

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CÂMPUS DE JABOTICABAL

***Bartonella* spp.: curva de crescimento em meio Tryptic Soy Broth (TSB) suplementado e avaliação de transmissão transovariana e perpetuação transestadial através de infecção *in vitro* em *Amblyomma sculptum* (acari: ixodidae)**

Jaqueline Valéria Camargo
Médica Veterinária

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE JABOTICABAL

***Bartonella* spp.: curva de crescimento em meio Tryptic Soy Broth (TSB) suplementado e avaliação de transmissão transovariana e perpetuação transestadial através de infecção *in vitro* em *Amblyomma sculptum* (acari: ixodidae)**

Jaqueline Valéria Camargo

Orientadora: Darci Moraes Barros-Battesti

Dissertação apresentada à Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Câmpus de Jaboticabal, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Medicina Veterinária.

C172b	Camargo, Jaqueline Valéria Bartonella spp.: curva de crescimento em meio Tryptic Soy Broth (TSB) suplementado e avaliação de transmissão transovariana e perpetuação transestadial através de infecção in vitro em Amblyomma sculptum (acarí: ixodidae) / Jaqueline Valéria Camargo. -- Jaboticabal, 2021 84 p. : il., tabs., fotos Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal Orientadora: Darci Moraes Barros-Battesti 1. Medicina Veterinária. 2. Carrapato. 3. Bactérias patogênicas. I. Título.
-------	---

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: *Bartonella* spp.: CURVA DE CRESCIMENTO EM MEIO TRYPTIC SOY BROTH (TSB) SUPLEMENTADO E AVALIAÇÃO DE TRANSMISSÃO TRANSOVARIANA E PERPETUAÇÃO TRANSESTADIAL ATRAVÉS DE INFECÇÃO in vitro EM *Amblyomma sculptum* (ACARI: IXODIDAE)

AUTORA: JAQUELINE VALÉRIA CAMARGO

ORIENTADORA: DARCI MORAES BARROS-BATTESTI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em MEDICINA VETERINÁRIA, área: Patologia Animal pela Comissão Examinadora:


Profa. Dra. DARCI MORAES BARROS-BATTESTI (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV-UNESP / Câmpus de Jaboticabal

p/ Prof. Dr. MARCOS ROGÉRIO ANDRÉ (Participação Virtual)
Departamento de Patologia Veterinária / FCAV / UNESP - Jaboticabal

p/ Prof. Dr. JOÃO FABIO SOARES (Participação Virtual)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul-UFRGS / Porto Alegre/RS


Jaboticabal, 12 de julho de 2021

DADOS CURRÍCULARES DA AUTORA

Jaqueline Valéria Camargo: nascida na cidade de Pinhão, Paraná, em 29 de novembro de 1994. Filha de Neiva da Cruz Antunes Camargo e João Edilson Camargo. Graduada em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual do Centro Oeste – UNICENTRO, Guarapuava – Paraná, no ano de 2018. Durante a graduação foi bolsista pelo Programa Institucional de Apoio à Inclusão Social (PIBIS) – 2017, realizou Iniciação Científica voluntária – 2017, atuando na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias, sob orientação da Profa. Dra. Meire Christina Seki, com o trabalho intitulado “Comparação de técnicas coproparasitológicas para diagnóstico de endoparasitas em cães”. Foi bolsista de Iniciação científica pela Fundação Araucária – 2018, atuando na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias, sob orientação do Prof. Dr. Adriano de Oliveira Torres Carrasco, com o trabalho intitulado “Levantamento de helmintos gastrointestinais em ovinos na região de Guarapuava”. Foi monitora voluntária da Disciplina de Imunologia Veterinária, ministrada pelo Prof. Dr. Adriano de Oliveira Torres Carrasco, de maio de 2017 a agosto de 2017. Ingressou no mestrado na Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – FCAV/UNESP, Ciências Veterinárias; área de concentração - Saúde Única, sob orientação da Profa. Dra. Darci Moraes Barros-Battesti, com bolsa de estudo da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES (Código Financeiro 001).

“São tempos difíceis para os sonhadores” (O Fabuloso Destino de Amélie Poulain).

Dedico este trabalho aos meus pais Neiva da Cruz Antunes
Camargo e João Edilson Camargo por me trazerem até aqui.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus por me permitir encontrar pessoas boas durante minha caminhada.

Aos meus pais por todo amparo, exemplo de honestidade, exemplo de caráter e amor incondicional. Por me ensinarem a ter garra para sempre persistir frente as dificuldades. Eu amo vocês, obrigada por tanto.

Ao meu noivo Pedro Vinícius Montarroyos Sales, por estar presente em todos os momentos e aguentar firme todas as lamentações. Por me dar forças e incentivo e sempre estar comigo apesar da distância.

À minha orientadora Profa. Dra. Darci Moraes Barros-Battesti pela oportunidade que me proporcionou, por ter acreditado em mim e por contribuir com meu crescimento profissional.

À Leidiane Lima Duarte e Ana Carolina Castro Santiago pela amizade, conselhos, ajuda nos experimentos, ensinamentos e por dividir angústias e êxitos. Meninas, sem vocês isso não teria sido possível.

À Profa. Dra. Rosangela Zacarias Machado, pelos ensinamentos, ajuda na parte experimental, conselhos e por se solidarizar em momentos que meus resultados me afligiam.

À Dra. Marita Vedovelli Cardozo, pela ajuda na realização da curva de crescimento de *Bartonella* spp.

À Livia Perles pela ideia do projeto e ajuda em todos os aspectos. Obrigada por ser amiga e também por ser uma excelente profissional.

À Simone M. Simons por ceder ninfas de *Amblyomma sculptum*.

Ao Prof. Dr. Carlos Perez por ceder os adultos de *Amblyomma sculptum*.

Aos meus amigos Lucinéia Vitchemech, Laryssa Borges de Oliveira, Matheus de Souza Santana, Victória Valente, Juliana Terada, Ana Cláudia Calchi, Clara Morato, vocês foram minha família em Jaboticabal. Desde o primeiro mês de mestrado foram essenciais para me manter em pé. Vocês me trouxeram felicidade e me ajudaram a crescer.

À minha colega de quarto Natália Marim Gárzon, por toda ajuda nos primeiros meses em Jaboticabal e pelas tardes de café e conversas.

Aos meus colegas de laboratório Priscila Ikeda, Luiz Ricardo Gonçalves, Renan do Amaral, Maria Eduarda Furquim, Mariele de Santi, Rafaela Beraldo e Anna Cláudia Mongruel. Pela convivência e ensinamentos diários.

Aos funcionários da FCAV – UNESP, principalmente ao Deco do setor de Equideocultura por não medir esforços para me ajudar nas coletas de sangue em finais de semana e feriados.

Aos meus professores da graduação Profa. Dra. Meire Christina Seki e Prof. Dr. Adriano de Oliveira Torres Carrasco, por terem me estimulado a seguir na ciência.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Família Ixodidae	17
2.2 <i>Amblyomma sculptum</i> Berlese, 1888.....	17
2.2.1 Ciclo Biológico de <i>Amblyomma sculptum</i>	18
2.3 Alimentação Artificial de Ixodídeos.....	21
2.3.1 Técnicas de alimentação artificial de carrapatos.....	21
2.3.2 Alimentação <i>in vitro</i> por meio de tubo microhematócrito	21
2.3.3 Alimentação <i>in vitro</i> através de membrana artificial	22
2.3.4 Alimentação <i>in vitro</i> através de membrana natural	22
2.4 Anticoagulantes usados na alimentação <i>in vitro</i>	23
2.5 Patógenos transmitidos por carrapatos	23
2.6 <i>Bartonella</i> spp.	24
2.7 Principais doenças causadas por <i>Bartonella</i> spp.....	27
2.7.1 Doença de Carrión	27
2.7.2 Verruga Peruana	27
2.7.3 Febre das Trincheiras.....	28
2.7.4 Doença da arranhadura do gato	28
2.7.5 Angiomatose Bacilar	28
3. Cultivo de <i>Bartonella</i> spp.....	28
3.1 Meio de cultivo - Tryptic Soy Broth.....	29
4. JUSTIFICATIVA.....	29
5. OBJETIVOS.....	30
5.1 Geral.....	30
5.2 Específicos	30

6. MATERIAL E MÉTODOS	30
6.1 Cultura e obtenção de isolado de <i>Bartonella</i> spp.	30
6.2 Meio líquido de crescimento	31
6.2.1 Plaqueamento em superfície	31
6.2.2 Quantificação de <i>Bartonella</i> spp.	32
6.3 Origem da colônia de <i>Amblyomma sculptum</i>	32
6.4 Lavagem do inóculo de <i>Bartonella</i> spp.	33
6.5 Alimentação artificial de fêmeas adultas de <i>Amblyomma sculptum</i> utilizando sangue infectado com <i>Bartonella</i> spp.....	33
6.6 Origem da membrana natural	35
6.6.1 Alimentação artificial das ninfas de <i>Amblyomma sculptum</i>	36
6.7 Extração de DNA dos ovos das fêmeas alimentadas no capilar e dos adultos resultantes da ecdise das ninfas	39
6.8 PCR convencional (cPCR) dos ovos e adultos de <i>A. sculptum</i> – 16S rRNA	39
6.8.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose	40
6.9 PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para <i>Bartonella</i> spp.....	40
7. RESULTADOS.....	41
7.1 Meio TSB.....	41
7.2 Alimentação artificial das fêmeas de <i>A. sculptum</i>	44
7.4 qPCR dos ovos das fêmeas de <i>A. sculptum</i> alimentadas artificialmente.	49
7.5 qPCR dos adultos de <i>A. sculptum</i> que emergiram das ninfas alimentadas artificialmente.....	50
8. DISCUSSÃO	51
9. CONCLUSÃO	58
10. REFERÊNCIAS.....	59

CEUA – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação da transmissão transovariana e transestadial de *Bartonella* spp. Em *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) alimentados artificialmente.**", protocolo nº 001422/20, sob a responsabilidade da Profª Drª Darci Moraes Barros-Battesti, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao Filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, no decreto 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA), da FACULDADE DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E VETERINÁRIAS, UNESP - CÂMPUS DE JABOTICABAL-SP, em reunião ordinária de 13 de fevereiro de 2020.

Vigência do Projeto	20/02/2020 a 02/09/2020
Espécie / Linhagem	Coelho Nova Zelândia
Nº de animais	6
Peso / Idade	Aproximadamente 2,5 kg / 6 meses
Sexo	Fêmeas
Origem	Biotério de Botucatu (Unesp FMVZ)

Jaboticabal, 13 de fevereiro de 2020.

Fabiana Pilarski
Profª Drª Fabiana Pilarski
Coordenadora – CEUA

Resumo

Bactérias do gênero *Bartonella* são agentes zoonóticos, podendo causar danos autolimitantes ou fatais aos seus hospedeiros. Essas bactérias infectam diversos animais, e são transmitidas por vetores como pulgas, piolhos, moscas e carrapatos. Além da diversidade de hospedeiros ser um desafio epidemiológico, essas bactérias são fastidiosas e seu isolamento em meio de cultura é uma constante dificuldade. O objetivo do presente estudo foi padronizar a curva de crescimento de *Bartonella* spp. em meio TSB (Tryptic Soy Broth) suplementado e verificar a ocorrência de transmissão transovariana e perpetuação transestadial em carrapatos da espécie *Amblyomma sculptum*, com sangue infectado por *Bartonella* spp., através de alimentação artificial. Para avaliar o crescimento de *Bartonella* spp. foi utilizado o meio de cultura (TSB), suplementado com soro fetal bovino, sacarose e anfotericina. As contagens de UFC para a formação da curva de crescimento foram realizadas em placas pelo método de superfície. Uma vez estabelecida a fase ótima de crescimento da bactéria, chegando na concentração 10^7 a mesma foi utilizada para infectar sangue de coelho previamente testado negativo para *Bartonella* spp. Fêmeas (49) de *A. sculptum* foram alimentadas artificialmente durante duas horas com o sangue infectado, por meio de tubos de microhematócrito, sendo, em seguida, alimentadas naturalmente em coelhos até o completo ingurgitamento. Ninfas (98) também foram alimentadas artificialmente durante quatro dias, por meio de membrana natural feita de pele de camundongo, para a avaliação da perpetuação transestadial de *Bartonella* spp. Após oviposição das fêmeas adultas alimentadas e adultos mudados das ninfas alimentadas artificialmente foram testados molecularmente detecção do DNA do patógeno. Os resultados da curva de crescimento da bactéria mostraram que no meio TSB houve um crescimento lento, porém bem delimitado, com a fase de latência se estendendo por 21 horas, fase exponencial ou log de 40 a 100 horas e fase estacionária se mantendo de 100 a 160 horas, e iniciando seu declínio após esse período. Ensaio de qPCR para *Bartonella* spp., baseado no gene *nuoG* dos ovos das 30 fêmeas sobreviventes após alimentação artificial, mostraram-se negativos, evidenciando que não houve transmissão transovariana. Uma fêmea resultante de

uma ninfa alimentada artificialmente foi positiva, no entanto, a possibilidade de perpetuação transestadial de *Bartonella* spp. por essa espécie de carrapato não pode ser confirmada, haja vista a presença de sangue residual no referido espécime de carrapato. Conclui-se que o meio TSB se mostrou adequado para a realização da curva de crescimento sendo que conseguiu demonstrar todas as fases necessárias na curva. A alimentação artificial dos adultos demonstrou que não há a transmissão transestadial, porém, a alimentação artificial das ninfas não foi conclusiva devido a uma fêmea positiva na qPCR.

Palavras-chave: *Bartonella* spp., *Amblyomma sculptum*, alimentação artificial

Abstract

Bacteria of the genus *Bartonella* are zoonotic agents, being able cause self-damage or fatal to their hosts. These bacteria infect many animals, and are transmitted by vectors like fleas, lice, flies and ticks. In addition to host diversity being an epidemiological challenge, these bacteria are fastidious and their isolation in a culture medium is a constant difficulty. The goal of this study was standardize the growth curve of *Bartonella* spp. in medium TSB (Tryptic Soy Broth) supplemented and verify the occurrence of transovarian transmission and transstate perpetuation in ticks of the species *Amblyomma sculptum* with blood infected by *Bartonella* spp., through artificial feeding. To evaluate the growth of *Bartonella* spp. Culture medium (TSB) was used, supplemented with fetal bovine serum, sucrose and amphotericin. ScoreS CFU for the formation of the growth curve were performed on plates by the surface method. Once the optimal bacterial growth phase is established, arriving at concentration 10^7 it was used to infected rabbit blood previously tested negative for *Bartonella* spp. Females (49) of *A. sculptum* were artificially fed for two hours with infected blood, through microhematocrit tubes, then being naturally fed to rabbits until complete engorgement. Nymphs (98) were also artificially fed for four days, through a natural membrane made of mouse skin, for the assessment of the transstate perpetuation of *Bartonella* spp. After oviposition of the fed adult females and changed adults from artificially fed nymphs were tested molecularly the DNA of the pathogen. The results of the bacterial growth curve showed that in the TSB medium there was a slow growth, however well delimited, with the latency phase extending over 21 hours, exponential or log phase

from 40 to 100 hours and stationary phase remaining from 100 to 160 hours, and starting its decline after that period. qPCR assay for *Bartonella* spp., based on the *nuoG* gene in the eggs of 30 surviving females after artificial feeding, were negative, showing that there was no transovarian transmission. A female resulting from an artificially fed nymph was positive, however, the possibility of transstate perpetuation of *Bartonella* spp. by this species of tick cannot be confirmed, however, the presence of residual blood in the above tick specimen. It is concluded that the TSB medium proved to be adequate for the realization of the growth curve being able to demonstrate all the necessary phases in the curve. The artificial feeding of adults demonstrated that there is no transstate transmission, however, the artificial feeding of the nymphs was not conclusive due to a qPCR positive female.

