

## TRANSMISSÃO DO VIRUS DA FEBRE MACULOSA MEXICANA POR *AMBLYOMMA STRIATUM* KOCH, 1844 (\*)

POR A. VALLEJO-FREIRE

(Do Laboratório de Imunologia, Instituto Butantan, S. Paulo, Brasil)

Em 1943, Bustamante e Varela (1,2) isolaram de doentes de febre maculosa, no México, um vírus, cujo comportamento experimental nos animais de laboratório tivemos oportunidade de estudar em publicação anterior (3). Os referidos autores examinaram inúmeros ixodidas capturados nos principais focos da doença, situados nos Estados de Sinaloa e Sonora, com o fim de encontrar exemplares naturalmente infetados, que pudessem ser responsabilizados como vetores desta riquetsiose (4).

As pesquisas feitas em vários lotes de ixodidas, num total de 2.190 exemplares, pertencentes às espécies *Argas persicus* (Oken, 1918), *Boophilus annulatus* (Say, 1821) e *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), não permitiram concluir serem estas espécies de ixodidas responsáveis pela transmissão da febre maculosa no México.

Posteriormente, Mariotte, Bustamante e Varela (5) encontraram sobre um cão exemplares de *Rhipicephalus sanguineus* naturalmente infetados.

Dos estudos feitos por diversos autores sobre os vetores da febre maculosa no Brasil pode se concluir da facilidade com que os ixodidas do gênero *Amblyomma* se infetam e transmitem a infecção.

Salles Gomes (6) no homem e, posteriormente, Travassos (7) no cão encontraram *Amblyomma striatum* Koch, 1844, naturalmente infetado com o vírus da febre maculosa em São Paulo. Este último autor (8,9) mostrou também ser possível a transmissão experimental da febre maculosa em São Paulo pelo *Amblyomma striatum*.

Neste trabalho estudamos a possibilidade de *Amblyomma striatum* se infetar com o vírus mexicano e transmitir a infecção por picada.

---

(\*) Com. à Soc. Biol. S. Paulo, em fevereiro de 1945.

Entregue para publicação em 14 de abril de 1947.

## MATERIAL E METODOS

Os exemplares de *Amblyomma striatum* foram capturados sobre cães da Fazenda do Instituto Butantan, na fase adulta, sexuada. Nesse local, apesar de repetidas pesquisas, nunca foram encontrados carrapatos infetados. Para maior segurança, com alguns exemplares dos lotes colhidos foram feitas as provas rotineiras usadas para afastar a hipótese de eventual infecção natural.

Os ixodidas escolhidos foram colocados sobre cobaias infetadas, para que se alimentassem durante o período de circulação do vírus. Retirados antes de estarem totalmente alimentados foram mantidos á temperatura ambiente do laboratório e depois de alguns dias colocados sobre cobaias normais, afim de se tentar a transmissão da infecção por picada.

*Virus BV.* Originário do México, isolado de um doente de infecção exantemática por Bustamante e Varela. Recebido em *Ornithodoros* sp. e mantido por passagens sucessivas em cobaias.

## RESULTADOS

1a. *Experiência.* 12 *Amblyomma striatum* normais, adultos, machos, depois de mantidos 20 dias á temperatura ambiente no laboratório, foram colocados sobre uma cobaia infetada durante o período correspondente á circulação do vírus no sangue. Decorridas 24 horas, encontramos 8 ixodidas alimentados, mas ainda fixos á pele da cobaia; os 4 restantes foram desprezados.

Três dias depois, 4 ixodidas foram separadamente triturados e o material obtido, suspenso em salina esteril. Inocularam-se quatro cobaias, cada qual com a suspensão correspondente a um ixodida. Três cobaias reagiram após período de incubação algo prolongado; duas morreram da infecção, uma no 10.º e outra no 11.º dia da inoculação; outra cobaia mostrou reação benigna, depois de 7 dias de incubação, sobrevivendo. Esta, quando reinoculada com vírus *BV* de passagem, apresentou sólida imunidade. A quarta cobaia, que não apresentou reação térmica, também se mostrou protegida, quando inoculada com vírus de passagem 16 dias depois de receber pela via subcutânea a suspensão do ixodida.

Decorridos 15 dias da alimentação infetante, verificou-se que, um exemplar dos quatro restantes estava morto. Cada qual dos 3 ixodidas vivos, foi triturado separadamente e o conteúdo de suas víceras, livres de carapaça, suspenso em 2 cm<sup>3</sup> de salina esteril. Com a suspensão de cada carrapato inoculamos duas

cobaias pela via subcutânea, 1 cm<sup>3</sup> em cada cobaia. Como resultados destas provas verificou-se que dois dos ixodidas mantiveram ativo o vírus BV, pois as cobaias inoculadas reagiram tipicamente. As cobaias inoculadas com material do terceiro carrapato não apresentaram infecção clínica característica, nem lesões correspondentes à invasão das riquetsias da F. Maculosa Mexicana.

