

NOTA DE PESQUISA

INFECÇÃO DE ÓRGÃOS INTERNOS DE FÊMEAS INGURGITADAS DE *Anocentor nitens* (ACARI: IXODIDAE) POR *Metarhizium anisopliae*

ELZA M. SUZUKI¹; WILSON W. DA SILVA²; GISELA L. DA COSTA³; VÂNIA RITA E. P. BITTENCOURT⁴

ABSTRACT:- SUZUKI, E.M.; SILVA, W.W.; COSTA, G.L.; BITTENCOURT, V.R.E.P. **Internal organs infection in *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae) engorged females by *Metarhizium anisopliae*.** [Infecção de órgãos internos de fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens* (Acari: Ixodidae) por *Metarhizium anisopliae*.] Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária v. 12, n. 2, p. 85-87, 2003. Depto de Parasitologia Animal, Instituto de Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000, Brazil. E-mail: vaniabit@ufrj.br

The aim of this research was to evaluate the infection of *Metarhizium anisopliae* on internal organ of *Anocentor nitens*. Coelomatic cavity of engorged females were inoculated with a suspension of 10⁸ conidia/ml. Three, six and ten days after the inoculation, haemolymph, midgut, Malpighian tubules and uterus were collected and sowed in BDA medium. To confirm the presence of the fungi in three organs, fragments of sowed medium were mounted between slide and coverslide and coloured with lactophenol blue, for visualisation and identification of the fungus. The results demonstrated that *M. anisopliae* were found only in the haemolymph and Malpighian tubules. Death of females was observed, from the sixth day after the inoculation, due to action of the entomopathogenic fungi, being confirmed by its growth on the ticks maintained in humid chamber.

KEY WORDS: tick, *Anocentor nitens*, entomopathogenic fungi, Malpighian tubules, coelomatic inoculation.

RESUMO

Com o objetivo de avaliar a infecção em órgãos internos, fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens* foram inoculadas via intracelomática com uma suspensão de 10⁸ conídios/ml de *Metarhizium anisopliae*. Três, seis e 10 dias após a inoculação, hemolinfa, alças intestinais, túbulos de Malpighi e útero foram coletados e semeados em meio de batata dextrose ágar (BDA). Para a confirmação da presença do fungo nestes órgãos, fragmentos do meio de cultura utilizados foram montados entre lâmina e lamínula e corados com azul de lactofenol, para visualização e identificação do fungo. Os resultados demonstraram que houve colonização por *M. anisopliae* apenas na hemolinfa e nos túbulos de Malpighi. Foi observada a morte de fêmeas, a partir do sexto dia após a inoculação, de-

vido a ação do fungo, sendo confirmadas pelo seu crescimento sobre os carrapatos mantidos em câmara úmida.

PALAVRAS-CHAVE: Carrapato, *Anocentor nitens*, fungo entomopatogênico, inoculação intracelomática, túbulos de Malpighi.

O carrapato *Anocentor nitens* é amplamente distribuído no Brasil e destaca-se por ser responsável pela transmissão da *Babesia caballi* (ROBY; ANTHONY, 1963; HEUCHERT et al., 1999), além de causar perdas pela espoliação sangüínea e propiciar infecções secundárias. As técnicas empregadas no controle da fase não parasitária estão correlacionadas com manejo de pastagens e as medidas para o controle da fase parasitária baseiam-se principalmente no uso de acaricidas, causando resistência e elevando os custos nos programas de controle (HOGSETTE, 1999), além do impacto ambiental. O controle microbiano através de fungos entomopatogênicos tem ganhado espaço contra vários ectoparasitas e agentes transmissores de doenças (HALL; PAPIEROK, 1982; KAAYA; MUNYINYI, 1995; SMITH et al., 2000). No Brasil, pesquisas realizadas envolvendo o fungo, *Metarhizium anisopliae*,

*Sob os auspícios do CNPq.

¹Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias/UFRJ, Km 7 da BR 465, Seropédica, RJ 23890-000.

²Universidade Federal da Paraíba, DMV-CSTR, Campus de Patos, PB.

³Fundação Oswaldo Cruz-FIOCRUZ, Depto. Micologia.

