] (para adultos) em um tubo com tampa de rosca autoclavado.

2 – Acrescentar 200 µL de HBSS.

3 – Triturar por 60 segundos no minibeadbeater.

4 – Adicionar 200 µL de Digest buffer 2X concentrado + 20 µL de Proteinase K + 50 microlitros de CaCl<sub>2</sub> (50 mM)

5 – Deixar à temperatura de 56 °C por 3 horas.

6 – Centrifugar na velocidade de 16000 xg por 1 minuto.

7 – Colocar 550 µL de Fenol (em capela de exaustão), inverter o tubo 5x.

9 – Centrifugar por 10 minutos a 16000 xg.

10 – Aliquotar 500 µL do sobrenadante para outro tubo.

11 – Colocar 500 µL de Fenol-clorofórmio (em capela de exaustão), inverter o tubo 5x.

12 – Centrifugar por 20 minutos a 16000 xg.

13 – Aliquotar 450 µL do sobrenadante para um outro tubo.

14 – Colocar 550 µL de Isopropanol.

15 – Aguardar 15 minutos à temperatura ambiente.

5 – Centrifugar por 10 minutos 16000 xg.

16 – Observe a formação do “pellet” e jogue fora o sobrenadante.

17 – Adicione 1000 µL de etanol absoluto gelado.

18 – Centrifugar por 2 minutos a 16000 xg.

19 – Despreze o sobrenadante.

20 – Adicione 1000 µL de etanol 70% gelado.

21 – Centrifugar por 2 minutos a 16000 xg.

22 – Despreze novamente o sobrenadante.

- 23 – Secar em papel toalha e colocar a 56 °C (banho seco) por 15 minutos para secar o álcool.
- 24 – Adicionar 30 µL de TE 1X e deixar o DNA em geladeira (2-8 °C) “over night”.
- 25 – Colocar a 56 °C por 15 minutos, petelecar e armazenar em freezer ( -20 ou -80 °C) até o momento do uso.

### **Soluções**

#### Digest 2X

2 mL EDTA 0,5 M pH=8,0

2 mL TRIS-HCl 0,5M pH=8,0

4 mL NaCl 5M

5 mL SDS10% (SDS 1%)

37 mL H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>