2a. *Experiência.* Três exemplares machos de *Amblyomma striatum* (A, B e C) foram depositados sobre uma cobaia (No. 24.085) inoculada com vírus BV (6.<sup>a</sup> passagem). Vinte horas depois, foram eles encontrados fixos á pele do animal, parcialmente alimentados; retirados, foram guardados durante 6 dias em tubos próprios para conservação de ixodidas e mantidos em estufa á temperatura de 26°C.

Um dos exemplares (A), depois de lavado externamente com solução fisiológica, foi triturado. O conteúdo de seus órgãos internos, isento das partes quitinosas suspenso em 2 cm<sup>3</sup> de salina e inoculado pela via subcutânea em duas cobaias, cada qual com 1 cm<sup>3</sup>.

Só uma cobaia reagiu tipicamente, morreu da infecção e apresentou á necropsia as lesões características originais, provocadas pelo vírus BV. Nesta cobaia foi possível evidenciar a presença de riquetsias no protoplasma das células do exsudato peritoneal. Com sangue e tecido cerebral transmitimos a infecção a outras cobaias e o vírus foi a seguir mantido em série.

Os dois *Amblyomma striatum* restantes (B e C), após o 7.º dia da última alimentação parcial, completaram a alimentação em cobaias normais (Nos. 24.177 e 24.178) durante 48 horas. Deste modo, ao mesmo tempo que estimulavamos a multiplicação das riquetsias eventualmente introduzidas nos ixodidas durante a primeira alimentação, aproveitamos as cobaias para demonstrar a transmissão pela picada de *Amblyomma striatum*.

Um dos ixodidas (B), decorridas 24 horas depois de colocado sobre a cobaia No. 24.177, não estava fixado á pele do animal, mas sim após 48 horas, por ocasião da retirada, não tendo, no entanto, sugado a cobaia, pois o contróle de peso antes e depois da colocação do ixodida não acusou aumento.

O outro ixodida (C), colocado sobre a cobaia No. 24.178, pelo contrário, estava fixo depois de 24 e 48 horas, sendo evidente o aumento de volume devido á sucção de sangue.

A cobaia No. 24.177 foi observada durante 10 dias depois de retirado o carrapato, não mostrando qualquer alteração térmica, nem mesmo á necropsia foi possível encontrar quaisquer alterações nos órgãos internos.

A Cobaia No. 24.178 ao terceiro dia apresentou reação térmica intensa ( $40^{\circ}7$ ), tendo-se mantido elevada a temperatura durante mais 5 dias, morrendo da infecção no 6.º dia e apresentando lesões típicas da infecção. Esta cobaia foi sangrada no 1.º dia de elevação térmica e o sangue obtido foi injetado pela via peritoneal em duas cobaias; uma delas reagiu mais ou menos tipicamente e ao ser sacrificada no 9.º dia apresentou lesões características. As passagens feitas com sangue colhido no 8.º dia resultaram negativas, talvez porque o material não tenha sido colhido em momento propício. Por este motivo a infecção não foi mantida em série.

Os dois carrapatos, B e C, decorridas 24 horas foram triturados de mistura com 4 cm<sup>3</sup> de solução fisiológica. A emulsão obtida serviu para inocular duas cobaias (Nos. 24.281 e 24.282) pela via subcutânea. Em ambas se evidenciou a presença de vírus, pois sofreram infecção típica. A cobaia No. 24.282 no 8.º dia após a inoculação ou 5.º da temperatura elevada, foi sangrada e sacrificada. Tanto com o sangue, como com o cérebro deste animal de prova foram obtidas séries positivas de passagens de vírus de cobaia a cobaia, conservando as propriedades primitivas do vírus.

*3a. Experiência.* Uma outra experiência de transmissão foi feita com uma fêmea de *Amblyomma striatum*, colocada a sugar cobaia infetada com o vírus *BV* no período da circulação do vírus e retirada 24 horas depois, quando parcialmente alimentada. Seis dias depois de permanecer a  $35^{\circ}\text{C}$ , esta fêmea foi colocada sobre cobaia normal durante 4 dias, sendo retirada engorgitada. A cobaia utilizada não apresentou febre maculosa, nem mesmo inaparente.