⁴Departamento de Parasitologia Animal/UFRJ, Bolsista produtividade em pesquisa CNPq 1C.

para o controle de ixodídeos demonstraram eficiência sobre vários estágios de desenvolvimento de diversas espécies de carrapatos, comprometendo assim a formação de gerações sucessivas (BITTENCOURT et al., 1994; MONTEIRO et al., 1998; SOUZA et al., 1999). Recentemente, outros pesquisadores testaram a eficiência de vários isolados de *M. anisopliae* sobre *Boophilus microplus* e também concluíram que o uso do fungo no controle da espécie é promissor (FRAZON et al., 2000). Porém, os mecanismos de infecção dos fungos entomopatogênicos sobre os órgãos internos em carrapatos não estão totalmente esclarecidos, sendo necessários maiores estudos.

O experimento foi conduzido no Laboratório de Controle Microbiano de Carrapatos, na Estação para Pesquisas Parasitológicas W. O. Neitz, do Departamento de Parasitologia Animal, da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Fêmeas ingurgitadas de *A. nitens* foram coletadas a campo de equínos naturalmente infestados, lavadas em solução de hipoclorito de sódio à concentração de 1%, secas em papel filtro e acondicionadas individualmente em placas de Petri do 100mm de diâmetro. Tomou-se 20 fêmeas ingurgitadas, sendo cada uma inoculada via intracelomática com 1ml de suspensão de *M. anisopliae* isolado 959 (Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz-USP), na concentração de 10^8 conídios/ml. Vinte espécimes receberam inoculação intracelomática de 1ml de água destilada, para a composição do grupo controle. Estes espécimes foram mantidos em câmaras do tipo BOD, reguladas a $27 \pm 1^\circ \text{C}$ e umidade relativa superior a 80% até o momento da dissecação. Três, seis e 10 dias após a inoculação, cinco indivíduos do grupo controle e cinco do grupo tratado foram analisados. Para a coleta da hemolinfa, procedeu-se a secção da coxa do primeiro par de patas, sendo esta diretamente semeada em placa contendo meio de crescimento ágar-batata-dextrose (BDA). Posteriormente fez-se a dissecação para a separação do túbulo de Malpighi, alças intestinais e útero, sendo cada órgão juntado em grupos e submetidos a lavagem inicial durante um minuto sob agitação em agitador de tubos tipo Vortex, em solução de hipoclorito a 1% e posteriormente foram feitas três lavagens de um minuto sob agitação em água destilada estéril. O produto dos macerados de cada grupo de órgãos foi semeado em placas contendo meio BDA e acondicionado em câmara do tipo BOD, regulada nas condições já descritas. A leitura das culturas foi feita sete dias após cada semeadura, com montagem do fungo entre lâmina e lamínula, e corado com azul de lactofenol para a visualização das estruturas para identificação da espécie.

O crescimento do fungo foi observado nas culturas de hemolinfa desde o terceiro dia após a infecção e nas culturas de túbulo de Malpighi a partir do sexto dia após a infecção, o que não foi observado nas culturas de macerados de alça intestinal e útero, tanto para o grupo controle quanto para os grupos tratados (Tabela 1). Entre o sexto e o décimo dia após a inoculação verificou-se que haviam carrapatos mortos dentre aqueles que foram inoculados com a suspensão fúngica,

Tabela 1. Resultado da leitura das culturas em ágar, batata, dextrose de órgãos internos de fêmeas ingurgitadas de *Anocentor nitens* após a inoculação intra-celomática do fungo entomopatogênico *Metarhizium anisopliae* isolado 959, nos dias 3, 6 e 10.

Órgão	Tratamento	Dias Após a Inoculação		
		3	6	10
Hemolinfa	Controle	Negativo	Negativo	Negativo
	Ma 959	Positivo	Positivo	Positivo
Túbulos de Malpighi	Controle	Negativo	Negativo	Negativo
	Ma 959	Negativo	Positivo	Positivo
Alças Intestinais	Controle	Negativo	Negativo	Negativo
	Ma 959	Negativo	Negativo	Negativo
Útero	Controle	Negativo	Negativo	Negativo
	Ma 959	Negativo	Negativo	Negativo