Keywords: *Bartonella* spp., *Amblyomma sculptum*, artificial feeding

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Classificação taxonômica do gênero <i>Bartonella</i>	24
Quadro 2. Hospedeiros e possíveis vetores associados a algumas espécies de <i>Bartonella</i> spp., que estão relacionadas às doenças humanas.....	25

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo biológico do <i>Amblyomma sculptum</i> na natureza.....	19
Figura 2. Câmara de alimentação de adultos de <i>Amblyomma sculptum</i> em coelho. Somente as fêmeas foram encaminhadas para a alimentação artificial, após três dias de pré-alimentação.....	34
Figura 3. Fêmeas sendo alimentadas artificialmente em capilares microhematócrito.....	35
Figura 4. Fêmeas de <i>Amblyomma sculptum</i> pré - alimentadas em coelho por 3 dias, artificialmente alimentadas por tubos microhematócrito por 2 horas e posterior finalização da alimentação em coelho por 4 dias	36
Figura 5. Esquema completo do experimento de alimentação artificial das ninfas e dos fêmeas de <i>Amblyomma sculptum</i> com pré - alimentação.....	36
Figura 6. Câmara de contenção de tecido no coelho restringindo o espaço de alimentação das ninfas	37
Figura 7. Câmara de alimentação artificial contendo a membrana de pele de camundongo.....	37
Figura 8. Ninfas recém colocadas na câmara de alimentação artificial, com pelos do hospedeiro tentando mimetizar o ambiente de alimentação no coelho.....	38
Figura 9. Gráfico em colunas representando as horas de coleta relacionadas com o padrão de crescimento bacteriano (concentração de UFC/ml) da <i>Bartonella</i> spp., em meio líquido TSB.....	43
Figura 10. Gráfico em curva representando as horas de coleta relacionadas com o padrão de crescimento (densidade celular) de <i>Bartonella</i> spp.....	43
Figura 11. Placa de ágar chocolate enriquecido após 72 horas de incubação com <i>Bartonella</i> spp.....	44
Figura 12. O círculo vermelho evidencia a excreção pela abertura anal das fêmeas alimentadas artificialmente com auxílio de microhematócrito.....	47

Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com Brometo de Etídio pra protocolo de PCR convencional baseada no gene 16S rRNA. Observou-se a positividade de todas as amostras testadas dos ovos e dos adultos de *Amblyomma sculptum*. Controle negativo – água ultra- pura Controle positivo – DNA de46

Figura 14. Ninfas de *Amblyomma sculptum* na câmara de alimentação artificial com pele de camundongo. Resultado após quatro dias de alimentação tendo a troca de sangue de 6 em 6 horas.....48

Figura 15. Adultos resultantes das mudas das ninfas alimentadas artificialmente, preparados para extração de DNA. Nota-se um escurecimento em um dos tubos apontando presença residual de sangue.....49

Figura 16. Curva de amplificação. As curvas em vermelho representam a amplificação de plasmídeos (10^0 10^7) contendo um fragmento de 83 pb do gene *nuoG* de *Bartonella* spp., as curvas e linhas em azul representam a amplificação de amostras de DNA dos adultos.....50

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Composição do meio Tryptic Soy Broth.....	32
Tabela 2. Concentração de UFCs/ml de <i>Bartonella</i> spp., por hora de leitura.....	41
Tabela 3. Peso médio (em mg) das fêmeas de <i>Amblyomma sculptum</i> , antes e após a alimentação artificial.....	45
Tabela 4. Mortalidade das fêmeas submetidas a alimentação artificial.....	47
Tabela 5. Peso médio (em pool) antes da pré alimentação no coelho e peso médio (em pool) após a alimentação artificial das ninfas de <i>Amblyomma sculptum</i>	47
Tabela 6. Mortalidade das ninfas de <i>Amblyomma sculptum</i>	47
Tabela 7. Peso médio (em pool) das ninfas de <i>Amblyomma sculptum</i> em jejum, após pré alimentação no coelho, peso médio (em pool) após a alimentação artificial e peso individual das ninfas após a finalização da alimentação em coelho.....	48

1. INTRODUÇÃO

A alimentação *in vitro* ou alimentação artificial tem sido aplicada em laboratório para uma ampla gama de artrópodes hematófagos. Hindle & Merriman (1912) realizaram os primeiros relatos desse tipo de alimentação em carrapatos da espécie *Argas persicus* (Oken). A partir de então foi possível avaliar a biologia e interação vetor-patógeno e manutenção de colônias desses artrópodes. Algumas espécies de carrapatos ixodídeos já foram alimentadas artificialmente, tais como *Amblyomma sculptum* Berlese (citada como *Amblyomma cajennense*) (MOURA et al., 1997), *Ixodes ricinus* (Linnaeus) (COTTE et al., 2008), *Rhipicephalus appendiculatus* Neumann (WALADDE et al., 1991), *Rhipicephalus microplus* (Canestrini) (LEW-TABOR et al., 2013) e *Rhipicephalus sanguineus* s.l. (Latreille) (OLIVIERI et al., 2018).

Cerca de 75% das doenças existentes são zoonoses, sendo que em sua maior parte deriva de animais selvagens (JONES et al., 2008). O gênero *Bartonella* é formado por diversos patógenos zoonóticos reemergentes e negligenciados, os quais podem causar doenças humanas graves. São bacilos Gram-negativos, que podem infectar células endoteliais e hemácias, causando morte ou infecção crônica. As doenças mais conhecidas causadas por *Bartonella* são: doença de Carrión, febre das trincheiras, doença da arranhadura do gato e angiomatose bacilar.

Nas últimas décadas, os estudos de biologia molecular proporcionaram uma grande evolução, especialmente na caracterização de novos microrganismos e suas relações com possíveis vetores e hospedeiros vertebrados (HARRUS & BANETH, 2005).

2. REVISÃO DE LITERATURA

Carrapatos pertencem à ordem Ixodida e superordem Parasitiformes (KRANTZ & WALKER, 2009). Compreendem artrópodes hematófagos que podem transmitir patógenos aos seus hospedeiros, causando doenças em humanos e animais (SONENSHINE et al., 2013). A saliva desse ectoparasito é uma importante ferramenta para que isso ocorra (SIMO et al., 2017), por facilitar a transmissão de vírus, bactérias,

protozoários e helmintos (JONGEJAN et al., 2004; DANTAS-TORRES et al., 2012; OTRANTO et al., 2013).

A ordem Ixodida é formada por 957 espécies de carrapatos, sendo dividida em três famílias viventes: Ixodidae com 737 espécies, Argasidae com 219 espécies e Nuttalliellidae com 1 espécie (DANTAS-TORRES et al., 2019, MARTINS et al., 2019, MUÑOZ-LEAL et al., 2020).

2.1 Família Ixodidae

Os gêneros compreendidos na família Ixodidae são: *Amblyomma*, *Anomalohimalaya*, *Bothriocroton*, *Cosmiomma*, *Dermacentor*, *Haemaphysalis*, *Hyalomma*, *Ixodes*, *Margaropus*, *Nosomma*, *Rhipicentor* e *Rhipicephalus*. Aqueles que pertencem à família Argasidae são: *Argas*, *Antricola*, *Nothoaspis*, *Ornithodoros* e *Otobius* (NAVA et al., 2014). Dois outros gêneros foram propostos recentemente por Barker & Burger (2018), *Robertisicus* e *Archaeocroton*, para incluir duas espécies consideradas enigmáticas, que estavam no gênero *Amblyomma* Koch. Esse gênero está representado por 137 espécies no mundo (MARTINS et al., 2019; GUGLIELMONE et al., 2019), sendo que quase a metade delas ocorre na região neotropical (GUGLIELMONE et al., 2014; NAVA et al., 2014; KRAWCZAK et al. 2015, MARTINS et al., 2019). Já no Brasil, esse gênero é representado por 32 espécies (GUGLIELMONE et al., 2019). Uma das espécies que mais se destaca por sua grande importância econômica e epidemiológica é *Amblyomma sculptum* Berlese. Infestações por essa espécie causam prejuízos decorrentes da hematofagia, sendo que realizam espoliação sanguínea e transmitem agentes patogênicos causadores de doenças (LABRUNA et al., 2009), algumas delas de alta letalidade, como é o caso da Febre Maculosa.

2.2 *Amblyomma sculptum* Berlese, 1888

Amblyomma sculptum possui uma grande importância na medicina veterinária. Esse táxon pertence a um complexo formado por seis espécies, dentre elas: *Amblyomma mixtum* Koch – ocorre do sul dos Estados Unidos até o norte da América

do Sul; *A. sculptum* – distribui-se no norte da Argentina, Bolívia, Paraguai e na maior parte do Brasil; *Amblyomma tonelliae* Nava, Beati & Labruna - presente nas partes secas da Argentina, Bolívia e Paraguai (NAVA et al., 2014); *Amblyomma interadinum* Beati, Nava & Cáceres – ocorre no Peru (NAVA et al., 2014); *Amblyomma patinoi* Labruna, Nava & Beati - ocorre na cordilheira oriental da Colômbia (NAVA et al., 2014) e *A. cajennense sensu stricto* (Fabricius) – espécie restrita à região amazônica (NAVA et al., 2014; MARTINS et al., 2016).

No Brasil, *A. sculptum* é encontrada principalmente no bioma Cerrado e em áreas degradadas do bioma Mata Atlântica com cobertura semelhante ao bioma Cerrado (MARTINS et al., 2016). Esse carrapato é trioxeno tendo como hospedeiros répteis (MENDOZA-ROLDAN et al., 2020), aves (LUZ et al., 2016; ARAÚJO et al., 2019) e mamíferos (MURARO et al., 2021; MOREIRA et al., 2021), sendo que os mamíferos são preferencialmente mais parasitados em relação aos outros animais, e o parasitismo em humanos é acidental (NAVA et al., 2014).

2.2.1 Ciclo Biológico de *Amblyomma sculptum*

Em geral, os estágios imaturos (larvas e ninfas) parasitam animais de pequeno porte, enquanto o estágio adulto tem preferência em parasitar mamíferos de médio e grande portes (CASTAGNOLLI et al., 2003). Ainda, larvas e ninfas podem ser encontradas em aves (LUZ et al., 2016). Nos mamíferos, esse carrapato apresenta preferência em se fixar nas áreas de peles mais finas como é o caso da região inguinal, axila, região vulvar e tábua do pescoço (PINNA et al., 2004). No decorrer da fase parasitária de cada estágio de *A. sculptum* (larva, ninfa e adultos), os carrapatos fixam-se aos seus hospedeiros para realizarem alimentação que compreende vários dias (**Figura 1**), e no caso dos adultos, alimentação e cópula. Quando repletos, os carrapatos abandonam o hospedeiro, caindo no solo/ambiente para que ocorra a ecdise e/ou a oviposição (no caso das fêmeas) (GUGLIELMONE et al., 2006).

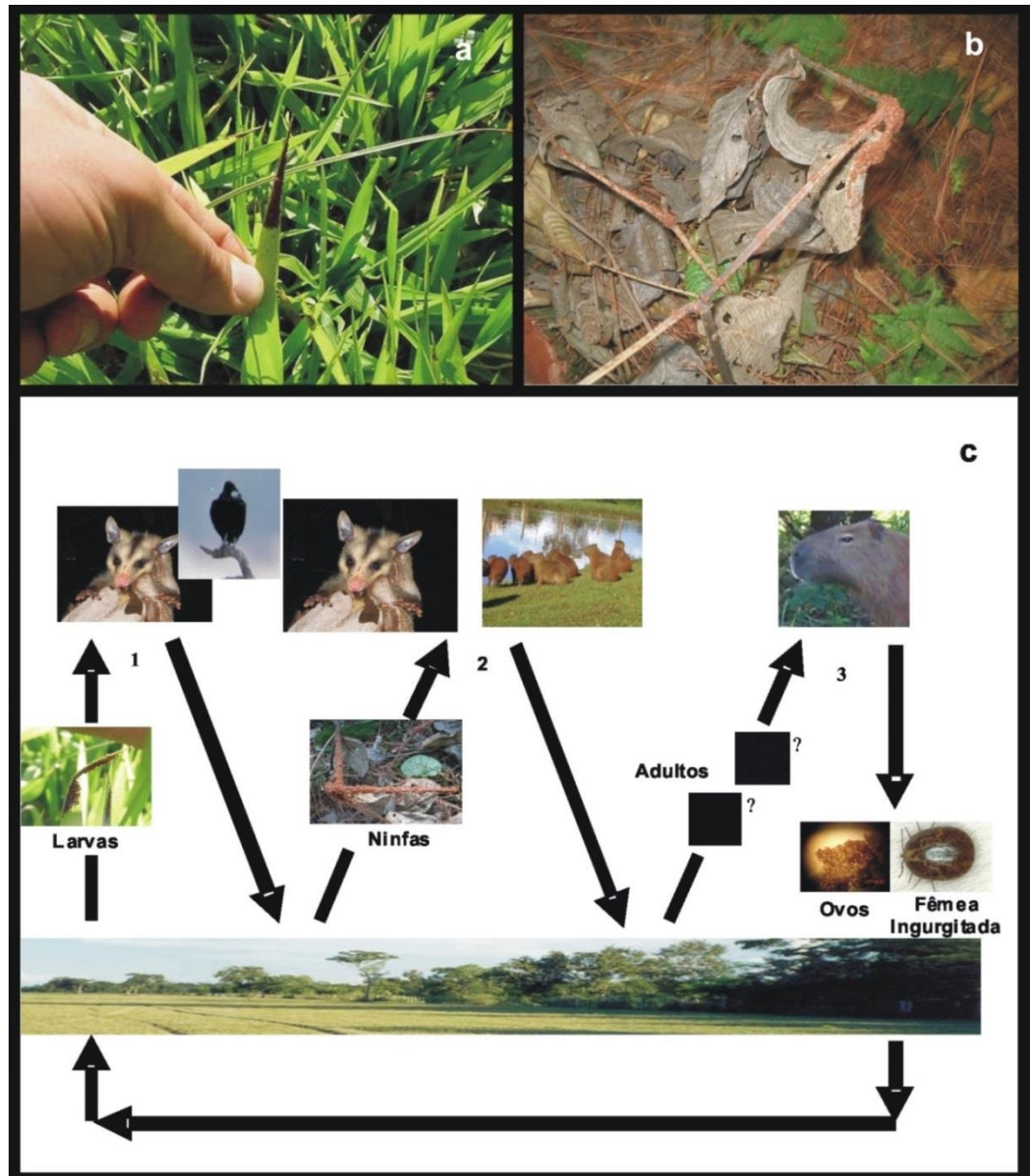


Figura 1. Ciclo biológico de *Amblyomma sculptum* na natureza

a) Fase de vida livre. Larvas aglomeradas na ponta do capim, ocorrendo principalmente no início de abril até o final do inverno (diapausa comportamental). b) Fase de vida livre. Ninfas aglomeradas na vegetação, ocorrendo no início da primavera até o início do verão. c) Fase parasitária. Adultos na vegetação, ocorrendo no final da primavera até o final do outono. Padrão para a região sudeste. (imagens de Carlos Perez).

O ciclo biológico desse carrapato inicia com a queda da fêmea ingurgitada, que geralmente ocorre nas horas mais amenas do dia (final da tarde ou início da manhã). A fêmea procura um microambiente a fim de se proteger dos inimigos naturais e então realiza a oviposição. A quantidade de ovos postos depende do peso da teleógina (GUGLIELMONE et al., 1991). Em geral, na natureza, em condições favoráveis de temperatura e umidade, o período de oviposição leva em média 10 dias, e o período de incubação dos ovos é de 25 a 30 dias. Com cerca de 15 dias após a eclosão, ou quando a cutícula já está mais firme, as larvas sobem nas folhas e ficam agrupadas aos milhares, à espera de um hospedeiro (LABRUNA et al., 2003; GUGLIELMONE et al., 2006). Uma vez em contato com o hospedeiro, as larvas fixam-se à pele e permanecem no hospedeiro até finalizar o ingurgitamento. O período de alimentação das larvas é de 5 a 7 dias, quando então se desprendem, caindo ao solo para realização da ecdise, que em geral leva em média 7 a 10 dias (EMBRAPA, 2015).

Após a muda, as ninfas permanecem no solo até o endurecimento da cutícula, e similarmente ao que ocorre com as larvas, as ninfas com idade de 15 a 20 dias após a muda, sobem nas folhas e ficam aguardando um hospedeiro para realizar o repasto sanguíneo. O período de alimentação das ninfas leva de 5 a 7 dias, caindo novamente ao solo para sofrer ecdise para o estágio adulto, que leva de 12 a 15 dias. Igualmente, após o endurecimento da cutícula, os adultos com idade de 15 a 20 dias após a muda, sobem nas folhas e procuram um novo animal para realização de alimentação e cópula. Machos permanecem nos hospedeiros por longos períodos alimentando-se intermitentemente e aguardando novas fêmeas. Já as fêmeas fixam-se e alimentam-se por 7 a 9 dias, e enquanto estão se alimentando, elas são copuladas pelos machos. Após a cópula, as fêmeas terminam o ingurgitamento, caindo novamente ao solo para oviposição de milhares de ovos, reiniciando o ciclo (GUGLIELMONE et al., 2006). Todo esse processo é permeado por feromônios (SILVERSTEIN et al., 1983).

Em condições de laboratório o ciclo biológico se completa em 93 a 95 dias mas esse período varia enormemente na natureza, devido às alterações nas condições climáticas, vegetação e disponibilidade de hospedeiro (LABRUNA et al., 2009). Além disso, *A. sculptum* faz diapausa comportamental no estágio larval, apresentando apenas uma geração ao ano (LABRUNA et al., 2003; CABREIRA & LABRUNA, 2009). Nos meses mais secos e frios, de abril a agosto/setembro, na região sudeste, as larvas

são predominantes na vegetação, enquanto as ninfas ocorrem principalmente de junho a outubro, e os adultos têm um pico populacional nos meses chuvosos, de setembro a março (GUEDES et al., 2008).

2.3 Alimentação Artificial de Ixodídeos

A alimentação *in vitro* têm se mostrado bastante útil em algumas pesquisas que envolvem acaricidas, mostrando a resistência e sensibilidade dos carrapatos frente a esses componentes presentes nos compostos químicos. Adicionalmente, é possível reduzir gastos econômicos em termos de animais infectados em biotério, tendo apenas que ter o sangue e o isolado do patógeno de estudo para infectar os artrópodes. Essa técnica pode ser utilizada em carrapatos argasídeos para estudo de líquido coxal e excretas, e em ixodídeos, tornando possível um maior entendimento quanto às estruturas secretadas (KRÖBER; GUERIN, 2007).

2.3.1 Técnicas de alimentação artificial de carrapatos

Existem diversas técnicas para alimentação artificial de carrapatos, como uso de membranas artificiais e naturais e tubos capilares, e, em sua maioria, têm a finalidade de manutenção dos carrapatos em colônia, visando reduzir ou evitar o uso de animais de laboratório infectados, como cobaias (BUTLER et al., 1984). Variações das técnicas de alimentação em membrana são as mais utilizadas, mas o tubo capilar de microhematócrito também é muito usado para infecção dos carrapatos *in vitro*.

2.3.2 Alimentação *in vitro* por meio de tubo microhematócrito

É um método que utiliza tubos capilares tradicionais de hematócrito. Essa técnica foi desenvolvida e descrita pela primeira vez por Chabaud (1950), que utilizou os tubos capilares para alimentar os carrapatos ixodídeos *Dermacentor reticulatus* (Fabricius) e *R. sanguineus*. Desde então, várias outras espécies foram alimentadas através dessa técnica (BURGDORFER, 1957; PURNELL & JOYNER, 1967; WALKER et al., 1979; LÖSEL et al., 1993; GERN et al., 1990; DE LA VEGA et al., 2000; KOCAN

et al., 2005). Ela apresenta vantagem quando comparada às demais técnicas devido ao seu custo financeiro baixo, e também por expor os carrapatos ao patógeno, sem a utilização do hospedeiro infectado, forçando a alimentação, já que o tubo é acomodado em seu aparelho bucal (BROADWATER et al., 2002). A base dessa metodologia consiste em fixar os carrapatos em placas de Petri com a face dorsal voltada para baixo, com auxílio de fita dupla face (BURGDORFER, 1957; KOCAN et al., 2005). Alguns experimentos realizados no Brasil obtiveram êxito com a utilização de bandeja de isopor no momento da fixação dos carrapatos (CUNHA et al., 2010; TEIXEIRA et al., 2006).

