

METODOLOGIA PARA COLONIZAÇÃO DO *AMBLIOMMA CAJENNENSE* (FABRICIUS, 1787) (ACARI: IXODIDAE) EM LABORATÓRIO.

A. SANAVRIA¹ & M.C.A. PRATA²

(1) Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública, UFRRJ, Antiga Rodovia Rio-São Paulo, Km 47, Caixa Postal 74.556, CEP 23.851-970, Itaguaí, RJ; (2) Bolsista do CNPq, UFRRJ.

SUMÁRIO: Com o objetivo de desenvolver uma metodologia apropriada para o estabelecimento de colônias de *Amblyomma cajennense* em laboratório, foram realizadas 34 infestações experimentais com larvas em 31 coelhos, 28 infestações com ninfas em 20 coelhos e 42 infestações com adultos jovens em 6 eqüinos. O período de pré-postura observado foi de $5,30 \pm 1,02$ dias e a incubação dos ovos, $33,04 \pm 1,69$ dias. O tempo transcorrido entre o desprendimento da metalarva e o término da ecdise larva/ninfa foi de $11,29 \pm 1,19$ dias; do desprendimento da metaninfa ao término da ecdise ninfa/adulto foram transcorridos $13,43 \pm 0,50$ dias. Os períodos relativos à fase parasitária foram: cinco dias para ingurgitamento larval, cinco dias para ingurgitamento ninfal e oito a dez dias para o ingurgitamento de adultos. A partir dos parâmetros obtidos e da metodologia utilizada, verificou-se que o ciclo biológico do *A. cajennense* em laboratório levou aproximadamente 93 a 95 dias para se completar.

PALAVRAS-CHAVE: Ciclo biológico, *Amblyomma cajennense*, ixodidae, laboratório.

INTRODUÇÃO

O conhecimento da biologia do *Amblyomma cajennense* é fundamental para auxiliar o estabelecimento de estratégias racionais de controle, visando minimizar os prejuízos determinados pelo parasitismo. Na literatura são encontrados registros de estudos sobre a biologia de ixodídeos (ROHR, 1909), criação artificial de *A. cajennense* para o preparo de vacinas (TRAVASSOS & VALLEJO-FREIRE, 1944), aspectos da postura de *A. cajennense* em laboratório, sob condições controladas (DRUMMOND & WHETSTONE, 1975; PRATA *et alii*, 1995 d), parâmetros relativos às fases larval e ninfal (OLIVIERI & SERRA FREIRE, 1984a,b; PRATA *et alii*, 1995b,c) e infestações experimentais com adultos de *A. cajennense* em eqüinos (PRATA *et alii*, 1995a), dentre outros.

Na natureza, as diferentes fases do ciclo biológico deste ixodídeo podem se estender por longos períodos, de acordo com as variações de temperatura, umidade relativa e precipitação pluviométrica. Em laboratório, podem-se encurtar significativamente os períodos relativos à fase não parasitária, mantendo-se os estágios evolutivos sob condições

controladas. Por ser um carrapato que realiza mudas fora do hospedeiro, são necessárias três infestações experimentais para a completa reprodução do ciclo biológico do *A. cajennense* em laboratório.

O presente trabalho teve por objetivo o desenvolvimento de uma metodologia que permita o estabelecimento de colônias de *A. cajennense* em laboratório, utilizadas em estudos sobre biologia e controle deste parasita.

MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi efetuada no Laboratório de Doenças Parasitárias do Departamento de Epidemiologia e Saúde Pública do Instituto de Veterinária e no Instituto de Zootecnia, ambos pertencentes à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, situada no Município de Itaguaí, RJ, no período de março a setembro de 1994.

Foram coletadas 473 fêmeas ingurgitadas provenientes de eqüinos naturalmente infestados, criados extensivamente no município. Após a coleta, as fêmeas foram limpas com pincel

de cerdas macias, pesadas em balança eletrônica com precisão de 0,001 g e acondicionadas em grupos de, no máximo 10, dentro de placas de Petri, mantidas em estufa incubadora para BOD sob condições controladas (temperatura de 27°C, umidade relativa superior a 70% e 12 horas de fotofase) para realização da postura. Vinte dias após o início da postura, os ovos foram pesados e acondicionados em seringas plásticas previamente preparadas, mantidas em BOD, onde ocorria a eclosão.