que foram recolhidos e acondicionados em câmara úmida para verificação do crescimento de *M. anisopliae*. Os resultados encontrados no presente ensaio diferem da rota de infecção proposta por Alves (1998), que segue a seqüência: corpos gordurosos, sistema digestivo, túbulos de Malpighi, hipoderme, sistema nervoso, músculo e traquéia. Os dados coletados concordaram com Prasertphon e Tanada (1968), que verificaram a infecção do *M. anisopliae* primariamente na hemolinfa e afirmaram que os órgãos internos só foram colonizados após a morte do inseto, corroborando com Bittencourt et al. (1995), que observaram em *B. microplus* a presença do fungo em lâminas de hemolinfa a partir do segundo dia após infecção e em superfície externa de órgãos internos por impressão a partir do quarto dia, porém cortes histológicos dos órgãos não demonstraram a presença do fungo no interior destes. A presença do fungo apenas nos túbulos de Malpighi pode estar relacionada com a função excretora deste órgão. Outros insetos têm a capacidade de eliminar moléculas estranhas de tamanho moderado contidas na hemolinfa para os túbulos de Malpighi, via rota paracelular, como um mecanismo de defesa (CHAPMAN, 1998). Apesar da fisiologia dos túbulos de Malpighi de carrapatos não estar totalmente esclarecida (SONENSHINE, 1993), podemos extrapolar que o mesmo pode ocorrer nestes parasitas. Considerando-se que as condições do experimento foram ideais para o crescimento do fungo, podemos supor que a invasão do fungo aos demais órgãos, pode não ter ocorrido, por falta de tempo hábil ao seu desenvolvimento, ou devido à reações do hospedeiro contra o organismo invasor, provocando o encapsulamento dos conídios (HALL; PAPIEROK, 1982), assim, não permitindo a invasão interna dos órgãos em questão. É possível que a utilização de uma concentração acima de 10^8 conídios/ml possa trazer resultados diferentes aos observados neste experimento em relação aos órgãos infectados, portanto, pesquisas posteriores são necessárias para determinar o perfil do

mecanismo de invasão dos órgãos internos do carrapato *A. nitens* pelo *M. anisopliae*, bem como sua ação sobre os processos fisiológicos e os prejuízos decorrentes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES, S. B. *Controle Microbiano de Insetos*. Piracicaba: FEALQ, 1998. 1163 p.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 16, p. 32-38, 1994.
- BITTENCOURT, V.R.E.P.; MASSARD, C.L.; LIMA, A.F. Dinâmica da infecção do carrapato *Boophilus microplus* pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. *Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida*, v. 17, n. 1, p. 83-88, 1995.
- CHAPMAN, R. F. Excretion and salt and water regulation. In: *The Insect. Structure and Function*. Cambridge: Cambridge University Press, 1998, p. 478-508.
- FRAZZON, A. N. G.; VAZ-JUNIOR, I. S.; MASUDA, A.; SCHRANK, A.; VAINSTEIN, M. H. In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, v. 94, n. 2, p. 117-125, 2000.
- HALL, R. A.; PAPIEROK, B. Fungi as biological control agents of arthropods of agricultural and medical importance. *Parasitology*, v. 84, n. 2, p. 205-240, 1982.
- HEUCHERT, C. M. S.; GIULLI JR, V.; ATHAIDE, D. F.; BÖSE, R.; FRIEDHOFF, K. T. Seroepidemiologic studies on *Babesia equi* and *Babesia caballi* infections in Brazil. *Veterinary Parasitology*, v. 85, n. 1, p. 1-11, 1999.
- HOGSETTE, J. A. Management of ectoparasites with biological control. *International Journal for Parasitology*, v. 29, n. 1, p. 147-151, 1999.
- KAAYA, G. P.; MUNYINYI, D. M. Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsé-tsé fly (*Glossina* sp) at developmental sites. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 66, n. 3, p. 237-241, 1995.
- MONTEIRO, S. G.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; DAEMON, E.; FACCINI, J. L. H. Pathogenicity under laboratory conditions of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on larvae of the tick *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 7, n. 2, p. 113-116, 1998.
- PRASERTPHON, S.; TANADA, Y. The formation and circulation on *Galleria* of hiphal bodies of Entomophthoraceus fungi. *Journal of Invertebrate Pathology*, v. 11, n. 3, p. 260-280, 1968.
- ROBY, T. O.; ANTHONY, D. W. Transmission of equine piroplasmiasis by *Dermacentor nitens*. *Journal of American Veterinary Medical Association*, v. 142, n. 7, p. 768-769, 1963.
- SMITH, K. E.; WALL, R.; FRENCH, N. P. The use of entomopathogenic fungi for the control of parasitic mites, *Psoroptes* spp. *Veterinary Parasitology*, v. 92, n. 2, p. 97-105, 2000.
- SONENSHINE, D. E. The hindgut, Malpighian tubules, and the coxal glands. In: *Biology of Ticks*. Oxford: Oxford University Press, 1993, p. 189-199.
- SOUZA, E. J.; REIS, R. C. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Evaluation of *in vitro* effect of the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on eggs and larvae of *Amblyomma cajennense*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 8, n. 2, p. 127-132, 1999.

Recebido em 9 de junho de 2003.

Aceito para publicação em 3 de setembro de 2003.