

SHORT COMMUNICATION

MÉTODO DE PREPARO DE ÁCAROS DO GÊNERO *RAILLIETIA* TROUËSSART, 1902 (ACARI: GAMASIDA) PARA ESTUDO AO MICROSCÓPIO ELETRÔNICO DE VARREDURA

F. R. A. FERRY¹, R. M. LANFREDI², S. M. FARIAS³, T. INADA¹ & J. L. H. FACCINI¹

(1) Departamento de Parasitologia Animal, IB/UFRRJ, Km 47 Antiga Rodovia Rio-São Paulo, Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil, CEP 23851-970; (2) Programa de Biologia Celular e Parasitologia, Instituto de Biofísica/UFRJ, Ilha do Governador, Rio de Janeiro, Brasil; (3) Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (CNPAB), Km 47, Antiga Rodovia Rio-São Paulo, Itaguaí, Rio de Janeiro, Brasil.

SUMÁRIO: Ácaros do gênero *Raillietia* coletados do conduto auditivo externo de bovinos, bubalinos e caprinos apresentaram-se cobertos com partículas de secreção purulenta, dificultando a análise ao microscópio eletrônico de varredura. Banhos em solução fisiológica, lavagem em solução de detergente a 10% e passagem em ultrassom, após a fixação em álcool 70%, não foram suficientes para uma boa limpeza destes espécimes. Os adultos jovens de ácaros obtidos em condições de laboratório, sem o contato com a secreção do conduto auditivo externo dos hospedeiros, foram considerados os melhores exemplares para o estudo através do MEV.

PALAVRAS-CHAVE: Acari, Gamasida, metodologia, microscopia eletrônica de varredura.

Os ácaros do gênero *Raillietia* Trouessart, 1902, conhecidos como parasitos do conduto auditivo externo e da superfície externa da membrana timpânica de ruminantes domésticos e selvagens, vêm merecendo, cada vez mais, a atenção dos pesquisadores, pois destacam-se entre as causas parasitárias da otite bovina (LEITE *et alii*, 1989b), embora sua importância econômica não tenha sido estudada.

No que se refere à microscopia eletrônica de varredura (MEV), método que a partir da década de 60 vem se incorporando à rotina dos acarologistas "por permitir um melhor estudo e interpretação das estruturas dos ácaros" (DE LA CRUZ & ESTRADA PEÑA, 1992), nada foi feito com as espécies de *Raillietia*, com exceção dos trabalhos de FERRY *et alii* (1993a,b).

Este trabalho, portanto, teve como objetivo desenvolver uma metodologia para estudos dos ácaros do gênero *Raillietia* ao MEV.

Os ácaros foram coletados do conduto auditivo externo de bovinos abatidos em matadouro e de bovinos e caprinos vivos de acordo com os métodos preconizados por LEITE *et alii* (1989a).

Os ácaros coletados pela manhã foram mantidos em solução fisiológica à temperatura ambiente e a seguir transportados para o laboratório. Durante a tarde, com auxílio de um pincel (nº 0, marca TIGRE) com cerdas finas e macias, os ácaros

foram separados do cerume e secreções advindas da coleta e lavados, um a um, em cinco placas de Petri contendo solução fisiológica. Os ácaros permaneceram cerca de cinco minutos em cada placa. A seguir estes foram lavados em mais três placas de Petri contendo solução a 10% de detergente comercial neutro (ODD neutro, ORNIEX S/A Ind. Brasil.). Nesta etapa, os ácaros eram cuidadosamente manipulados com o pincel. Os ácaros permaneceram cerca de 10 minutos em cada placa.

Os ácaros, ainda vivos, finalmente foram lavados em mais cinco placas de Petri contendo solução fisiológica 0,9%, ficando dez minutos em cada passagem.

Com a intenção de obter ácaros mais limpos, melhorando assim a qualidade das amostras, larvas de *Raillietia* foram coletadas do conduto auditivo externo dos bovinos e foram criadas, em laboratório, até a fase de adultos jovens, conforme os métodos sugeridos por FONSECA & FACCINI (1985), dispensando-se os procedimentos supracitados, bem como a limpeza por ultrassom.

O fixador utilizado que melhor preservou as estruturas dos ácaros, para análise ao MEV, foi o álcool etílico 70% (DEUNFF, 1982).

Os ácaros, 48 horas após a fixação, receberam tratamento com ultrassom (DEUNFF, 1982) (THORTON, INPEC Eletrônica Ltda, SP.), 60 hertz por um minuto.