2.3.3 Alimentação *in vitro* através de membrana artificial

O primeiro relato do uso das membranas artificiais servindo para alimentação artificial foi nos anos 50 (HADDON, 1956). Com os avanços tecnológicos, esses métodos foram aprimorados com a utilização de celofane (TAWFIC; GUIRGUIS, 1969), látex (KIRCH et al., 1991), e silicone (MOURA et al., 1997; FONSECA et al., 1999). É uma técnica geralmente empregada em argasídeos, pois esses carrapatos apresentam boa adaptação a esse tipo de alimentação (DE MEILLON; GOLDBERG, 1967). Os ixodídeos, por sua vez, necessitam de pré-estímulo alimentar para que ocorra a fixação. Essas membranas apresentam a característica de serem semitransparentes, inodoras e flexíveis. Em geral, acrescenta-se uma fina camada de pelo (que tem cheiro do animal) sobre a membrana onde os carrapatos serão colocados, para estimular a alimentação (fagoestimulantes) (HOKAMA et al., 1987).

Embora com algumas limitações, há várias vantagens, como padronização de tratamentos acaricidas em condições controladas, manutenção de biotérios de carrapatos para diversos fins, como estudos da fisiologia do carrapato e interação carrapato-patógeno (GONZÁLEZ et al., 2021).

2.3.4 Alimentação *in vitro* através de membrana natural

Uma das primeiras membranas naturais a serem utilizadas foi a membrana corioalantóide de ovos embrionados de galinha. O uso dessa membrana obteve

sucesso para alimentar carrapatos *O. moubata*, *Ornithodoros turicata* (Dugès) e *Ornithodoros parkeri* Cooley (BURGDORFER; PICKENS, 1954).

Outro relato de sucesso na utilização de membrana natural foi publicado por Mango & Galum (1977). Esses autores estudaram o ciclo biológico de *Ornithodoros moubata* (Murray), utilizando membrana de asa de morcego. Entretanto, quando se trata de ixodídeos podem existir alguns entraves como deterioração da membrana pelo longo período de alimentação necessária.

2.4 Anticoagulantes usados na alimentação *in vitro*

Willadsen et al. (1984) utilizaram a heparina como anticoagulante, relatando o primeiro método desenvolvido para alimentar fêmeas pré-ingurgitadas de *R. microplus* e demonstraram que esse anticoagulante foi o mais eficaz para o desenvolvimento dos carrapatos.

Waladde et al. (1993) observaram a alimentação *in vitro* de ninfas de *R. appendiculatus* utilizando sangue heparinizado seguido de sangue desfibrinado. Segundo esses autores, os espécimes adquiriram pesos de ingurgitamento comparáveis aos carrapatos alimentados no hospedeiro e subsequentemente também mudaram para o estágio adulto. Aquelas ninfas que foram alimentadas com sangue contendo citrato ácido dextrose (ACD) ou EDTA não consumiram sangue e nem ganharam peso.

Lew-Tabor et al. (2014) realizaram experimentos com *R. microplus* usando sangue heparinizado, mostrando resultados mais eficazes sem comprometer a produção e a viabilidade dos ovos. Wechtaisong et al. (2020) alimentaram larvas e ninfas de *R. sanguineus* (s.l.) artificialmente através de membrana com sangue desfibrinado e houve um resultado satisfatório no sucesso de muda.

2.5 Patógenos transmitidos por carrapatos

Os carrapatos são conhecidos como vetores de várias doenças causadas por protozoários, bactérias, vírus (JONGEJAN et al., 2004) e helmintos (OTRANTO et al.,

2013). Esses artrópodes são encontrados tanto em meio rural, como no meio urbano, tornando-se também um problema de saúde pública. Durante a alimentação, os carrapatos inserem seu aparelho bucal na pele do hospedeiro causando danos ao tecido, diminuindo então a lucratividade dos produtores, especialmente com a venda do couro (ESTEVES et al., 2019). Muitas doenças infecciosas emergentes ocorrem devido à transmissão de agentes patogênicos que têm como reservatórios animais selvagens (DAMIAN et al., 2020).

2.6 *Bartonella* spp.

O gênero *Bartonella* pertence ao Filo Proteobacteria e Ordem Rhizobiales (**Quadro 1**) (CHOMEL et al., 2006). As bactérias do gênero *Bartonella* são de crescimento fastidioso, Gram-negativas, intracelulares facultativas e pleomórficas, que parasitam eritrócitos e células endoteliais (KOSOY et al., 2010). A descrição de espécies de *Bartonella* e seus respectivos hospedeiros e vetores está aumentando continuamente. Já foram detectadas mais de 37 espécies e subespécies de *Bartonella* em animais domésticos e selvagens, incluindo gatos, cães, roedores, gado, veados e morcegos (ANDRÉ et al., 2019; DE SOUSA et al., 2010; HELLER et al., 1998; MAILLARD et al., 2007; DEHIO et al., 2001).

Quadro 1. Classificação taxonômica do gênero *Bartonella*

Reino	Bacteria
Filo	Proteobacteria
Classe	Alphaproteobacteria
Ordem	Rhizobiales
Família	Bartonellaceae
Gênero	<i>Bartonella</i>

Fonte: CHOMEL et al., 2006

As bactérias do gênero *Bartonella* causam uma doença conhecida como Bartonelose. Essa doença se apresenta desde a forma autolimitante, podendo se manifestar com febre e até um adoecimento generalizado, causando morte (KOSOY et al., 2010).

Essas bactérias são transmitidas por meio de vetores como pulgas, piolhos, moscas e outros dípteros, além de carrapatos (DENG et al., 2012; WACHTER et al., 2020). *Bartonella henselae* pode ser transmitida por arranhões e mordeduras de gatos (GUTIÉRREZ et al., 2014). Por muito tempo, esse gênero era conhecido por apresentar somente uma espécie, *Bartonella bacilliformis*, agente causador da Febre de Oroya ou Verruga Peruana (doença de Carrión) (MINNICK et al., 2014). Atualmente, o gênero é composto por 37 espécies reconhecidas, com algumas contendo mais de uma subespécie. Alguns *Candidatus* já foram descritos em seres humanos, animais domésticos e selvagens (BREITSCHWERDT et al., 2010; KAEWMONGKOL et al., 2011; ANGELAKIS e; OKARO et al., 2017).

Diversos mamíferos domésticos e selvagens, tais como ruminantes, cães, gatos, roedores, carnívoros, preguiças e humanos, podem atuar como reservatórios para diferentes espécies de *Bartonella* (DENG et al., 2012; SEPÚLVEDA-GARCÍA et al., 2020; GONÇALVES et al., 2020; CALCHI, et al., 2020). Tal diversidade de hospedeiros (**Quadro 2**) implica em desafios epidemiológicos clínicos e de diagnóstico, tanto para a medicina veterinária quanto para a medicina humana (BREITSCHWERDT et al., 2010), já que cerca de 15 espécies foram relacionadas às doenças humanas (OKARO et al., 2017).

Quadro 2. Hospedeiros e possíveis vetores associados a algumas espécies de *Bartonella* spp. que estão relacionadas às doenças humanas

Espécies de <i>Bartonella</i>	Possíveis Vetores	Hospedeiro
<i>B. bacilliformis</i>	<i>Lutzomyia verrucarum</i> (Breitschwerdt, 2014)	Homem
<i>B. vinsonii subsp. vinsonii</i>	Desconhecido (Kaiser et al., 2011)	Roedores
<i>B. quintana</i>	Piolho humano (<i>Pediculus humanus corporis</i>), <i>Ctenocephalides felis</i> , carrapato	Homem

	(<i>Ixodes pacificus</i>) (Chomel et al., 2010)	
<i>B. henselae</i>	<i>Ctenocephalides felis</i> e carrapatos (<i>Ixodes ricinus</i> , <i>Ixodes pacificus</i> e <i>Rhipicephalus sanguineus</i>) (Breitschwerdt, 2014)	Gato, cão, homem e outros
<i>B. elizabethae</i>	Pulga dos roedores (<i>Ctenophtalmus nobilis</i>) (Breitschwerdt, 2014)	Rato
<i>B. grahamii</i>	Pulgas dos roedores (<i>Ctenophtalmus nobilis</i>) (Breitschwerdt, 2014)	Camundongo
<i>B. doshiae</i>	Pulga dos ratos (<i>Xenopsylla cheopis</i>) (Kaiser et al., 2011)	Roedores
<i>B. clarridgeiae</i>	Pulga dos gatos (<i>Ctenocephalides felis</i> e <i>Ctenophtalmus nobilis</i>) (Breitschwerdt, 2014)	Gato
<i>B. vinsonii subsp. berkhoffii</i>	Carrapato (<i>Ixodes pacificus</i>) (Chang et al., 2001)	cão
<i>B. vinsonii subsp. arupensis</i>	Carrapato (<i>Ixodes pacificus</i>) (Kaiser et al., 2011)	Cão, camundongo, homem
<i>B. chomelii</i>	Desconhecido (Kaiser et al., 2011)	Gado
<i>B. koehlerae</i>	Gato (Chomel et al., 2010)	Gato
<i>B. alsatica</i>	Pulgas?	Coelho

	(Breitschwerdt, 2014)	
<i>B. washoensis</i>	Carrapatos (<i>Ixodes pacificus</i>) e esquilos (<i>S. beecheyi</i>) (Chomel et al., 2010)	Roedores
<i>B. tamiae</i>	Rato? (Chomel et al., 2010)	Rato
<i>B. rochalimae</i>	Desconhecido (Chomel et al., 2010)	Desconhecido

Adaptado de Pitassi (2013)

Durante seu desenvolvimento esses patógenos se adaptaram a vários hospedeiros (BUFFET et al., 2013), porém, os roedores, têm sido observados como reservatórios de um grande número de bactérias deste gênero (GONÇALVES et al., 2016; SCHOTT et al., 2020).

2.7 Principais doenças causadas por *Bartonella* spp.

2.7.1 Doença de Carrión

É causada por *B. bacilliformis* e transmitida por dípteros (Psychodidae) da espécie *Lutzomyia verrucarum* (MACO et al., 2004). É uma doença endêmica em algumas regiões da América do Sul como sudoeste da Colômbia, do Equador, até o centro do Peru (GARCIA-CACERES & GARCIA, 1991). As pessoas que adquirem essa bactéria apresentam febre, que pode ser baixa e insidiosa ou abrupta e alta, mal estar, mialgias e artralgias.

2.7.2 Verruga Peruana

É uma doença de fase tecidual e corresponde à fase crônica da Doença de Carrión (NOGUCHI, 1926). Possui a característica de formar erupção nodular característica na pele que dura de semanas a vários meses (NOGUCHI, 1926).

2.7.3 Febre das Trincheiras

Causada pela *B. quintana* e foi reconhecida como doença durante uma epidemia na Primeira Grande Guerra, em 1915 (MAURIN & RAOULT, 1996). Ocorre em quase todas as regiões, causando uma infecção de forma endêmica em populações com infestação por piolhos do corpo e com más condições de higiene (MAURIN & RAOULT, 1996). Atualmente ela é vista como febre das trincheiras urbanas dos dias modernos, sendo que a infecção ocorre, na sua maior parte, em pessoas de rua (ANDERSON & NEUMAN, 1997). Pode se apresentar de forma gripal comum e sem sintomas fortes, assim como, febre alta prolongada (RAOULT, 1999).

2.7.4 Doença da arranhadura do gato

Causada por *B. henselae* (OKARO et al., 2021). O ser humano se infecta com essa bactéria através da arranhadura ou mordida do gato parasitado por pulgas infectadas pela *Bartonella* (GURU et al., 2018). Essa doença possui um período de incubação variável de dias até semanas. Segundo Carithers (1985), depois de cerca de 3 dias, iniciam-se as aparições de pápulas eritematosas e, com cinco dias, transformam-se em vesículas crostosas, as quais podem permanecer por dias e, depois disso, evoluírem para máculas.

2.7.5 Angiomatose Bacilar

É uma doença incomum devido a uma infecção por *B. henselae* ou *B. quintana*. Caracteriza-se por apresentar proliferação neovascular nos órgãos ou na pele e, geralmente ocorre em pacientes imunocomprometidos (AKRAM, 2021).

3. Cultivo de *Bartonella* spp.

O principal desafio no momento de realizar detecção, isolamento e padrão de crescimento de *Bartonella* em meio de cultura é o período de incubação, ou seja, é o período de espera até que seja possível a visualização da bactéria na placa de ágar

(WONG et al., 1994). Meios de cultura (líquidos ou sólidos) têm sido empregados com sucesso para isolamento e crescimento de *Bartonella*, como por exemplo, o meio *Leptospira* suplementado com glicose, maltose e inulina (NOGUCHI et al., 1926) e o meio Schneider's, desenvolvido por Riess et al. (2008). Atualmente, o meio mais utilizado para isolar e obter crescimento satisfatório é o *Bartonella* Alphaproteobacteria (BAPGM) recomendado por Maggi et al. (2005) e Cadenas et al. (2007).

Os primeiros relatos de cultivo de *Bartonella* spp. foram na década de 20, quando Noguchi et al. (1926) relataram a febre de Oroya ou verruga peruana. A partir de então, mais estudos foram realizados com essa bactéria, a fim de entender a relação vetor-patógeno, incluindo seu isolamento (MARMORSTON-GOTTESMAN et al., 1932; GUTIÉRREZ et al., 2017). A alta diversidade genética entre as espécies de *Bartonella* torna a identificação dos possíveis vetores uma tarefa desafiante. Como novas espécies e subespécies dessa bactéria estão sendo descritas constantemente, a sua relevância na saúde animal e pública também aumenta cada vez mais (GUTIÉRREZ et al., 2017).

3.1 Meio de cultivo - Tryptic Soy Broth

Para realizar o padrão de crescimento de bactérias, é recomendado o meio Tryptic Soy Broth (TSB), que é formado por peptona de caseína e peptona de soja (LIM, 2003). Esse meio possui propriedades que maximizam a atividade antifúngica, evitando contaminantes no cultivo líquido (SA-UTH et al., 2018), além de fornecer vitaminas e minerais. Os açúcares da peptona promovem o crescimento do microorganismo (LIM, 2003).

4. JUSTIFICATIVA

A participação dos carrapatos na transmissão da *Bartonella* spp. ainda é controversa, apesar de algumas espécies terem sido encontradas naturalmente infectadas, e duas espécies terem sido comprovadamente capazes de adquirir e transmitir o patógeno *in vitro*. Devido à falta de informações sobre possíveis vetores de *Bartonella* spp. no Brasil e ausência de evidências de perpetuação transestadial e

transmissão transovariana da bactéria em carrapatos brasileiros, a espécie *A. sculptum* foi escolhida para ser avaliada no presente estudo, quanto ao seu papel na transmissão desses patógenos, por meio de alimentação artificial. Além disso, essa espécie tem ampla distribuição geográfica no país, é altamente antropofílica e suas formas imaturas possuem baixa especificidade, e podem parasitar roedores

5. OBJETIVOS

5.1 Geral

Padronizar a curva de crescimento de *Bartonella* spp. em meio TSB suplementado e verificar a ocorrência de transmissão transovariana e perpetuação transtadial em carrapatos da espécie *A. sculptum*, com sangue infectado por *Bartonella* spp., através de alimentação artificial.

5.2 Específicos

- Avaliar o padrão de crescimento de *Bartonella* spp., obtida de um roedor da espécie *Thrichomys fosteri* amostrado no Pantanal Sul-Matogrossense, centro-oeste do Brasil, em meio suplementado Tryptic Soy Broth (TSB);
- Submeter fêmeas de *A. sculptum* à alimentação artificial, testando o potencial desse carrapato em adquirir e transmitir *Bartonella* spp., transovarianamente;
- Infectar ninfas de *A. sculptum* por meio de alimentação artificial testando o potencial deste estágio em adquirir e perpetuar *Bartonella* spp., transtadialmente.

6. MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Cultura e obtenção de isolado de *Bartonella* spp.

Foram amostrados 129 roedores em duas expedições ao Pantanal Sul-matogrossense, entre dezembro de 2018 e fevereiro de 2019. Dentre os 129 roedores amostrados, 79 (61,2%) animais pertenciam à espécie *Thrichomys fosteri*, quatro

(3,1%) à espécie *Clyomys laticeps* e 46 (35,7%) à espécie *Oecomys mamorae*. As amostras de sangue dos roedores foram submetidas a cultura líquida e sólida para detecção e isolamento de *Bartonella* spp, respectivamente. O meio de crescimento líquido utilizado foi o Bartonella Alphaproteobacteria (BAPGM), o qual foi formulado com base na composição bioquímica do meio de crescimento de insetos IPL-41 Insect Medium (Sigma).

6.2 Meio líquido de crescimento

O meio a base de TSB suplementado (**Tabela 1**) foi o escolhido para testar o isolamento de *Bartonella* spp. Inicialmente o caldo foi preparado com 6 g de meio TSB dissolvidos em 200 mL de água destilada. Em seguida, o meio foi suplementado com 20 mL de Soro Fetal Bovino (SFB) e 10 g de sacarose. Posteriormente foi esterilizado por filtração através em filtro com tamanho de 0,2 μ m (Corning, NY), e depois disso adicionado a 55 μ L de anfotericina B.