A seguir a fêmea cheia de sangue foi mantida á temperatura ambiente do laboratório (cerca de  $22^{\circ}\text{C}$ ), iniciando a desova 20 dias depois. Os ovos postos nas primeiras 48 horas, em número aproximadamente de 150, foram lavados repetidas vezes, triturados de mistura com 3 cm<sup>3</sup> de solução fisiológica. O material obtido foi inculado em duas cobaias, recebendo cada animal pela via subcutânea 1,5 cm<sup>3</sup> da emulsão. Estas cobaias não se infetaram e, quando reinoculadas com vírus de passagem, não se mostraram protegidas.

Decorridos mais 6 dias, com os ovos resultantes da postura feita nos 6 dias anteriores, repetimos a experiência, inoculando duas cobaias pela via subcutânea com o resultado da trituração de mistura com salina. Ambas reagiram tipicamente, inclusive com reação escrotal intensa. Uma morreu da infecção; a outra foi sangrada no 7.º dia, quando em plena reação febril, e o sangue obtido, inoculado em duas novas cobaias. Sacrificadas logo depois, retiramos o

cérebro e com êle preparamos u'a emulsão, que após ligeira centrifugação foi utilizada para inocular duas cobaias.

Tanto as cobaias inoculadas com sangue, como com cérebro, se infetaram e reagiram tipicamente, fornecendo passagens positivas em série. Em uma delas foi possível evidenciar a presença de riquetsias no exame feito no exsudato peritoneal.

O ixodida fêmeo utilizado nestas experiências morreu 6 dias mais tarde, isto é, 44 dias depois da alimentação infetante. Vinte e quatro horas após a morte foi triturado e o material resultante inoculado em duas cobaias. Estas não apresentaram reação típica de febre maculosa, porém, quando reinoculadas 15 dias depois, mostraram proteção para o vírus homólogo. Isto permite concluir que as riquetsias mortas aí existentes ainda foram antigenicamente capazes de provocar imunidade.

#### RESUMO

*Amblyomma striatum* se infecta ao se alimentar em cobaia infetada pelo vírus da riquetsiose mexicana em estudo e pode transmitir por picada a infecção.

Fêmeas de *Amblyomma striatum*, alimentadas em cobaia infetada, dão postura a ovos, que a partir do terceiro dia da desova podem fornecer emulsões infetantes.

#### ABSTRACT

*Amblyomma striatum* is infected experimentally when feeding on guinea-pig infected with the Mexican spotted fever virus and transmits the infection by bite.

Female specimens of *Amblyomma striatum*, fed on infected guinea-pig, give posture to eggs, which render infectious emulsions from the third day of posture on.

#### BIBLIOGRAFIA

1. Bustamante, M. E. & Varela, G. — Una nueva rickettsiosis en Mexico. Existencia de la fiebre manchada americana en los Estados de Sinaloa y Sonora. *Rev. Inst. de Salubr. y Enf. Trop.*, 4:189-210, 1943.
2. Bustamante, M. E. & Varela, G. — Aislamiento de una cepa de fiebre manchada idéntica a la de las Montañas Rocosas en Sinaloa, Mexico. *Bol. Of. San. Pan.*, 23: 117-118, 1944.

3. Vallejo-Freire, A. — Spotted fever in Mexico. Immunological relationship between the virus of the rickettsiosis observed in Sonora and Sinaloa, Mexico, and other Spotted Fever viruses. *Mem. Inst. Butantan*, 19:159-180, 1946.
4. Bustamante, M. E. & Varela, G. — Características de la fiebre manchada de las Montañas Rocosas en Sonora y Sinaloa, Mexico. *Rev. Inst. de Salubr. y Enf. Trop.*, 5:129-1936, 1944.
5. Mariotte, C. E., Bustamante, M. E. & Varela, G. — Hallazgo del *Rhipicephalus sanguineus* Latreille infectado naturalmente con fiebre manchada de las Montañas Rocosas, en Sonora (Mexico). *Rev. Inst. de Salubr. y Enf. Trop.*, 5:297-300, 1944.
6. Gomes, L. Salles. — Typho exanthematico de São Paulo. *Brasil-Medico*, 47:923-926, 1933.
7. Travassos, J. — La tique *Amblyomma striatum* Koch, 1844, comme vecteur du typhus exanthématique de São Paulo. Infections naturelles en specimens recueillis sur des chiens, dans un foyer de la capitale (São Paulo). *C. R. Soc. Biol.*, 127:1377-1380, 1938.
8. Travassos, J. — Études expérimentales sur la transmission du typhus exanthématique de São Paulo par l'*Amblyomma striatum* Koch, 1844. *C. R. Soc. Biol.*, 127:462-464, 1938.
9. Travassos, J. — Transmission expérimental du typhus exanthématique de São Paulo par l'*Amblyomma brasiliense* Aragão, 1908. *C. R. Soc. Biol.*, 127:1375-1376, 1938.