Fig. 1. Níveis de limpeza utilizados em ácaros do gênero *Raillietia* para microscopia eletrônica de varredura: A) posição do gnathotectum (seta) em relação ao idiossoma, *R. flechtmani* (450X); B) gnathotectum não submetido a limpeza, *R. auris* (2.000X); C) submetidos a limpeza, *R. flechtmani* (2.700X); D) criados artificialmente em laboratório, *R. flechtmani* (1.500X).

Cerca de 48 horas após a fixação os ácaros foram lavados em solução tampão fosfato 0,1 M pH 7.2 e a seguir, foram pós-fixados com tetróxido de ósmio 1% (ANDRÉ & REMACLE, 1984), em solução aquosa, por uma hora. Após este período, procedeu-se uma nova lavagem em solução tampão e imediatamente iniciou-se o processo de desidratação.

Procedeu-se a desidratação da seguinte maneira: álcool 70%, álcool 80%, álcool 90%, e duas passagens em álcool

absoluto, álcool absoluto-acetona 3:1, álcool absoluto-acetona 1:1, álcool absoluto-acetona 1:3 e finalmente duas passagens em acetona. Os ácaros permaneceram cerca de 30 minutos em cada passagem.

O ponto crítico foi obtido em câmara pressurizada (BIO RAD E 3.000 Critical Point Dryer) em CO₂ líquido a 120 atmosferas por uma hora (ANDRÉ & REMACLE, 1984).

Os ácaros foram colados aos suportes porta amostras. A adesão dos mesmos foi feita com fita adesiva de face dupla

(MAHR, 1979), metalizados com ouro e examinados ao MEV.

As técnicas convencionais descritas na literatura e relacionadas ao estudo dos ácaros ao microscópio eletrônico de varredura (MEV), não se mostraram eficientes para o estudo dos ácaros do gênero *Raillietia*, uma vez que estes desenvolvem a maior parte do seu ciclo biológico no interior do conduto auditivo externo dos bovinos, em contato com uma exsudação descrita como ceruminosa, caseosa ou purulenta (LEITE *et alii*, 1989b) que são difíceis de serem removidas do tegumento dos mesmos.

Analisando-se os artigos publicados e relacionados com o estudo de ácaros (EVANS & TILL, 1965; EVANS & LOOTS, 1975; MAHR, 1979; DEUNFF, 1982; ANDRÉ & REMACLE, 1984; RAFFERTY & GRAY, 1987) e carrapatos (DE LA CRUZ & ESTRADA-PEÑA, 1992) ao MEV, observou-se que apesar de apresentarem em linhas gerais os mesmos princípios metodológicos para preparo do material a ser analisado, existem variações nos procedimentos usados por cada autor, uma vez que cada espécie analisada apresenta características próprias inerentes às suas particularidades individuais e ao seu habitat. Portanto, cada etapa do processamento dos ácaros do gênero *Raillietia* para estudo ao MEV, foi desenvolvida após diversas tentativas, baseadas nos autores supracitados.

As larvas de ácaros do gênero *Raillietia* criadas em laboratório conforme FONSECA & FACCINI (1985) foram dispensadas dos procedimentos de limpeza e passagem por ultrassom porque o cerume, pus e outras partículas aderidas ao tegumento dos mesmos coletados em infestações naturais foram perdidas com as ecdises das larvas. Os adultos jovens estavam limpos, não se observando partículas aderidas ao tegumento do ácaro (Fig. 1D).

Para fixação dos ácaros foram testados três tipos de fixadores: a) Glutaraldeído 2,5% 0,1 M pH 7.2 conforme preconizado por ANDRÉ & REMACLE (1984) para *Tetranychus urticae* (Tetranychidae: Actiniedida), ácaros fitófagos; b) Álcool 70% conforme DEUNFF (1982) para ácaros da família Spinturnicidae (Gamasida), parasitos de morcegos e, c) Glutaraldeído 2,5% + Paraformaldeído 4% em tampão cacodilato conforme a rotina de preparo de material para estudo ao MEV no laboratório de Parasitologia do IBCCF-UFRJ (DE SOUZA *et alii*, 1989).

Os resultados foram mais satisfatórios nos espécimes fixados pelo álcool 70%, pois os mesmos apresentaram as estruturas mais íntegras e menores distorções no idiossoma como abaulamentos da cutícula, quebra de cerdas, etc. O uso de álcool 70% para fixação dos ácaros do gênero *Raillietia* a serem processados para MEV é o método recomendado.