6.2.1 Plaqueamento em superfície

O método utilizado foi o plaqueamento em superfície conforme recomendado por da Silva et al. (2017), para aumentar a exposição ao oxigênio. Com o inóculo já preparado foram retiradas 5 alçadas de bactérias já crescidas de uma placa de ágar chocolate e depositadas nesse mesmo caldo TSB para crescimento, deixando o inóculo pronto para uso, armazenado a 37°C com 5% de CO₂ em incubadora de cultura com CO₂/O₂ (Water Jacketed, NuAire). O inóculo passou por diluição seriada (uma série de diluições simples que amplificam o fator de diluição) na presença de água peptonada 0,1% a cada nova hora de leitura. A primeira diluição foi executada na proporção de 9/1, ou seja, 4,5 mL de água peptonada juntamente com 0,5 mL de inóculo, totalizando 10⁻¹, cujo conteúdo foi armazenado em tubo plástico cônico de 15 mL. O mesmo conteúdo do tubo foi utilizado para a segunda diluição, e assim sucessivamente até chegar a 10⁻⁶. Foram retirados 100 μ L de cada tubo contendo as diluições, os quais em seguida foram plaqueados, sendo dispersos na placa de ágar

chocolate enriquecido com auxílio de alça de Drigalski. Cada placa representou uma diluição, sendo que em cada leitura foram realizadas seis diluições.

Tabela 1. Composição do meio Tryptic Soy Broth

Composição Meio TSB	Suplemento a cada 200 ml de Meio
Peptona de caseína (pancreática), 17 g/L	55 g de Sacarose
Hidrogenofosfato dipotássico , 2.5 g/L	20 mL de Soro Fetal Bovino
Glicose, 2.5 g/L	55 µL de Anfotericina 100 mg/L
Cloreto de sódio, 5 g/L	
Peptona de soja (digestão da papaína), 3 g/L	

Sigma aldrich

6.2.2 Quantificação de *Bartonella* spp.

A quantificação das bactérias foi realizada pelo método de contagem padrão em placas, determinando-se o número de unidades formadoras de colônias (UFC/mL). Foram realizadas coletas das amostras a cada 3 horas durante 7 dias, totalizando 52 coletas. Cada placa foi armazenada a 37°C com 5% de CO₂ em incubadora de cultura com CO₂/O₂ (Water Jacketed, NuAire). O período de incubação das placas foi de 72 horas e, após esse período, foi possível visualizar as unidades formadoras de colônias por mL (UFCs/mL).

6.3 Origem da colônia de *Amblyomma sculptum*

Espécimes de *A. sculptum* foram coletados em 2018 nas áreas verdes da ESALq /USP, Piracicaba, SP (22° 43' 30" S, 47° 38' 51" W), utilizando armadilha de CO₂, e enviados ao Departamento de Patologia, Reprodução e Saúde Única da Universidade Estadual Paulista, pelo Dr. Carlos Perez. Os exemplares foram colocados em frascos de plástico, etiquetados e, subsequentemente, mantidos em estufa biológica, com demanda de oxigênio (B.O.D.) à 27°C e 90% ± 10% de umidade. Para a manutenção da colônia, os carrapatos foram alimentados em coelhos (livres

de infecção) da raça Nova Zelândia, provenientes do biotério da UNESP – Botucatu. Dois carrapatos foram submetidos a extração de DNA e posterior qPCR para comprovar a ausência de *Bartonella* spp.

6.4 Lavagem do inóculo de *Bartonella* spp.

A infecção do sangue foi realizada após a lavagem do inóculo, para que as bactérias estivessem concentradas. Em cada nova troca de sangue, sendo na alimentação artificial dos adultos ou das ninfas, a lavagem foi realizada da mesma maneira. Quando o inóculo em meio TSB atingiu sua maior concentração (10^7), que ocorreu entre o 5º. e o 7º. dia, 14 mL do inóculo contendo *Bartonella* spp., que estava na concentração de 10^7 UFCs/ml foram lavados 3 vezes com meio SPG (Glutamato de Sacarose de Fosfato, composto por 75 g de sacarose, 0,6 g de Fosfato monopotássico, 2,83 g de fosfato dipotássico e água destilada para completar 1 litro) e centrifugados a 2500 rpm por 5 minutos. Após a última lavagem, o sobrenadante foi descartado, e o pellet foi ressuspensionado em 1 mL de SPG, adicionado a 2 mL de sangue e, então, o conteúdo foi homogeneizado.

6.5 Alimentação artificial de fêmeas adultas de *Amblyomma sculptum* utilizando sangue infectado com *Bartonella* spp.

Inicialmente as fêmeas de *A. sculptum* (49) foram pré-alimentadas por 3 dias em coelho (**Figura 2**), para receber estímulo alimentar, seguindo as orientações de Lew-Tabor et al. (2014). Após os três dias, as fêmeas parcialmente alimentadas foram retiradas do coelho com auxílio de uma pinça e uma gota de álcool sobre o espécime para o relaxamento, evitando lesionar o hipostômio. Uma vez removidas do hospedeiro, as fêmeas foram pesadas e então encaminhadas para a alimentação artificial.



Figura 2. Câmara de alimentação de adultos de *A. sculptum* em coelho. Somente as fêmeas foram encaminhadas para a alimentação artificial, após três dias de pré-alimentação.

Foram coletados 5 mL de sangue, através de punção venosa da veia cefálica em um coelho da raça Nova Zelândia, o qual foi previamente testado para a infecção com *Bartonella* spp., utilizando qPCR baseada no gene *nuoG*, seguindo o protocolo estabelecido por André et al. (2015). O sangue foi colhido em seringa esterilizada e então o conteúdo foi transferido para um tubo à vácuo de coleta de 5 mL contendo heparina lítica (Vacutainer®) como anticoagulante. A alimentação artificial foi realizada em 59 fêmeas de *A. sculptum*, com idade de 4 semanas após a emergência. O experimento se dividiu em 2 grupos: Grupo Controle contendo 10 fêmeas e Grupo Teste contendo 49 fêmeas. As fêmeas de *A. sculptum* pré-alimentadas foram separadas e pesadas (em pool) para serem submetidas à alimentação artificial. Tubos de microhematócrito foram preenchidos com o sangue infectado com *Bartonella* spp., e acomodados ao hipostômio de cada fêmea (**Figura 3**).



Figura 3. Fêmeas sendo alimentadas artificialmente em capilares de microhematócrito.

As fêmeas do grupo controle foram alimentadas com sangue de coelho sem infecção por *Bartonella* spp., ao todo foram 10 fêmeas encaminhadas para o grupo controle, o peso inicial foi de 1.6028 mg e logo depois da alimentação no capilar o peso atingido foi de 1.6073, essas fêmeas foram encaminhadas para a finalização do ingurgitamento no coelho e apenas 3 finalizaram a alimentação chegando ao peso individual de 0.6313, 0.4933, 0.5110. As três foram acondicionadas em estufa B.O.D. à 27°C e 90% $\pm$ 10% de umidade, para aguardar a oviposição.

A alimentação artificial ocorreu por duas horas tendo três trocas de tubo microhematócrito. As fêmeas foram novamente pesadas após a alimentação artificial, sendo em seguida, recolocadas em câmara de alimentação fixada no dorso do coelho para finalizar o ingurgitamento que levou 4 dias. Essas fêmeas foram acondicionadas em placas de Petri (**Figura 4**) e mantidas em estufa B.O.D. à 27°C e 90% $\pm$ 10% de umidade, para aguardar a oviposição. Os ovos foram recolhidos com 5 a 7 dias de idade, e submetidos à extração de DNA e qPCR para quantificar a presença de DNA de *Bartonella* spp.

6.6 Origem da membrana natural

As membranas naturais foram retiradas de camundongos com idade entre 6 à 9 semanas. Após eutanásia utilizando propofol na dose de 60 mg/kg os camundongos passaram por avulsão da pele com a utilização de pinça dente de rato e tesoura ponta

romba. A pele passou por tricotomia através de creme depilatório corporal (Veet®), após a retirada dos pelos a pele passou por limpeza em água destilada aquecida, com o intuito de retirar todo o odor do creme depilatório, após esse procedimento as membranas foram encaminhadas para a confecção da câmara de alimentação das ninfas.

6.6.1 Alimentação artificial das ninfas de *Amblyomma sculptum*

Inicialmente as 120 ninfas foram pesadas e tiveram um estímulo de alimentação de três dias no coelho (**Figura 5**) conforme a orientação de Wechtaisong et al. (2020). Um desenho esquemático da alimentação artificial de fêmeas e ninfas está apresentado na **Figura 6**.



Figura 4. Fêmeas de *A. sculptum* pré-alimentadas em coelho por 3 dias, artificialmente alimentadas por tubos de microhematócrito por 2 horas e posterior finalização da alimentação em coelho por 4 dias.



Figura 5. Esquema completo do experimento de alimentação artificial das ninfas e fêmeas de *A. sculptum*, com pré-alimentação (3 dias) e finalização da alimentação em coelhos.



Figura 6. Câmara de contenção de tecido no coelho restringindo o espaço de alimentação das ninfas.

As ninfas após três dias de alimentação no hospedeiro foram retiradas com auxílio de pinça e uma gota de álcool. Logo em seguida foram pesadas e então foram

submetidas à alimentação artificial, em câmara de alimentação com membrana natural de pele de camundongo (**Figura 7**).



Figura 7. Câmara de alimentação artificial contendo a membrana de pele de camundongo.

As ninfas foram alimentadas nesse sistema durante quatro dias (**Figura 8**), e houve a troca de sangue infectado a cada seis horas. Esse conjunto de câmara ficou acomodado em estufa biológica (Eletrolab) com umidade e temperatura de 29° C com agitação, e luminosidade controlada através de cobertura com papel pardo nas partes possíveis de entrada de luz.



Figura 8. Ninfas recém colocadas na câmara de alimentação artificial, com pelos do hospedeiro, tentando mimetizar o ambiente de alimentação no coelho.

Após as 96 de horas de alimentação na membrana, as ninfas ingurgitadas foram pesadas novamente e então encaminhadas para a câmara de alimentação fixada no dorso do coelho para finalizarem o ingurgitamento, que foi concluído em três dias. Após a alimentação, as ninfas foram acondicionadas em frascos de plástico com tampa perfurada e subsequentemente mantidas em estufa biológica, com demanda de oxigênio (B.O.D.) à 27°C e 90% ± 10% de umidade, até a ecdise e posterior qPCR.

6.7 Extração de DNA dos ovos das fêmeas alimentadas no capilar e dos adultos resultantes da ecdise das ninfas

Foi realizada a extração de DNA das massas de ovos (0,100 mg) de *A. sculptum* utilizando-se o kit DNeasy blood and tissue, seguindo o protocolo para tecidos (Qiagen, Chatsworth, CA, EUA). Os ovos resultantes da postura de 26 fêmeas foram macerados separadamente em 50 µL de PBS com o auxílio de pistilo, e a sequência dos procedimentos seguiram o protocolo conforme as recomendações do fabricante.

Após extração de DNA, os ovos e adultos foram submetidos à cPCR baseada no gene 16S rRNA (BLACK E PIESMAN, 1994) e qPCR baseada no gene *nuoG*, utilizando-se o protocolo proposto por André et al. (2015).

6.8 PCR convencional (cPCR) dos ovos e adultos de *A. sculptum* – 16S rRNA

A identidade molecular dos ovos provenientes das posturas das fêmeas e dos adultos que emergiram das ninfas alimentadas artificialmente foi confirmada utilizando um ensaio de PCR convencional com base no gene endógeno 16S rRNA mitocondrial (16S-1: CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT, 16S+1:CTGCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGTGG) (BLACK E PIESMAN, 1994). Foi preparada uma mistura de 5 µL do DNA extraído, 2,5 µL de tampão de PCR 10X (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 200 µM de desoxinucleotídeo trifosfato (dNTPs) (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 1.5 mM de cloreto de magnésio (MgCl₂) (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA), 1 µM de cada oligonucleotídeo iniciador, 0,25 U de Platinum Taq DNA Polimerase (Life Technologies®, Carlsbad, CA, EUA) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, WI, EUA)

q.s.p. 25 µL. As amplificações foram realizadas com desnaturação inicial a 95°C por 5 minutos, seguido de 10 ciclos de 92°C por 1 minuto, 48°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e meio, seguido de 32 ciclos 92°C por 1 minuto, 54°C por 35 segundos, 72°C por 1 minuto e meio e extensão final de 72°C por 7 minutos.

6.8.1 Eletroforese de DNA em gel de agarose

Os produtos amplificados nos ensaios de cPCR foram submetidos à eletroforese horizontal em gel de agarose a 1,0% (**Figura 9**) corado com Brometo de Etídeo (0,5 µL/mL) em tampão de corrida TEB pH 8,0 (44,58 M Tris-base; 0,44 M ácido bórico; 12,49 mM EDTA). A eletroforese foi realizada a 100 V/ 150mA durante 60 minutos. Para a determinação dos produtos amplificados foi utilizado um marcador de peso molecular de 1000 pares de bases (Life Technologies®). Os resultados foram então visibilizados e analisados por meio de um transiluminador de luz ultravioleta (ChemiDocMP Imaging System, BIO RAD®).

6.9 PCR em tempo real quantitativa (qPCR) para *Bartonella* spp.

As amostras positivas na cPCR para o gene endógeno foram submetidas a um protocolo de PCR em tempo real (qPCR) baseado no gene *nuoG* (83 pb), utilizando os oligonucleotídeos iniciadores (Integrated DNA Technologies®, Coralville, Iowa, Estados Unidos) F (5'-CAATCTTCTTTTGCTTCACC-3') e R (5'-TCAGGGCTTTATGTGAATAC-3') e a sonda de hidrólise TaqMan TexasRed-5'-TTYGTCATTTGAACACG-3'[BHQ2a-Q]3' (ANDRÉ et al., 2015). A reação de amplificação foi realizada utilizando volume total final de 10 µL, contendo uma mistura de 1 µL do DNA-amostra, 0,6 µM de cada oligonucleotídeo iniciador e sonda de hidrólise, tampão da PCR (GoTaq® qPCR Master Mix, 2x, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) e água ultra-pura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) q.s.p. 10µL. A sequência térmica e de tempo de amplificação foram de: 95°C por 3 minutos seguidos por 40 ciclos compostos por 95°C por 10 minutos e 52,8°C por 30 segundos. As reações de amplificação foram conduzidas em aparelho termociclador CFX96 Thermal Cycler (BioRad®, Hercules, Califórnia, Estados Unidos). Curva-padrão?

7. RESULTADOS

A sequência obtida do gene 16S rRNA da bactéria utilizada no presente estudo mostrou 99% de identidade com *Bartonella vinsonii* subsp. *arupensis* (Número de acesso do GenBank: NR_104902). A sequência obtida do gene *gltA* mostrou 100% de identidade com *Bartonella* sp. detectada em outros roedores do Pantanal Sul-Matogrossense (KF021604), e 95-98% de identidade com *Bartonella* spp. detectada em roedores do Rio de Janeiro (KX270242; MN613442).

7.1 Meio TSB

O meio líquido de crescimento TSB resultou em uma resposta excelente, já que as bactérias apresentaram crescimento (**Figura 9**).

Os resultados da curva de crescimento (**Figura 10**) demonstraram que o meio TSB para padronizar o crescimento da *Bartonella* spp. foi uma boa escolha, visto que a bactéria apresentou um desenvolvimento lento, porém bem delimitado. A suplementação desse meio, com soro fetal bovino, sacarose e anfotericina B, forneceu ótimas condições para promover o crescimento bacteriano.

A população de *Bartonella* spp. na primeira hora de coleta foi de 10^2 , e logo em seguida a curva de crescimento entrou em fase lag, que se estendeu por 21 horas. Logo depois o crescimento bacteriano entrou em fase exponencial ou log permanecendo nessa fase de 40 a 100 horas. Depois desse intervalo entrou na fase estacionária se mantendo de 100 a 160 horas, e iniciando seu declínio após esse período (**Tabela 2**).

Tabela 2. Concentração de UFCs/mL de *Bartonella* spp. por hora de leitura

Hora de Leitura	População (UFC/ml)
0	$2,0 \times 10^2$
3	$1,0 \times 10^3$
6	$2,2 \times 10^3$

9	$8,0 \times 10^3$
12	$2,0 \times 10^3$
15	$6,0 \times 10^3$
18	$4,0 \times 10^3$
21	$4,0 \times 10^3$
24	$4,2 \times 10^4$
27	$2,0 \times 10^4$
30	$6,0 \times 10^4$
33	$3,0 \times 10^4$
36	$7,0 \times 10^4$
39	$6,0 \times 10^4$
42	$2,0 \times 10^4$
45	$5,0 \times 10^4$
48	$3,0 \times 10^4$
51	$4,0 \times 10^4$
54	$1,2 \times 10^5$
57	$2,5 \times 10^5$
60	$3,8 \times 10^5$
63	$4,5 \times 10^6$
66	$3,7 \times 10^5$
69	$3,7 \times 10^5$
72	$4,8 \times 10^7$
75	$2,7 \times 10^7$
78	$4,8 \times 10^7$
81	$2,1 \times 10^7$
84	$2,1 \times 10^7$
87	$4,2 \times 10^7$
90	$4,2 \times 10^7$
93	$4,2 \times 10^7$
96	$3,3 \times 10^7$
99	$3,6 \times 10^7$
102	$3,6 \times 10^7$
105	$1,7 \times 10^7$
108	$1,7 \times 10^7$
111	$2,0 \times 10^7$
114	$2,3 \times 10^7$
117	$2,2 \times 10^7$
120	$1,5 \times 10^7$

123	$1,4 \times 10^7$
126	$9,0 \times 10^6$
129	$1,8 \times 10^7$
132	$1,0 \times 10^7$
135	$1,7 \times 10^7$
138	$3,5 \times 10^7$
141	$3,5 \times 10^7$
144	$9,0 \times 10^6$
147	$6,0 \times 10^6$



Figura 9. Gráfico em colunas representando as horas de coleta relacionadas com o padrão de crescimento bacteriano (concentração de UFC /ml) o da *Bartonella* spp. em meio líquido TSB.

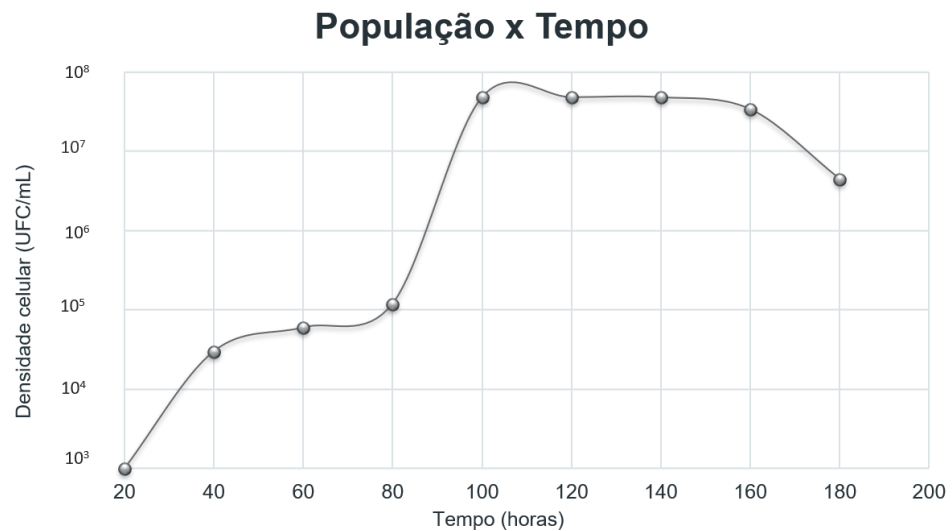


Figura 10. Gráfico em curva representando as horas de coleta relacionadas com o padrão de crescimento (densidade celular) de *Bartonella* spp.

O tempo de incubação da bactéria nas placas de ágar chocolate enriquecido foi de 72 horas nas condições descritas anteriormente, e cada contagem foi realizada a olho nu através da visualização das UFCs/mL (**Figura 11**).



Figura 11. Placa de ágar chocolate enriquecido após 72 horas de incubação com *Bartonella* spp.

A presença de *Bartonella* spp. nas placas foi confirmada pelo teste de qPCR para o agente.

7.2 Alimentação artificial das fêmeas de *A. sculptum*

Foram realizados três experimentos de alimentação *in vitro* das fêmeas de *A. sculptum* pré-alimentadas no hospedeiro por três dias, totalizando 49 fêmeas. Antes da alimentação artificial em cada experimento, as fêmeas pré-alimentadas no coelho pesaram em pools na média 0,2049 mg, 0,4060 mg e 0,2482 mg, respectivamente. Após a alimentação artificial, o peso médio dessas fêmeas foi de 0,8037 mg, 0,4250 mg e 0,5776 mg, respectivamente, evidenciando um ganho médio de peso de 0,0598 mg, 0,0190 mg e 0,3294 mg, respectivamente (**Tabela 3**). Essa ingestão sanguínea durante a alimentação no capilar também pode ser vista na **Figura 12**. As fêmeas excretaram substância avermelhada pela abertura anal logo após o início da alimentação artificial. Após a finalização da alimentação em coelho e a fixação em placa de Petri, as 30 fêmeas sobreviventes iniciaram as posturas dos ovos com uma média de 7 a 9 dias. Após esse período foi realizada a cPCR baseado no gene 16 S rRNA (**Figura 13**).

Tabela 3. Peso médio (em mg) das fêmeas de *Amblyomma sculptum*, antes e após a alimentação artificial.

Condição das fêmeas	1° Grupo	2° Grupo	3° Grupo
Número inicial de fêmeas	10	20	19
Peso médio antes da alimentação artificial	0,2049	0,4060	0,2482
Peso médio após a alimentação artificial	0,8037	0,4250	0,5776
Número de fêmeas que morreram antes da finalização da alimentação no hospedeiro	8	4	7
Número de fêmeas que finalizaram a alimentação no hospedeiro	2	16	12



Figura 12. O círculo vermelho evidencia a excreção pela abertura anal das fêmeas alimentadas artificialmente com auxílio de microhematrocrito, indicando que houve ingestão de sangue pelo capilar.

Houve perdas de fêmeas durante os experimentos, porém no período de alimentação nos capilares não houve nenhuma morte (**Tabela 4**). A etapa após a alimentação artificial com a mudança do capilar para o hospedeiro foi a fase mais crítica nos três experimentos, seguida por perda na estufa B.O.D. após a finalização da alimentação em coelho.

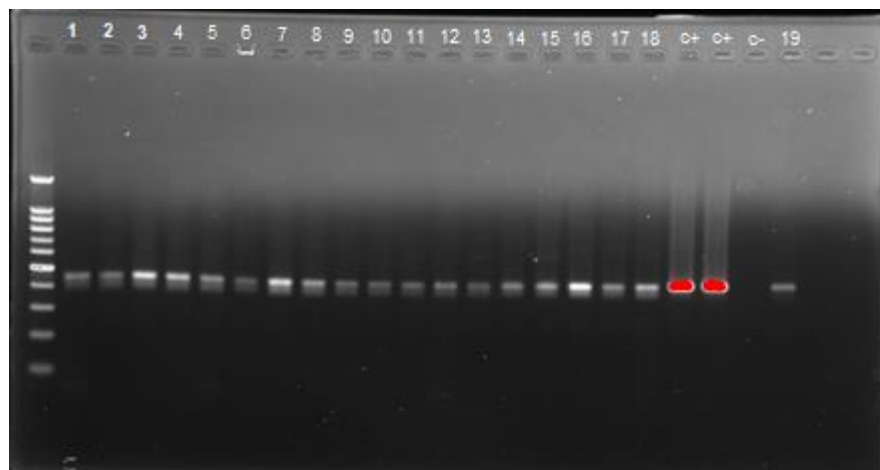


Figura 13. Eletroforese em gel de agarose 1,0% corado com brometo de etídeo para protocolo de PCR convencional baseada no gene 16S rRNA. Observou-se positividade de todas as amostras testadas dos ovos de *A. sculptum*.

Controle negativo – água ultra-pura

Controle positivo – DNA de

7.3 Alimentação artificial das ninfas de *Amblyomma sculptum*

Das 120 ninfas encaminhadas para pré-alimentação no hospedeiro, apenas 98 foram retiradas sem lesionar o hipostômio. Os espécimes foram pesados após a pré-alimentação, antes e após a alimentação artificial, e também após a finalização da alimentação no hospedeiro. As ninfas pré-alimentadas pesaram em média 0,001735 mg, e após a alimentação artificial na membrana, o peso médio foi de 0,00275 mg (**Tabela 4**).

Houve alta mortalidade das ninfas durante a alimentação artificial (**Tabela 5**). Apenas 8 das 98 ninfas conseguiram se fixar e se alimentar na membrana de pele de camundongo (**Figura 14**).

Tabela 4. Mortalidade das fêmeas submetidas à alimentação artificial

Mortalidade das fêmeas	1° Experimento	2° Experimento	3° Experimento
Morte no coelho após a alimentação artificial	8 fêmeas	2 fêmeas	5 fêmeas
Morte durante a alimentação artificial	-	-	-
Morte na estufa B.O.D. após finalização do ingurgitamento no coelho	-	2 fêmeas	2 fêmeas

Tabela 5. Peso médio (em pool) antes da pré-alimentação no coelho e peso médio (em pool) após a alimentação artificial das ninfas de *Amblyomma sculptum*.

Condição das ninfas	1° Repetição
Número de ninfas pré-alimentadas no coelho	98
Peso médio das ninfas pré-alimentadas no coelho e antes da alimentação artificial	0,0017
Número de ninfas que morreram durante a alimentação na membrana	90
Número de ninfas alimentadas na membrana	8
Peso médio das ninfas após a alimentação artificial	0,0027

Tabela 6. Mortalidade das ninfas de *Amblyomma sculptum* antes e após alimentação artificial.

Condição da perda das ninfas	Número de ninfas perdidas
Morte no hospedeiro durante o estímulo da glândula salivar (pré-alimentação)	22 ninfas
Morte durante a alimentação artificial	90 ninfas
Morte no hospedeiro após a alimentação artificial	4 ninfas
Morte na estufa B.O.D após ingurgitamento	0

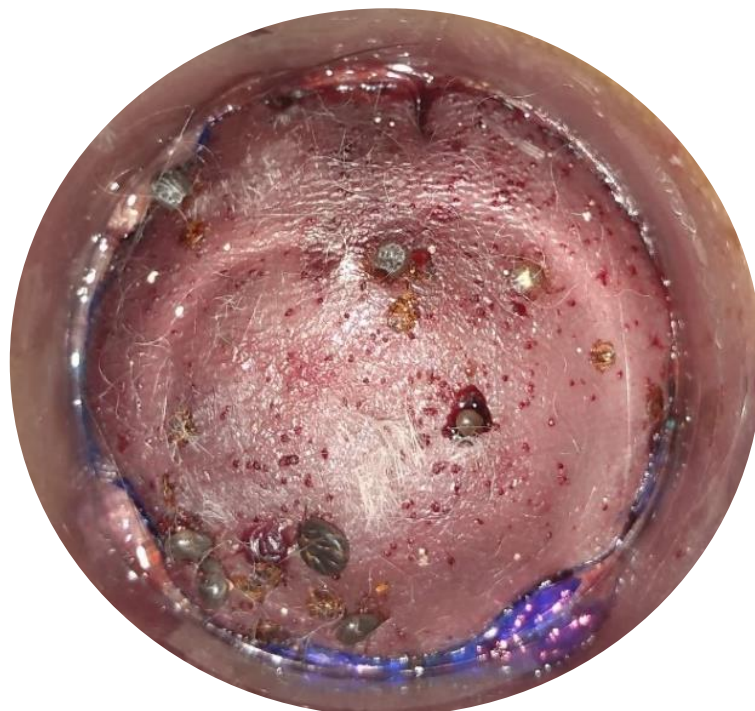


Figura 14. Ninfas de *A. sculptum* na câmara de alimentação artificial com pele de camundongo. Resultado após quatro dias de alimentação tendo a troca de sangue de 6 em 6 horas.

Depois de quatro dias de alimentação artificial, as ninfas que sobreviveram (4) foram encaminhadas para finalizar o ingurgitamento no coelho. Somente quatro ninfas concluíram a alimentação no coelho, e todas mudaram para 2 fêmeas e 2 machos, depois de 10 a 12 dias. As outras (4) morreram fixadas no hospedeiro. O ganho de peso das ninfas que sobreviveram após o término de alimentação no coelho está demonstrado na **Tabela 7**.

Tabela 7. Peso médio (em pool) das ninfas de *Amblyomma sculptum* em jejum, após pré-alimentação no coelho, peso médio (em pool), após a alimentação artificial, e peso individual das ninfas, após finalização da alimentação em coelho.

Condição das ninfas	1° Repetição
	Pesos em mg
Peso médio em pool das ninfas em jejum (N=120)	0,0014
Peso médio das ninfas pré-alimentadas no coelho (N=98)	0,0017
Peso médio das ninfas após alimentação artificial (N=8)	0,0027
Peso individual das ninfas após a finalização no coelho (N=4)	0,0069
	0,0093
	0,0073
	0,0071

O grupo controle das ninfas se baseou em uma ninfa que foi deixada alimentar naturalmente no coelho não passando pela alimentação na membrana. Essa ninfa alcançou o peso de 0,0190 mg e mudou para fêmea após 12 dias.

7.4 qPCR dos ovos das fêmeas de *A. sculptum* alimentadas artificialmente

Das 26 fêmeas que finalizaram o ingurgitamento, cada uma gerou dois pools de massas de ovos, que foram divididos da seguinte forma: início da oviposição até o sexto dia e outro do sexto dia até a finalização da oviposição. Esses ovos ficaram em

estufa B.O.D. à 27°C e 90% $\pm$ 10% de umidade por 14 dias até serem submetidos à extração de DNA e posterior qPCR para *Bartonella* spp. Na totalidade, os ovos mostraram-se negativos na referida qPCR, evidenciando que não houve transmissão transovariana.

7.5 qPCR dos adultos de *A. sculptum* que emergiram das ninfas alimentadas artificialmente

As ninfas sofreram muda para o estágio adulto 17 dias após a queda do hospedeiro. Os quatro espécimes foram mantidos em estufa B.O.D. à 27°C e 90% $\pm$ 10% de umidade por 20 dias, à espera que todo o sangue ingerido fosse digerido. Após a extração de DNA (**Figura 15**) e qPCR para *Bartonella* spp., uma fêmea e dois machos foram negativos para o patógeno, enquanto que uma fêmea foi positiva (**Figura 16**) podendo ser devido ao efeito Montecarlo, sendo uma inibição da técnica de qPCR (MUNIESA et al., 2014).



Figura 15. Adultos resultantes das mudas das ninfas alimentadas artificialmente, preparados para extração de DNA. Nota-se um escurecimento em um dos tubos sugerindo presença residual de sangue

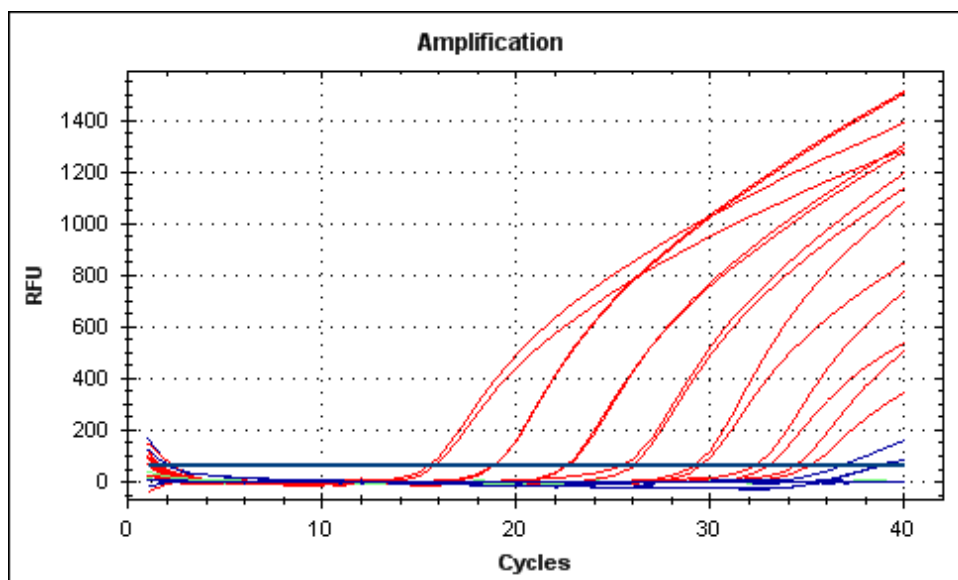


Figura 16. Curva de amplificação. As curvas em vermelho representam a amplificação de plasmídeos (10^0 - 10^7) contendo um fragmento de 83 pb do gene *nuoG* de *Bartonella* spp., as curvas e linhas em azul representam a amplificação de amostras de DNA dos adultos.

8. DISCUSSÃO

O meio TSB mostrou-se apropriado para avaliar o padrão de crescimento de *Bartonella* spp., apesar de ser um meio de cultivo geralmente utilizado para bactérias presentes em leite e derivados (RATIU et al., 2017; BONSAGLIA et al., 2020; SHAN et al., 2020; DIEULEVEUX et al., 1998). Önalán et al. (2020) realizaram experimentos que comprovaram que esse meio suporta um bom crescimento bacteriano, sendo indicado para bactérias patogênicas que necessitam um alto requerimento nutricional. A maioria dos patógenos bacterianos que se desenvolvem e se multiplicam em células sanguíneas necessitam de glicose como fonte de energia. O meio TSB contém peptona de soja que se transforma em glicose (LIM, 2003). Desta forma, o referido meio foi bastante adequado para o desenvolvimento de *Bartonella* spp.

No presente estudo observou-se um ótimo crescimento de *Bartonella* spp. pela suplementação do meio TSB com sacarose, o que concorda com o trabalho de Canback et al. (2001). Esses autores verificaram que *B. henselae* tem potencial

metabólico para catabolizar a glicose e a sacarose (que nada mais é do que um dissacarídeo que reage com a água formando duas moléculas, glicose e frutose). Porém, seus resultados foram contraditórios àqueles obtidos por Chenoweth et al. (2004). Esses autores constataram que a cepa de *B. henselae* utilizada em seus experimentos não necessitou de glicose para seu crescimento; mas trabalharam com o meio de cultura BBH-H (Meio Brucella histidina-hemaina). Nesse meio, as UFCs/ml demoraram cerca de 5 a 7 dias para se apresentarem na placa, e 80 horas para entrarem na fase estacionária, atingindo 10^9 . Ainda, segundo esses autores, a suplementação do meio BBH-H continha hematina dissolvida em histidina, sendo uma suplementação do meio BAPGM (Meio Bartonella-Alphaproteobacteria), tida como padrão-ouro para curva de crescimento de *Bartonella* spp., e NaOH para formação de água e sódio.

Quando Maggi et al. (2005) trabalharam com *B. quintana*, produziram um meio de cultivo conhecido como o ideal para cultura dessas bactérias. Sua suplementação incluía diversas substâncias como: NAD, NADP, ATP, piruvato de sódio, extrato de levedura, L-arginina HCl, L-cistina HCl, L-histidina, L-isoleucina, L-leucina, L-lisina, L-fenilalanina, L-treonina, L-triptofano, L- tirosina, L-valina, e com o pH ajustado para 6,2. No entanto, para a manutenção do inóculo, Chenoweth et al. (2004) e Maggi et al. (2005) mantiveram as mesmas condições descritas no presente trabalho, ou seja, 35°C com 5% de CO₂. Esses últimos autores observaram, para *B. quintana*, o mesmo padrão de crescimento encontrado por Chenoweth et al. (2004) para *B. henselae*, mesmo utilizando meios diferentes de cultivo.

Os resultados encontrados por Chenoweth et al. (2004) e por Maggi et al. (2005) quanto às curvas de crescimento de *B. henselae* e *B. quintana*, respectivamente, diferem da curva de crescimento observada no presente estudo. O crescimento de *Bartonella* spp. neste trabalho atingiu o pico em menor tempo (100 horas), porém não resultou em uma fase lag ou exponencial tão longa quanto àquelas outras espécies de *Bartonella* spp., atingindo valores da fase estacionária menores. No entanto, nossos resultados sugerem que quando se necessita de um crescimento mais rápido de *Bartonella*, o meio TSB deve ser o escolhido, já que proporcionou menor período de incubação da bactéria do que aqueles observados para os meios BAPGM e BBH-H.