O ponto crítico para *Raillietia* foi realizado conforme sugerido por ANDRÉ & REMACLE (1984) e RAFFERTY

& GRAY (1987) para *T. urticae* e *Psoroptes* sp. respectivamente.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem aos técnicos dos Laboratórios de Ultraestrutura Celular Dra. Herta Meyer do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da UFRJ e Microscopia Eletrônica do Centro Nacional de Pesquisa em Agrobiologia /EMBRAPA pelo auxílio durante a realização deste trabalho.

SUMMARY

Raillietia mites collected from bovines, buffalos and caprines external ear canal are covered by an aural secretion which make them useless for scanning electron microscopy examination. Washing in 0.9% saline solution and 10% neutral detergent solution, fixating in 70% ethyl Alcohol and then cleaning in an ultrasonic cleaner did not remove totally the host aural secretion. The young adult mites bred in laboratory conditions, without contact with host aural secretions, were better for SEM studies.

KEY WORDS: Acari, Gamasida, scanning electron microscopy, methods.

REFERÊNCIAS

- ANDRE, H. M. & REMACLE, C. (1984). Comparative and functional morphology of the Gnathosoma of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Acarologia*, 25(2): 179-190.
- DE LA CRUZ, J. & ESTRADA-PEÑA, A. (1992). A simple, new improved method for preparing ticks for examination by Scanning Electron Microscopy. *Acarologia*, 33(4): 321-323.
- DE SOUZA, W.; SOUTO-PADRON, T.; DODSWORTH, R. M.; BARTH, O. M.; SILVEIRA, M.; SESSO, A. & HADDAD, A. (1989). *Manual sobre técnicas básicas em microscopia eletrônica*. Vol. I. Ed. Soc. Bras. Mic. Elet. 105 p.
- DEUNFF, J. (1982). Observations en Microscopie Electronique à Balayage sur la Famille des Spinturnicidae (Acari: Mesostigmata). I. Morphologie Generale. *Acarologia*, 23(2): 103-111.
- EVANS, G. O. & LOOTS, G. C. (1975). Scanning Electron Microscope Study of the Structure of the Hypostome of *Phytogamasus*, *Laelaps* and *Ornithonyssus* (Acari: Mesostigmata). *J. Zool. Lond.*, 176: 425-436.
- EVANS, G. O. & TILL, W. M. (1965). Studies on the british Dermanyssidae (Acari: Mesostigmata). Part I. External Morphology. *Bull. Br.Mus. (Nat. Hist.) Zool.*, 13: 247-294.

- FERRY, F. R. A.; FACCINI, J. L. H.; INADA, T.; LANFREDI, R. M. & FARIA, S. M. (1993a). Ultraestrutura do gnatosoma de *Raillietia flechtmanni* Faccini, Leite & Costa, 1992 (Acari: Gamasida). XIII Congr. Bras. Parasitol. *Resumos*. Rio de Janeiro. RJ.
- FERRY, F. R. A.; LANFREDI, R. M.; FARIA, S. M.; INADA, T. & FACCINI, J. L. H. (1993b). Método de preparo de ácaros do gênero *Raillietia* Trouessart (Acari: Gamasida) para estudo ao microscópio eletrônico de varredura. XIV Col. Soc. Bras. Micr. Elet. *Resumos*. Caxambú, MG.
- FONSECA, A. H. & FACCINI, J. L. H. (1985). In vitro development of *Raillietia auris* (Leidy) (Acarina: Mesostigmata). *Acarologia*, 26(3): 211-214.
- LEITE, R. C.; FACCINI, J. L. H. & COSTA, A. L. (1989a). Avaliação de uma técnica in vivo para medir a infestação por ácaros do gênero *Raillietia* Trouessart, 1902 (Acari) em bovinos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84: 309-311.
- LEITE, R. C.; NUNES, V. A.; FACCINI, J. L. H.; LOPES, C. W. G.; NUNES, I. J. & COSTA, A. C. (1989b). Aspectos clínicos da Raillietiose bovina. *Arq. Univ. Fed. Rural do Rio de Janeiro*, 12: 83-91.
- MAHR, D. L. (1979). A method of preparing phytoseiid mite (Mesostigmata) for Scanning Electron Microscopy. *Int. J. Acar.*, 5(1): 15-17.
- RAFFERTY, D. E. & GRAY, J. S. (1987). The feeding behaviour of *Psoroptes* spp. mites on rabbits and sheep. *J. Parasitol.*, 73(5): 901-906.

(Received 12 May 1994, Accepted 25 July 1994)