O padrão de crescimento de *Bartonella* spp., obtido no presente estudo foi semelhante ao encontrado por Riess et al. (2008) para *B. henselae* quando comparado às fases de desenvolvimento, sendo que a fase lag ou exponencial apresentou o mesmo padrão, atingindo o pico de 10^7 . Porém o meio utilizado por esses autores foi o Schneider's, suplementado com Soro Fetal Bovino e sacarose.

O soro fetal bovino é um suplemento nutricional utilizado para várias culturas de células. Esse soro contém proteínas básicas, como fatores de crescimento que irão manter as bactérias vivas e auxiliar na divisão celular (VETSCH et al., 2015). Todas as suas funções não estão bem elucidadas, mas tanto no experimento de Riess et al. (2008) como no presente estudo, constatou-se que as bactérias apresentaram um padrão de crescimento satisfatório pela adição do soro fetal bovino.

Quanto às fêmeas alimentadas artificialmente no tubo capilar com sangue infectado por *Bartonella* spp., todas foram acasaladas previamente durante o estímulo alimentar, uma vez que concluíram o ingurgitamento no coelho e ovipuseram normalmente. Durante a alimentação no capilar, as fêmeas excretaram seus dejetos pela abertura anal. Uma maneira de se notar o sucesso da alimentação artificial é através da observação da excreção dos carrapatos, já que os mesmos são acomodados com o dorso para baixo. Alguns trabalhos apontaram o êxito da alimentação *in vitro* utilizando apenas a excreção como parâmetro como foi o caso de Fingerle et al. (2002) e Indest et al. (2002). Broadwater et al. (2002) também fizeram a observação da excreta e utilizaram esse resultado como confirmação do resultado da alimentação artificial.

O período de alimentação prévia se mostrou eficiente para que as fêmeas entrassem em uma fase de alimentação no capilar. Segundo Howarth e Hokama (1983), o período de pré-alimentação varia de acordo com a espécie de carrapato. Esses mesmos autores optaram por fazer um estímulo da glândula salivar em *D. andersoni* por quatro dias. Broadwater et al. (2002) também pré-alimentaram *Ixodes scapularis* Say por quatro a cinco dias no hospedeiro antes de oferecer alimentação *in vitro*. Essa fase de pré-alimentação se faz necessária para que os carrapatos atinjam a fase rápida de alimentação e a exposição ao capilar seja mais eficiente. Gregson (1973) observou que esses artrópodes ingerem o conteúdo fornecido através dos capilares por um tempo limitado. De fato, Burgdorfer (1956), já havia comentado

que a exposição ao capilar por um período de até seis horas permite uma ingestão satisfatória.

Durante a alimentação artificial das fêmeas, no presente estudo, observou-se um ressecamento na ponta do microhematócrito, por isso houve a necessidade de se trocar o tubo de sangue a cada 30 minutos. Quando Purnell & Joyner (1967) trabalharam com transmissão de *Theileria parva* por *R. appendiculatus* alimentados por tubo capilares, verificaram que há produção de cemento pelos carrapatos durante a alimentação artificial, provocando ressecamento.

O período de pré-oviposição em condições controladas durou em média 9 dias, ou seja, um pouco mais longo quando comparado aos obtidos em outros estudos em que os carrapatos fizeram alimentação no hospedeiro. Pinter et al. (2002) obtiveram 6 dias de pré-oviposição para *A. sculptum* (citada como *A. cajennense*) e Abel et al. (2008) (7 dias) em *A. sculptum* (citada como *A. cajennense*). É possível que a alimentação artificial nos tubos capilares possa ter contribuído para aumentar o período de pré-oviposição, porém, não houve danos aos ovos, pois todas as posturas foram saudáveis.

Com relação à transmissão de patógenos por carrapatos ixodídeos aos hospedeiros, a transmissão ocorre quase que essencialmente pela saliva (ŠIMO et al., 2017). Saraiva et al. (2014) avaliaram o tempo mínimo de alimentação de carrapatos da espécie *A. aureolatum* infectados com *R. rickettsii* em cobaias não infectadas e observaram o tempo mínimo para que ocorresse a transmissão da bactéria para o hospedeiro. Depois esses autores alimentaram carrapatos sem infecção em cobaias infectadas e, da mesma forma, verificaram o tempo mínimo para que esses carrapatos transmitissem a bactéria. Esses autores utilizaram carrapatos em jejum e parcialmente alimentados. Ninfas e adultos em jejum necessitaram 14 horas e 10 horas de alimentação nas cobaias, respectivamente, para transferirem *R. rickettsii* para os hospedeiros. Igualmente, os carrapatos não infectados levaram esse tempo de alimentação em cobaias infectadas para adquirirem o patógeno. Porém, quando carrapatos adultos infectados foram submetidos à alimentação parcial e transferidos para outro hospedeiro livre de infecção, levaram apenas 10 minutos para transmitirem o patógeno para esse novo hospedeiro. Por outro lado, durante a alimentação artificial de carrapatos, o período de aquisição e transmissão de

patógenos é variável. *Anaplasma phagocytophilum*, por exemplo, foi transmitido para o sangue de bovino, depois de 6 horas em que os espécimes adultos de *I. ricinus* infectados se fixaram na membrana artificial (FOURIE et al., 2019).

Bonnet et al. (2009) realizaram a alimentação *in vitro* em fêmeas de *I. ricinus*, alimentando-as durante 20 dias em membrana de silicone para que houvesse transmissão transovariana de *Babesia divergens*. Wechtaisong et al. (2020) alimentaram larvas de *R. sanguineus*, através de alimentação artificial, fazendo a utilização de membranas de silicone por 5 dias, com sangue infectado com *B. henselae*. Esses autores conseguiram demonstrar positividade de perpetuação transtadial de larvas para ninfas de *B. henselae* para o estágio seguinte.

A grande importância da alimentação artificial é propiciar uma resposta patógeno/vetor sem a participação de um hospedeiro. Cotte et al. (2008) infectaram *I. ricinus* utilizando o sistema de membranas e conseguiram obter transmissão de *B. henselae* transtadialmente e também observaram a migração e multiplicação da bactéria em glândulas salivares do carrapato e a transmissão do agente do carrapato para o sangue através de qPCR. Além disso, esses autores observaram que a inoculação de gatos com glândulas salivares de carrapatos infectados resultou em bacteremia. No entanto, há controvérsias sobre a prevalência de *Bartonella* spp. em carrapatos e o papel potencial dos carrapatos como vetores para *B. henselae* ainda não foi bem esclarecido (KAISER et al., 2011).

Fourie et al. (2013) infectaram adultos de *R. sanguineus* com *Ehrlichia canis* artificialmente, utilizando sangue de bovino e membrana de silicone, com taxas de fixação de até 72,5% após 24 horas, aumentando para 84,2% em 72 horas. Esses autores observaram que os adultos transmitiram *E. canis* para o sangue 8 h após o início da alimentação, conforme demonstrado pelo DNA de *E. canis* encontrado no sangue.

Oliver et al. (2016) utilizaram um sistema de membrana à base de silicone para alimentar artificialmente ninfas e adultos de *I. scapularis*. Por meio desse tipo de alimentação as ninfas foram infectadas com seis cepas de quatro patógenos (*Borrelia burgdorferi*, *Ehrlichia muris*, *Anaplasma phagocytophilum* e *Rickettsia monacensis*), os quais foram inoculados em sangue bovino estéril para alimentar os carrapatos. Os patógenos foram detectados, por meio de PCR, em ninfas ingurgitadas e nos adultos

que ingeriram as bactérias como ninfas. As bactérias *B. burgdorferi* e *E. muris* mostraram altas taxas de transmissão transestadial enquanto *A. phagocytophilum* e *R. monacensis* tiveram baixas taxas de transmissão.

Os tubos de microhematócrito têm sido menos utilizados atualmente do que os sistemas de alimentação artificial em membrana, justamente porque é muito difícil obter o completo ingurgitamento dos espécimes. Porém, proporcionam aos carrapatos a ingestão de sangue ou de culturas de células infectadas de maneira bem mais rápida sendo uma alimentação forçada.

Kocan et al. (2005) estudaram a interação entre *Anaplasma marginale* e *Dermacentor variabilis* (Say) por meio de alimentação natural e artificial. No sistema de alimentação artificial, esses autores utilizaram tubo capilar para alimentar machos de *D. variabilis* com sangue de bezerros altamente infectados. Surpreendentemente, nos carrapatos que se alimentaram naturalmente nos bezerros altamente riquetsêmicos, o patógeno foi detectado por PCR, tanto no intestino médio como nas glândulas salivares. Já nos carrapatos que foram alimentados por tubos capilares com o mesmo sangue infectado, o patógeno estava presente apenas no intestino médio. Embora a infecção dos carrapatos pela alimentação artificial no sistema de tubos capilares e pela alimentação natural nos bezerros não tenha sido igual, os autores comentaram que o uso potencial deste sistema serve para identificar aspectos da interação vetor/patógenos que não são prontamente reconhecidos na alimentação natural.

Apesar da ingestão de sangue infectado com *Bartonella* spp. pelas fêmeas de *A. sculptum*, através dos tubos capilares, nenhuma foi capaz de transmitir transovarianamente *Bartonella* spp., mesmo estando o patógeno em alta concentração no sangue, 10^7 . O sucesso de alimentação artificial das fêmeas de *A. sculptum* no sistema de tubos capilares com posterior finalização da alimentação no coelho foi de 61% (30/49). Porém as ninfas de *A. sculptum* que conseguiram se alimentar no sistema de membrana natural tiveram um sucesso muito baixo, sendo que somente 8% alimentaram nesse sistema e 4% sobreviveram e mudaram para adultos.

Cotté et al. (2008) conseguiram demonstrar experimentalmente que *I. ricinus* pode transmitir *B. henselae* transestadialmente de ninfa para adultos, e

transovarianamente pelas fêmeas, utilizando membrana de parafilme e sangue de ovino. Esses autores testaram 200 larvas, 178 ninfas e 55 fêmeas no sistema artificial de alimentação com sangue infectado. O sucesso de alimentação e aquisição de *B. henselae* pelas larvas foi de 23%, pelas ninfas foi de 17% e pelas fêmeas que fizeram posturas foi de 16%.

Król et al. (2021) conseguiram boa porcentagem de sucesso entre os adultos e as ninfas de *I. ricinus* alimentados artificialmente com sangue infectado por *B. henselae*, *B. grahamii* e *B. schoenbuchensis*. Esses autores expuseram a membrana artificial à temperatura ambiente 24h antes de iniciar a alimentação dos carrapatos, para que fosse polimerizado. Dentre as 1021 ninfas colocadas no sistema de alimentação com membrana artificial, o sucesso foi de 57%, com 587 ninfas alimentadas. Dentre 312 adultos expostos à alimentação artificial foram obtidos 156 adultos (50%) que tiveram êxito na alimentação. DNA de *Bartonella* foi encontrado em 22% dos ovos postos pelas fêmeas infectadas e em 8,6% dos adultos que emergiram das ninfas infectadas. As membranas foram deixadas polimerizando por 24 h em temperatura ambiente antes dos experimentos. Esses autores utilizaram sangue bovino heparinizado fresco suplementado com 2 g de glicose por litro de sangue. O sangue foi usado por até sete dias e armazenado a 6 °C. Gentamicina (5 µg/ml) foi adicionada ao sangue 24 horas antes da alimentação dos carrapatos. As espécies de *Bartonella* (1 µL de 10⁹ UFC/ml de PBS por 1ml de sangue) e ATP (51 mg/ml) foram adicionadas pouco antes de cada uso. A troca do sangue foi de 12 em 12 horas. A transmissão transovariana e a perpetuação transestadial de *Bartonella* observada em *I. ricinus* sugere que esse carrapato é um possível vetor para as três espécies de *Bartonella*.

Com relação ao uso de membrana natural para alimentação de carrapatos, Wechtaisong et al. (2020) utilizaram pele de camundongo com a espessura dérmica ao redor 300 µm para alimentar larvas e ninfas de *R. sanguineus*. As peles dos camundongos foram dissecadas e esterilizadas em etanol 70% por 5 min, seguido de enxágue em água destilada estéril por 5 min e, em seguida, 1x PBS por 5 min. Essas peles foram tratadas com gentamicina (10 mg/ml), Anfotericina B (0,25 µg/ml), Penicilina (50 U/ml) e Estreptomicina (50 µl/ml) por 10 minutos. Em seguida foram armazenadas a -20°C até o uso. Esses autores utilizaram sangue de caprino

desfibrinado e sem complemento funcional, por tratamento térmico a 56°C por 30 minutos. Para prevenir contaminação fúngica e bacteriana durante a alimentação dos carrapatos, o sangue foi suplementado com 20 µl/ml de fosfomicina, 0,25 µg/ml de anfotericina B e 10 KU/ml de heparina. O sangue foi então infectado com *B. henselae* na concentração de 10⁹ e colocado no sistema de alimentação. Esses autores tiveram um sucesso de alimentação das larvas de 43% (172/400) e o sucesso de alimentação das ninfas foi de 56,7% (34/60) nesse sistema. Larvas e ninfas foram testadas 5 dias após alimentação e *B. henselae* foi detectada em 57,1% dos pools de larvas e 66,7% dos pools de fezes dessas larvas.

Embora haja trabalhos reportando a detecção de *Bartonella* spp. em carrapatos coletados em ambientes urbanos e rurais, o papel dos carrapatos como vetor ainda não foi bem elucidado para diversas espécies de *Bartonella* (HALOS et al., 2005; SKOTARCZAK et al., 2005; TSAI et al., 2011; GONÇALVES et al., 2020).

A positividade para *Bartonella* spp. em uma fêmea resultante de uma ninfa alimentada artificialmente, no presente estudo, pode ser explicada pela extração de DNA dessa fêmea ainda contendo sangue no intestino, por não ter sido totalmente digerido. Mesmo sendo realizada em duplicada e sendo uma amostra positiva, a quantidade de DNA não foi quantificável. Portanto, a transmissão transestadial não pode ser confirmada, mas também não pode ser descartada. O que se pode afirmar é que o DNA de *Bartonella* estava presente apenas nessa fêmea.

9. CONCLUSÃO

O presente estudo mostrou que:

- O meio TSB é adequado para o crescimento de *Bartonella* spp. sendo que conseguiu apresentar todas as fases de desenvolvimento da curva.
- Não houve transmissão transovariana de *Bartonella* spp. em *Amblyomma sculptum*.
- A possibilidade de perpetuação transestadial de *Bartonella* spp. em *A. sculptum* não pôde ser comprovada, mas também não pode ser excluída, justamente porque um espécime foi positivo.

10. REFERÊNCIAS

- ABEL, I.; CORRÊA, F.N.; CASTRO, A.A.; CUNHA, N.C.; MADUREIRA, R.C.; FONSECA, A.H. (2008). Artificial feeding of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) fasting females through capillary tube technique. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, 17(3), 128-132. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/s1984-29612008000300002>.
- AKRAM, S. M.; ANWAR, M. Y.; RAWLA, P. (2020). Bacillary angiomatosis. **StatPearls [Internet]**.
- ANDERSON, B. E.; NEUMAN, M. A. (1997). *Bartonella* spp. as emerging human pathogens. **Clinical microbiology reviews**, 10(2), 203. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.10.2.203>.
- ANDRÉ, M. R.; GUTIÉRREZ, R.; IKEDA, P.; DO AMARAL, R. B.; DE SOUSA, K. C. M.; NACHUM-BIALA, Y.; HARRUS, S. (2019). Genetic diversity of *Bartonella* spp. in vampire bats from Brazil. **Transboundary and emerging diseases**, 66(6), 2329-2341. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.13290>.
- ANDRÉ, M. R.; DUMLER, J. S.; HERRERA, H. M.; GONCALVES, L. R.; DE SOUSA, K. C.; SCORPIO, D. G.; DE SANTIS, A. C. G. A.; DOMINGOS, I. H.; DE MACEDO, G. C.; MACHADO, R. Z. (2015). Assessment of a quantitative 5' nuclease real time polymerase chain reaction using the nicotinamide adenine dinucleotide dehydrogenase gamma subunit (*nuoG*) for *Bartonella* species in domiciled and stray cats in Brazil. **Journal of feline medicine and surgery**, 8(10), 783- 90. Disponível em: <https://doi.org/10.1177/1098612X15593787>.
- ANGELAKIS, E.; RAOULT, D. (2014). Pathogenicity and treatment of *Bartonella* infections. **International journal of antimicrobial agents**, 44(1), 16-25. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2014.04.006>.

ARAÚJO, I. M.; MAGALHÃES-MATOS, P. C.; CORDEIRO, M. D.; PACHECO, A.; ROCHA, B. S.; FEITOZA, L. F. B. B.; FONSECA, A. H. (2019). Ticks in wild animals at a resort and the first documentation of *Amblyomma sculptum* infesting Emu (*Dromaius novaehollandiae*). **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, 28(1), 177-179. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-296120180082>.

BARKER, S. C.; BURGER, T. D. (2018). Two new genera of hard ticks, *Robertsicus* n. gen. and *Archaeocroton* n. gen., and the solution to the mystery of Hoogstraal's and Kaufman's "primitive" tick from the Carpathian Mountains. **Zootaxa**, 4500(4), 543-552. doi:10.11646/zootaxa.4500.4.4. Disponível em: <https://doi.org/10.1164/zootaxa.4500.4.4>.

BLACK, W. 4.; PIESMAN, J. (1994). Phylogeny of hard-and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proceedings of the national academy of sciences**, 91(21), 10034-10038. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.91.21.10034>.

BONNET, S.; BRISSEAU, N.; HERMOUET, A.; JOUGLIN, M.; CHAUVIN, A. (2009). Experimental in vitro transmission of *Babesia* sp. (EU1) by *Ixodes ricinus*. **Veterinary research**, 40, 21. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/vetres/2009004>.

BONSAGLIA, E. C.; LATOSINSKI, G. S.; ROSSI, R. S.; ROSSI, B. F.; POSSEBON, F. S.; PANTOJA, J. C. F.; RALL, V. L. (2020). Biofilm production under different atmospheres and growth media by *Streptococcus agalactiae* isolated from milk of cows with subclinical mastitis. **Archives of microbiology**, 202(1), 209-212. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s00203-019-01727-8>.

BUFFET, J. P.; KOSOY, M.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. (2013). Natural history of *Bartonella-infecting* rodents in light of new knowledge on genomics, diversity and evolution. **Future microbiology**, 8(9), 1117-1128. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fmb.13.77>.

BUTLER, J. F.; HESS, W. R.; ENDRIS, R. G.; HOLSCHER, K. H. (1984). In vitro feeding of *Ornithodoros* ticks for rearing and assessment of disease transmission. **Acarology VII/editors**, vol. 2. DA Griffiths and CE Bowman (eds), pp. 1075–1081.

BURGDORFER, W.; PICKENS, E. G. (1954). A technique employing embryonated chicken eggs for the infection of argasid ticks with *Coxiella burnetii*, *Bacterium tularensis*, *Leptospira icterohaemorrhagiae*, and western equine encephalitis virus. **Journal of infectious diseases**, 94(1), 84-89. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/30089825>.

BURGDORFER, W. (1957). Artificial feeding of ixodid ticks for studies on the transmission of disease agents. **Journal of infectious diseases**, 100(3), 212-214. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/30098334>.

BREITSCHWERDT, E. B.; MAGGI, R. G.; CHOMEL, B. B.; LAPPIN, M. R. (2010). Bartonellosis: an emerging infectious disease of zoonotic importance to animals and human beings. **Journal of veterinary emergency and critical care**, 20(1), 8-30. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1476-4431.2009.00496.x>.

BREITSCHWERDT, E. B. (2014). Bartonellosis: one health perspectives for an emerging infectious disease. **ILAR journal**, 55(1), 46-58. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/ilar/ilu015>.

BROADWATER, A. H.; SONENSHINE, D. E.; HYNES, W. L.; CERAUL, S.; DE SILVA, A. M. (2002). Glass capillary tube feeding: A method for infecting nymphal *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) with the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. **Journal of medical entomology**, 39(2), 285-292. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/0022-2585-39.2.285>.

CADENAS, M. B.; MAGGI, R. G.; DINIZ, P. P.; BREITSCHWERDT, K. T.; SONTAKKE, S.; BREITHSCHWERDT, E. B. (2007). Identification of bacteria from clinical samples using *Bartonella* alpha-Proteobacteria growth medium. **Journal of microbiological**

methods, 71(2), 147-155. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2007.08.006>.

CALCHI, A. C.; VULTÃO, J. G.; ALVES, M. H.; YOGUI, D. R.; DESBIEZ, A. L. J.; AMARAL, R. B.; ANDRÉ, M. R. (2020). Multi-locus sequencing reveals a novel *Bartonella* in mammals from the superorder Xenarthra. **Transboundary and emerging diseases**, 67, 2020-2033. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.13545>.

CANBACK, B.; ANDERSSON, S. G. E.; KURLAND, C. G. (2002). The global phylogeny of glycolytic enzymes. **Proceedings of the national academy of sciences**, 99(9), 6097-6102. Disponível em: <https://doi.org/10.1073/pnas.082112499>.

CHABAUD, A. G. (1950). Sur la nutrition artificielle des tiques. **Annales de parasitologie humaine et comparee**, 25(1-2), 42-47. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/parasite/1950251042>.

CARITHERS, H. A. (1985). Cat-scratch disease: an overview based on a study of 1,200 patients. **American journal of diseases of children**, 139(11), 1124-1133. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/archpedi.1985.02140130062031>.

CASTAGNOLLI, C. K.; de FIGUEIREDO, L. B.; DANILO, A.; SANTANA, D. A.; MÁRCIO, B., de CASTRO, M. B.; ROMANO, M. A.; SZABÓ, M. P. J. (2003). Acquired resistance of horses to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) ticks. **Veterinary Parasitology**, 117(4), 271-283. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2003.09.004>.

CHOMEL, B. B.; KASTEN, R. W. (2010). Bartonellosis, an increasingly recognized zoonosis. **Journal of applied microbiology**, 109(3), 743-750. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04679.x>.

CHENOWETH, M. R.; SOMERVILLE, G. A.; KRAUSE, D. C.; O'REILLY, K. L.; GHERARDINI, F. C. (2004). Growth characteristics of *Bartonella henselae* in a novel liquid medium: primary isolation, growth-phase-dependent phage induction, and metabolic studies. **Applied and environmental microbiology**, 70(2), 656-663. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.70.2.656-663.2004>.

COTTE V, BONNET S, LE RHUN D, LE NAOUR E, CHAUVIN A. (2008) Transmission of *Bartonella henselae* by *Ixodes ricinus*. **Emerging Infectious Diseases**, 14, 1074–1080. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1407.071110>.

CUNHA, N. C.; RANGEL, C. P.; PIRANDA, E. M.; REZENDE, J.; TEIXEIRA, R. C.; FONSECA, A. H. (2010). Assessment of weight gain and biological parameters of *Rhipicephalus sanguineus* females fed artificially via capillary tubes. **Ciência Rural**, 40(4), 928-933. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000400028>.

DAMIAN, D.; DAMAS, M.; WENSMAN, J. J.; BERG, M. (2020). Diversity of Viruses in Hard Ticks (Ixodidae) from Select Areas of a Wildlife-livestock Interface Ecosystem at Mikumi National Park, Tanzania. **American journal of bioscience**, 8(6), 150. Disponível em: <https://doi.org/10.11648/j.ajbio.20200806.12>.

DANTAS-TORRES, F. (2008). The brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. **Veterinary parasitology**, 152(3-4), 173-185. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2007.12.030>.

DANTAS-TORRES, F.; MARTINS, T. F.; MUÑOZ-LEAL, S.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. (2019). Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: updated species checklist and taxonomic keys. **Ticks and tick-borne diseases**, 10(6), 101252. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2019.06.012>.

DANTAS-TORRES, F.; CHOMEL, BB.; OTRANTO D. (2012). Ticks and tick-borne diseases: a One Health perspective. **Trends in parasitology**, 28:437–46. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2012.07.003>.

DA SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A.; TANIWAKI, M.H.; GOMES, R.A.R.; OKAZAKI, M.O. (2017). **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 5ª edição, Editora Blucher.

DE LA VEGA, R.; DIAZ, G.; FINLAY, L. (2000). Artificial feeding of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) through micropipettes. **Annals of the New York academy of sciences**, 916(1), 315-319. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2000.tb05307.x>.

DE SOUSA, K. C. M.; CALCHI, A. C.; HERRERA, H. M.; DUMLER, J. S.; BARROS-BATTESTI, D. M.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R. (2017). Anaplasmatidae agents among wild mammals and ectoparasites in Brazil. **Epidemiology & infection**, 145(16), 3424-3437. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S095026881700245X>.

DE MEILLON, B.; GOLDBERG, L. (1947). Preliminary studies on the nutritional requirements of the bedbug (*Cimex lectularius*) and the tick (*Ornithodoros moubata*). **Journal of experimental biology**, 24(3), 41-63. Disponível em: <https://doi.org/10.1242/jeb.24.1-2.41>.

DENG, H.; LE RHUN, D.; BUFFET, J. P. R.; COTTÉ, V.; READ, A.; BIRTLES, R. J.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. (2012). Strategies of exploitation of mammalian reservoirs by *Bartonella* species. **Veterinary research**, 43(1), 15. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1297-9716-43-15>.

DIEULEVEUX, V.; GUEGUEN, M. (1998). Antimicrobial effects of D-3-phenyllactic acid on *Listeria monocytogenes* in TSB-YE medium, milk, and cheese. **Journal of**

food protection, 61(10), 1281-1285. Disponível em: <https://doi.org/10.4315/0362-028X-61.10.1281>.

DUMLER, J. S.; DOTEVALL, L.; GUSTAFSON, R.; GRANSTROM, M. (1997). A population-based seroepidemiologic study of human granulocytic ehrlichiosis and Lyme borreliosis on the west coast of Sweden. **Journal of infectious diseases**, 175(3), 720-722. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/175.3.720>.

DUMLER, J. S.; BARBET, A. F.; BEKKER, C. P.; DASCH, G. A.; PALMER, G. H.; RAY, S. C.; RURANGIRWA, F. R. (2001). Reorganization of genera in the families Rickettsiaceae and Anaplasmataceae in the order Rickettsiales: unification of some species of *Ehrlichia* with *Anaplasma*, *Cowdria* with *Ehrlichia* and *Ehrlichia* with *Neorickettsia*, descriptions of six new species combinations and designation of *Ehrlichia equi* and 'HGE agent' as subjective synonyms of *Ehrlichia phagocytophila*. **International journal of systematic and evolutionary microbiology**, 51(6), 2145-2165. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/00207713-51-6-2145>.

DUMLER, J. S. (2005). *Anaplasma* and *Ehrlichia* infection. **Annals of the New York academy of sciences**, 1063(1), 361-373. Disponível em: <https://doi.org/10.1196/annals.1355.069>.

ESTEVES, E.; BIZZARRO, B.; COSTA, F. B.; RAMÍREZ-HERNÁNDEZ, A.; PETI, A. P. F.; CATANEO, A. H. D.; SÁ-NUNES, A. (2019). *Amblyomma sculptum* salivary PGE2 modulates the dendritic cell-*Rickettsia rickettsii* interactions in vitro and in vivo. **Frontiers in immunology**, 10, 118. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00118>.

FINGERLE, V.; RAUSER, S.; HAMMER, B.; KAHL, O.; HEIMERL, C.; SCHULTE-SPECHTEL, U.; WILSKE, B. (2002). Dynamics of dissemination and outer surface protein expression of different European *Borrelia burgdorferi* sensu lato strains in

artificially infected *Ixodes ricinus* nymphs. **Journal of clinical microbiology**, 40(4), 1456. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/JCM.40.4.1456-1463.2002>.

FONSECA, A. H.; DUTRA, A. E. A.; PINA, I. G. (1999). 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**, 6(3), 167-170. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4322/rbcv.2015.160>.

FOURIE, J. J.; STANNECK, D.; LUUS, H. G.; BEUGNET, F.; WIJNVELD, M.; JONGEJAN, F. (2013). Transmission of *Ehrlichia canis* by *Rhipicephalus sanguineus* ticks feeding on dogs and on artificial membranes. **Veterinary parasitology**, 197, 595–603. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.07.026>.

FOURIE, J. J.; EVANS, A.; LABUSCHAGNE, M.; CRAFFORD, D.; MADDER, M.; POLLMEIER, M.; SCHUNACK, B. (2019). Transmission of *Anaplasma phagocytophilum* (Foggie, 1949) by *Ixodes ricinus* (Linnaeus, 1758) ticks feeding on dogs and artificial membranes. **Parasites & vectors**, 12(1), 136. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3396-9>.

GARCIA-CACERES, U.; GARCIA, F. U. (1991). Bartonellosis. an immunodepressive disease and the life of Daniel Alcides Carrion. **American journal of clinical pathology**, 95(4 Suppl 1), S58-66.

GERN, L.; TOUTOUNGI, L. N.; HU, C. M.; AESCHLIMANN, A. (1991). *Ixodes (Pholeoixodes) hexagonus*, an efficient vector of *Borrelia burgdorferi* in the laboratory. **Medical and veterinary entomology**, 5(4), 431–435. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2915.1991.tb00571.x>.

GONÇALVES, L. R.; HARRUS, S.; GUTIÉRREZ, R.; HERRERA, H. M.; DE SOUZA RAMOS, I. A.; PORFÍRIO, G. E. D. O.; ANDRÉ, M. R. (2020). Molecular detection and genetic diversity of *Bartonella* species in large ruminants and associated ectoparasites

from the Brazilian Cerrado. **Transboundary and emerging diseases**, 67, 1888-1897. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.13517>.

GONÇALVES, L. R.; DE MENDONÇA FAVACHO, A. R.; ROQUE, A. L. R.; MENDES, N. S.; JUNIOR, O. L. F.; BENEVENUTE, J. L.; ANDRÉ, M. R. (2016). Association of *Bartonella* species with wild and synanthropic rodents in different Brazilian biomes. **Applied and environmental microbiology**, 82(24), 7154-7164. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.02447-16>.

GONÇALVES, L. R.; HARRUS, S.; HERRERA, H. M.; GUTIÉRREZ, R., PEDRASSANI, D.; NANTES, W. A. G.; ANDRÉ, M. R. (2020). Low occurrence of *Bartonella* in synanthropic mammals and associated ectoparasites in peri-urban areas from Central-Western and Southern Brazil. **Acta tropica**, 207, 105513. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105513>.

GUEDES, E.; LEITE, R. C. (2008). Dinâmica sazonal de estádios de vida livre de *Amblyomma cajennense* e *Amblyomma dubitatum* (Acari: Ixodidae) numa área endêmica para febre maculosa, na região de Coronel Pacheco, Minas Gerais. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, 17(1), 78-82. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=397841469016>.

GUGLIELMONE, A. A.; MANGOLD, A. J.; GARCIA, M. D. (1991). The life cycle of *Amblyomma parvum* Aragão, 1908 (Acari: Ixodidae) under laboratory conditions. **Experimental & applied acarology**, 13(2), 129-136. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF01193663>.

GUGLIELMONE, A. A.; BEATI, L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A. (2006). Ticks (Ixodidae) on humans in South America. **Experimental & applied acarology**, 40(2), 83-100. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10493-006-9027-0>.

GUGLIELMONE, A. A, M.E.; SÁNCHEZ, M. E.; FRANCO, S.; NAVA, S.; RUEDA, L.M.; ROBBINS, R. G. (2019). Names of species of hard ticks. **Instituto Nacional de Tecnología Agropecuária**, Rafaela, Argentina (acessado 03/05/2021). Disponível em: <http://rafaela.inta.gob.ar/nombresgarrapatas/>.

GUTIÉRREZ, R.; COHEN, L.; MORICK, D.; MUMCUOGLU, K. Y.; HARRUS, S.; GOTTLIEB, Y. (2014). Identification of different *Bartonella* species in the cattle tail louse (*Haematopinus quadripertusus*) and in cattle blood. **Applied and environmental microbiology**, 80(17), 5477-5483. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.01409-14>.

GUTIÉRREZ, R.; VAYSSIER-TAUSSAT, M.; BUFFET, J. P.; HARRUS, S. (2017). Guidelines for the isolation, molecular detection, and characterization of *Bartonella* species. **Vector-borne and zoonotic diseases**, 17(1), 42-50. Disponível em: <https://doi.org/10.1089/vbz.2016.1956>.

GONZÁLEZ, J.; BICKERTON, M.; TOLEDO, A. (2021). Applications of artificial membrane feeding for ixodid ticks. **Acta tropica**, 105818. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105818>.

GREGSON, J. D. (1973). Tick paralysis: an appraisal of natural and experimental data. **Canada Deptment of Agriculture. Monograph**.

GURU, P. K.; AGARWAL, A.; FRITZ, A. (2018). A miraculous recovery: *Bartonella henselae* infection following a red ant bite. **Case reports**, 2018, bcr-2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1136/bcr-2017-222326>.

HADDON JR, W. (1956). An artificial membrane and apparatus for the feeding of the human body louse *Pediculus Humanus Corporis*1. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, 5(2), 315-325. Disponível em: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.1956.5.315>.

HALOS, L.; JAMAL, T.; MAILLARD, R.; BEUGNET, F.; LE MENACH, A.; BOULOUIS, H.-J.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. (2005). Evidence of *Bartonella* sp. in questing adult and nymphal *Ixodes ricinus* ticks from France and co-infection with *Borrelia burgdorferi* sensu lato and *Babesia* sp. **Veterinary research**, 36, 79–87. Disponível em: <https://doi.org/10.1051/vetres:2004052>.

HARRUS, S.; BANETH, G. (2005). Drivers for the emergence and re-emergence of vector-borne protozoal and bacterial diseases. **International journal for parasitology**, 35, 1309–1318. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.06.005>.

HINDLE, E.; MERRIMAN, G. (1912). The sensory perceptions of *Argas persicus* (Oken). **Parasitology**, 5(3), 203-216. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182000000305>.

HOKAMA, Y.; LANE, R. S.; HOWARTH, J. A. (1987). Maintenance of adult and nymphal *Ornithodoros coriaceus* (Acari: Argasidae) by artificial feeding through a parafilm membrane. **Journal of medical entomology**, 24(3), 319-323. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/24.3.319>.

HOWARTH, J. A.; HOKAMA, Y. (1983). Artificial feeding of adult and nymphal *Dermacentor andersoni* (Acari: Ixodidae) during studies on bovine anaplasmosis. **Journal of medical entomology**, 20(3), 248-256. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/20.3.248>.

JONGEJAN F, UILENBERG G. (2004). The global importance of ticks. **Parasitology**, 129(Suppl.), S3–14. Disponível em: <https://doi.org/10.1017/S0031182004005967>.

JONES, K. E.; PATEL, N. G.; LEVY, M. A.; STOREYGARD, A.; BALK, D.; GITTLEMAN, J. L.; DASZAK, P. (2008). Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, 451, 990-993. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nature06536>.

KAEWMONGKOL, G.; KAEWMONGKOL, S.; BURMEJ, H.; BENNETT, M. D.; FLEMING, P. A.; ADAMS, P. J.; FENWICK, S. G. (2011). Diversity of *Bartonella* species detected in arthropod vectors from animals in Australia. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, 34(5), 411-417. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2011.07.002>.

KAISER, P. O.; RIESS, T.; O'ROURKE, F.; LINKE, D.; KEMPF, V. A. (2011). *Bartonella* spp.: throwing light on uncommon human infections. **International Journal of medical microbiology**, 301(1), 7-15. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2010.06.004>.

KIRCH, H. J.; TEEL, P. D.; KLOFT, W. J.; DELOACH, J. R. (1991). 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**, 28(3), 450-455. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/28.3.450>.

KOCAN, K. M.; YOSHIOKA, J.; SONENSHINE, D. E.; DE LA FUENTE, J.; CERAUL, S. M.; BLOUIN, E. F.; ALMAZÁN, C. (2005). Capillary tube feeding system for studying tick– pathogen interactions of *Dermacentor variabilis* (Acari: Ixodidae) and *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae). **Journal of medical entomology**, 42(5), 864-874. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jmedent/42.5.864>.

KOSOY, M.; BAI, Y.; LYNCH, T.; KUZMIN, I. V.; NIEZGODA, M.; FRANKA, R.; RUPPRECHT, C. E. (2010). *Bartonella* spp. in bats, Kenya. **Emerging infectious diseases**, 16(12), 1875. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1612.100601>.

KRANTZ, G. W.; WALTER, D. E. (2009). A manual of acarology. 3rd ed. Lubbock: **Tech University Press**.

KRÖBER, T.; GUERIN, P. M. (2007). In vitro feeding assays for hard ticks. **Trends in Parasitology**, 23(9), 445-449. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.pt.2007.07.010>.

KRÓL, N.; MILITZER N; STÖBE, E.; NIJHOF, A. M.; MARTIN PFEFFER, M.; VOLKHARD A. J. KEMPF, V.A.; OBIEGALA, A. (2021). Evaluating transmission paths for three different *Bartonella* spp. in *Ixodes ricinus* ticks using artificial feeding. **Microorganisms**, 9, 901. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9050901>.

LABRUNA, M.B. (2009). Ecology of *Rickettsia* in South America. **Ann N Y acad sci.**, 1166,156–66. Disponível em: Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.04516.x>.

LABRUNA, M. B.; AMAKU, M.; METZNER, J. A.; PINTER, A.; FERREIRA, F. (2003). Larval behavioral diapause regulates life cycle of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) in Southeast Brazil. **Journal of medical entomology**, 40, 170–178. Disponível em: <https://doi.org/10.1603/0022-2585-40.2.170>.

LABRUNA, M. B.; OGRZEWALSKA, M.; SOARES, J. F.; MARTINS, T. T.; SOARES, H. S.; MORAES-FILHO, J.; NIERI-BASTOS, F. A.; ALMEIDA, A. P.; PINTER A. (2011) Experimental infection of *Amblyomma aureolatum* ticks with *Rickettsia rickettsii*. **Emerging infectious diseases**, 17(5), 829-834. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1705.101524>.

LEW-TABOR, A. E.; BRUYERES, A. G.; ZHANG, B.; VALLE, M. R. (2014). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick in vitro feeding methods for functional (dsRNA) and vaccine candidate (antibody) screening. **Ticks and tick-borne diseases**, 5(5), 500-510. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2014.03.005>.
LIM. D. (2003) "Growth medium. In Foundations of modern microbiology", pp. 110e113. Dubuque, IA: Kendall/Hunt. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aa7ba2>.

LÖSEL, P. M.; GUERIN, P. M.; DIEHL, P. A. (1993). Contrasting effects of sera from rabbits and cattle infested with ticks on the in vitro feeding performance of the tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Veterinary parasitology**, 47(1-4), 355-360. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0304-4017\(93\)90037-N](https://doi.org/10.1016/0304-4017(93)90037-N).

LUZ, H. R.; FACCINI, J. L. H.; LANDULFO, G. A.; COSTA NETO, S. F.; FAMADAS, K. M. (2016). New records for *Amblyomma sculptum* (Ixodidae) on non-passerine birds in Brazil. **Revista brasileira de parasitologia veterinária**, 25(1), 124-126. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1984-29612016004>.

MANGO, C. K. A.; GALUN, R. (1977). *Ornithodoros moubata*: breeding in vitro. **Experimental parasitology**, 42(2), 282-288. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0014-4894\(77\)90085-6](https://doi.org/10.1016/0014-4894(77)90085-6).

MARMORSTON-GOTTESMAN, J.; PERLA, D. (1932). the etiology of *Bartonella muris* anemia of the albino rat: the isolation of *Bartonella muris*. **The Journal of experimental medicine**, 56(5), 763. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.56.5.763>.

MARTINS, T. F.; BARBIERI, A. R.; COSTA, F. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L. M.; PETERKA, C. R.; LABRUNA, M. B. (2016). Geographical distribution of *Amblyomma cajennense* (sensu lato) ticks (Parasitiformes: Ixodidae) in Brazil, with description of the nymph of *A. cajennense* (sensu stricto). **Parasites & vectors**, 9(1), 1-14. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-016-1460-2>.

MAGGI, R. G.; KOSOY, M.; MINTZER, M.; BREITSCHWERDT, E. B. (2009) Isolation of “*Candidatus Bartonella melophagi*” from human blood. **Emerging infectious diseases**, 15(1), 66-68. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid1501.081080>.

MAURIN, M.; RAOULT, D. (1996). *Bartonella (Rochalimaea) quintana* infections. **Clinical microbiology reviews**, 9(3), 273. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.9.3.273>.

MENDOZA-ROLDAN, J.; RIBEIRO, S. R.; CASTILHO-ONOFRIO, V.; GRAZZIOTIN, F. G.; ROCHA, B.; FERRETO-FIORILLO, B.; BARROS-BATTESTI, D. M. (2020). Mites and ticks of reptiles and amphibians in Brazil. **Acta tropica**, 208, 105515. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2020.105515>.

MINNICK, M. F.; ANDERSON, B. E.; LIMA, A.; BATTISTI, J. M.; LAWYER, P. G.; BIRTLES, R. J. (2014). Oroya fever and verruga peruana: bartonellosis unique to South America. **PLoS negl trop dis**, 8(7), e2919. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002919>.

MOURA, S. T. D.; FONSECA, A. H. D.; FERNANDES, C. G. N.; BUTLER, J. F. (1997). Artificial feeding of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) through silicone membrane. **Memorias do instituto oswaldo cruz**, 92, 545-548. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0074-02761997000400019>.

MOREIRA, R. Q.; RAMOS, V. D. N.; SUZIN, A.; RAMIREZ, D. G.; ROTH, P. R. D. O.; MARTINS, M. M.; SZABÓ, M. P. J. (2021). Ticks on small mammals from an ecotone region impacted by rural activities in Brazil. **Systematic and applied acarology**, 26(2), 427-437. Disponível em: <https://doi.org/10.11158/saa.26.2.7>.

MUÑOZ-LEAL, S.; VENZAL, J. M.; NAVA, S.; MARCILI, A.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; MARTINS, T. F.; LABRUNA, M. B. (2020). Description of a new soft tick species (Acari: Argasidae: *Ornithodoros*) parasite of *Octodon degus* (Rodentia: Octodontidae) in northern Chile. **Ticks and tick-borne diseases**, 11(3), 101385. Disponível em: [10.1016/j.ttbdis.2020.101385](https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2020.101385).

MURARO, L. S.; NOGUEIRA, M. F.; BORGES, A. M. C. M.; DE OLIVEIRA SOUZA, A.; VIEIRA, T. S. W. J.; DE AGUIAR, D. M. (2021). Detection of *Ehrlichia* sp. in *Amblyomma sculptum* parasitizing horses from Brazilian Pantanal wetland. **Ticks and tick-borne diseases**, 12(3), 101658. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2021.101658>.

NAVA, S.; BEATI, L.; LABRUNA, M. B.; CÁCERES, A. G.; MANGOLD, A. J.; GUGLIELMONE, A. A. (2014). Reassessment of the taxonomic status of *Amblyomma cajennense* with the description of three new species, *Amblyomma tonelliae* n. sp., *Amblyomma interandinum* n. sp. and *Amblyomma patinoi* n. sp., and reinstatement of *Amblyomma mixtum*, and *Amblyomma sculptum* (Ixodida: Ixodidae). **Ticks and tick-borne diseases**, 5(3), 252-276. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2013.11.004>.

NOGUCHI, H.; BATTISTINI, T. S. (1926). ETIOLOGY OF OROYA FEVER: I. Cultivation of *Bartonella bacilliformis*. **The journal of experimental medicine**, 43(6), 851-864. Disponível em: <https://doi.org/10.1084/jem.43.6.851>.

OLIVER, J.D.; LYNN, G.E.; BURKHARDT, N.Y.; PRICE, L.D.; NELSON, C.M.; KURTTI, T.J.; MUNDERLOH, U.G. (2016). Infection of Immature *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) by Membrane Feeding. **Journal of medical entomology**, 53, 409–415. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/jme/tjv241>.

OLIVIERI, E.; WIJNVELD, M.; BONGA, M.; BERGER, L.; MANFREDI, M. T.; VERONESI, F.; JONGEJAN, F. (2018). Transmission of *Rickettsia raoultii* and *Rickettsia massiliae* DNA by *Dermacentor reticulatus* and *Rhipicephalus sanguineus* (s. l.) ticks during artificial feeding. **Parasites & vectors**, 11(1), 1-7. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s13071-018-3075-2>.

OKARO, U.; ADDISU, A.; CASANAS, B.; ANDERSON, B. (2017). *Bartonella* species, an emerging cause of blood-culture-negative endocarditis. **Clinical microbiology reviews**, 30(3), 709-746. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/CMR.00013-17>.

OKARO, U.; GEORGE, S.; ANDERSON, B. (2021). What Is in a Cat Scratch? Growth of *Bartonella henselae* in a Biofilm. **Microorganisms**, 9(4), 835. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms9040835>.

ÖNALAN, Ş.; ÇEVİK, M. (2020). Investigation of the effects of some phytochemicals on *Yersinia ruckeri* and antimicrobial resistance. **Brazilian journal of biology**, 80(4), 934-942. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1519-6984.234969>.

OTRANTO, D.; DANTAS-TORRES, F.; BRIANTI, E.; TRAVERSA, D.; PETRIC D.; GENCHI, C. (2013). Vector-borne helminths of dogs and humans in Europe. **Parasites & vectors**. 6,16. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/1756-3305-6-16>.

PINNA, H. M. (2004). Incidência e distribuição de *Amblyomma cajennense* em regiões corporais de equinos das raças Mangalarga Marchador e Bretão Postier, naturalmente infestados. **Parasitology latinoamericana**, 59, (1-2), 21-25. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-77122004000100004>.

PINTER, A.; LABRUNA, M. B.; FACCINI, J. L. H. (2002). The sex ratio of *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) with notes on the male feeding period in the laboratory. **Veterinary parasitology**, 105(1), 79-88. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0304-4017\(01\)00650-1](https://doi.org/10.1016/S0304-4017(01)00650-1).

PINTER, A.; LABRUNA, M. B.; (2006). Isolation of *Rickettsia rickettsii* and *Rickettsia bellii* in cell culture from the tick *Amblyomma aureolatum* in Brazil. **Ann N Y acad sci.**, 1078, 523–529. Disponível em: <https://doi.org/10.1196/annals.1374.103>.

PITASSI, L. H. U. (2013). *Bartonella* spp. and the potencial risk of transmission by blood transfusion. 2013. Tese (Doutorado em Ciências Médicas) – **Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**, Campinas, São Paulo.

PURNELL, R. E.; JOYNER, L. P. (1967). Artificial feeding technique for *Rhipicephalus appendiculatus* and the transmission of *Theileria parva* from the salivary secretion. **Nature**, 216(5114), 484-485. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/216484a0>.

RATIU, I. A.; LIGOR, T.; BOCOS-BINTINTAN, V.; AL-SUOD, H.; KOWALKOWSKI, T.; RAFIŃSKA, K.; BUSZEWSKI, B. (2017). The effect of growth medium on an

Escherichia coli pathway mirrored into GC/MS profiles. **Journal of breath research**, 11(3), 036012. Disponível em: <https://doi.org/10.1088/1752-7163/aa7ba2>.

RIESS, T.; DIETRICH, F.; SCHMIDT, K. V.; KAISER, P. O.; SCHWARZ, H.; SCHÄFER, A.; KEMPF, V. A. (2008). Analysis of a novel insect cell culture medium-based growth medium for *Bartonella* species. **Applied and environmental microbiology**, 74(16), 5224-5227. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/AEM.00621-08>.

SKOTARCZAK, B.; ADAMSKA, M. (2005). Detection of *Bartonella* DNA in roe deer (*Capreolus capreolus*) and in ticks removed from deer. **European journal of wildlife research**, 51, 287–290. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s10344-005-0112-1>.

SANCHEZ, J. L. (2015) Clinical manifestations and treatment of Lyme disease. **Clinics in laboratory medicine**, 35:765–778. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cll.2015.08.004>.

SHAN, Y.; YANG, N.; TENG, D.; WANG, X.; MAO, R.; HAO, Y.; WANG, J. (2020). Recombinant of the Staphylococcal Bacteriophage Lysin CHAPk and its elimination against *Streptococcus agalactiae* biofilms. **Microorganisms**, 8(2), 216. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020216>.

SARAIVA, D. G.; SOARES, H. S.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. (2014). Feeding period required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsii* to vertebrate hosts. **Emerging infectious diseases**, 20(9), 1504. Disponível em: <https://doi.org/10.3201/eid2009.140189>.

SA-UTH, C.; RATTANASENA, P.; CHANDRAPATYA, A.; BUSSAMAN, P. (2018). Modification of medium composition for enhancing the production of antifungal activity from *Xenorhabdus stockiae* PB09 by using response surface methodology.

International journal of microbiology. 18, 3965851. Disponível em: <https://doi.org/10.1155/2018/3965851>.

SCHOTT, D.; UMENO, K.; DALL'AGNOL, B.; SOUZA, U. A.; WEBSTER, A.; MICHEL, T.; RECK, J. (2020). Detection of *Bartonella* sp. and a novel spotted fever group *Rickettsia* sp. in Neotropical fleas of wild rodents (*Cricetidae*) from Southern Brazil. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, 73, 101568. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2020.101568>.

SONENSHINE, D. E.; ROE, R. M. (2013). Biology of Ticks. New York, NY: **Oxford University Press**. p. 560.

ŠIMO, L.; KAZIMIROVA, M.; RICHARDSON, J.; BONNET, S. I. (2017). The essential role of tick salivary glands and saliva in tick feeding and pathogen transmission. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, 7, 281. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00281>.

SEPÚLVEDA-GARCÍA P.; RAFFO, E.; MEDINA-VOGEL, G.; MUÑOZ, F.; MUÑOZ, P.; ALABÍ, A.; NAVARRETE-TALLONI, M. J.; GONÇALVES, L. R.; CALIFRE DE MELLO, V. V.; MACHADO, R. Z.; ANDRÉ, M. R.; BITTENCOURT, P.; MÜLLER, A. (2020). Molecular survey of *Bartonella* spp. and haemoplasmas in American minks (*Neovison vison*). **Transboundary emergency diseases**, 00, 1-17. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/tbed.13857>.

TSAI, Y. L.; CHOMEL, B. B.; CHANG, C. C.; KASS, P. H.; CONRAD, P. A.; CHUANG, S. T. (2011). *Bartonella* and *Babesia* infections in cattle and their ticks in Taiwan. **Comparative immunology, microbiology & infectious diseases**, 34, 179–187. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2010.11.003>.

TEIXEIRA, R. C.; RANGEL, C. P.; COSTA, C. M.; SILVA, J. B. DA; FONSECA, A. H. (2006). Utilização da técnica de microcapilares para alimentação artificial de ninfas de *Amblyomma cajennense*. In: XIV CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA

VETERINÁRIA E II SIMPÓSIO LATINO-AMERICANO DE RICKETTSIOSES, 2006, Ribeirão Preto-SP. **Anais do XIV Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e II Simpósio Latinoamericano de Rickettsioses**. Ribeirão Preto-SP. p.213.

VETSCH, J. R.; PAULSEN, S. J.; MÜLLER, R.; HOFMANN, S. (2015). Effect of fetal bovine serum on mineralization in silk fibroin scaffolds. **Acta biomaterialia**, 13, 277-285. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.11.025>.

WACHTER, S.; HICKS, L. D.; RAGHAVAN, R.; MINNICK, M. F. (2020). Novel small RNAs expressed by *Bartonella bacilliformis* under multiple conditions reveal potential mechanisms for persistence in the sand fly vector and human host. **PLOS neglected tropical diseases**, 14(11), e0008671. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008671>.

WALADDE, S. M.; YOUNG, A. S.; MWAURA, S. N.; MWAKIMA, F. N. (1993). Transmission of *Theileria parva* to cattle by *Rhipicephalus appendiculatus* adults fed as nymphae in vitro on infected blood through an artificial membrane. **Parasitology**, 107(3), 249-256. Disponível em: <https://doi.org/10.17/S0031182000079221>.

WALKER, D. H.; VALBUENA, G. A.; OLANO, J. P. (2003). Pathogenic mechanisms of diseases caused by *Rickettsia*. **Annals of the New York academy of sciences**, 990(1), 1-11. Disponível em: <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2003.tb07331.x>.

WALKER, A. R.; BROWN, C. G. D.; BELL, L. J.; McKELLAR, S. B. (1979). Artificial infection of the tick *Rhipicephalus appendiculatus* with *Theilaria parva*. **Research in veterinary science**, 26(2), 264-265. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0034-5288\(18\)32935-7](https://doi.org/10.1016/S0034-5288(18)32935-7).

WECHTAISONG, W.; BONNET, S. I.; LIEN, Y. Y.; CHUANG, S. T.; TSAI, Y. L. (2020). Transmission of *Bartonella henselae* within *Rhipicephalus sanguineus*: data on the potential vector role of the tick. **PLOS neglected tropical diseases**, 14(10), e0008664. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008664>.

WILLADSEN, P.; KEMP, D. H.; MCKENNA, R. V. (1984). Bloodmeal ingestion and utilization as a component of host specificity in the tick, *Boophilus microplus*. **Zeitschrift für parasitenkunde**, 70(3), 415-420. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/BF00927829>.

WONG, M. T.; THORNTON, D. C.; KENNEDY, R. C.; DOLAN, M. J. (1995). A chemically defined liquid medium that supports primary isolation of *Rochalimaea* (*Bartonella*) *henselae* from blood and tissue specimens. **Journal of clinical microbiology**, 33(3), 742-744. Disponível em: <https://doi.org/10.1128/jcm.33.3.742-744.1995>.