Para o estudo da fase larval foram realizadas infestações em coelhos adultos, de ambos os sexos, com pelagem uniforme nas cores branca ou preta. Cada animal foi infestado com aproximadamente 3000 a 4000 larvas a partir de cinco dias de idade. O material infestante era inserido no pavilhão auricular dos coelhos, onde previamente havia sido adaptado um capuz confeccionado em tecido de algodão aderido à pele pela extremidade inferior com pasta UNA (água destilada, gelatina em folha, glicerina e óxido de zinco). A extremidade superior do capuz era vedada com velcro, constituindo uma modificação da técnica de NEITZ *et alii* (1971). Os capuzes eram abertos diariamente para acompanhamento dos processos de fixação, ingurgitamento e desprendimento larval, até a queda da última metalarva. Cinco dias após cada infestação, era efetuada a coleta das metalarvas, que eram contadas e acondicionadas em seringas, mantidas em BOD para efetuar ecdise, obtendo-se ninfas.

Para o acompanhamento da fase ninfal, foram realizadas infestações em coelhos, seguindo-se a mesma metodologia descrita para as infestações com larvas. Cada animal foi infestado com 400 a 1500 ninfas a partir de três dias de idade. Os capuzes eram abertos diariamente para acompanhamento dos processos de fixação, ingurgitamento e desprendimento ninfal, até a queda da última metaninfa. Cinco dias após cada infestação, efetuava-se a coleta das metaninfas, que eram contadas e transferidas para seringas mantidas em BOD, para efetuar ecdise, obtendo-se adultos jovens, machos e fêmeas.

Para o estudo detalhado da fase adulta do *A. cajennense*, foram realizadas infestações experimentais em seis equinos de ambos os sexos, sem raça definida, mantidos em regime de estabulação individual. Em ambos os lados da tábua do pescoço dos equinos foi adaptada uma peça confeccionada em tecido de algodão, em formato retangular, com área de aproximadamente 600 cm², dotada de uma abertura próxima à extremidade superior, vedada com velcro. Essa estrutura era fixada ao equino através de pasta UNA e protegida com esparadrapo nas extremidades. Cada equino foi infestado sete vezes com intervalos de três dias, com casais de adultos jovens de *A. cajennense* a partir de três dias de idade. Os animais foram inspecionados diariamente para acompanhamento dos processos de fixação e ingurgitamento dos carrapatos, bem como a recuperação das fêmeas ingurgitadas desprendidas.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O peso médio de cada fêmea ingurgitada foi de $601,96 \pm 16,01$ mg, variando entre 340,00 e 1220,00 mg. As fêmeas realizaram posturas entre 100,00 e 444,00 mg, com média de $286,36 \pm 91,85$ mg. O período de pré-postura foi de $5,30 \pm 1,02$ dias, enquanto a incubação dos ovos se realizou em $33,04 \pm 1,69$ dias, em média. DRUMMOND & WHETSTONE (1975), analisando parâmetros biológicos de fêmeas de *A. cajennense* coletadas de bovinos, mantidas sob condições controladas, registraram um peso médio de 639 mg para cada fêmea ingurgitada e períodos de 6,3 e 32 dias para a pré-postura e a incubação dos ovos, respectivamente. Quando não obtidos sob condições controladas, esses parâmetros podem se estender por períodos bem mais longos. ROHR (1909) observou período de pré-postura entre 11 e 13 dias para fêmeas de *A. cajennense* mantidas à temperatura ambiente. TRAVASSOS & VALLEJO-FREIRE (1944), ao efetuar criação artificial de *A. cajennense* para o preparo de vacina contra a febre maculosa, verificaram período de pré-postura de 7,6 dias para fêmeas mantidas à temperatura ambiente e apenas 6,3 dias para fêmeas mantidas à temperatura constante de 26°C. Na literatura há também registros de períodos entre 11 e 12 dias para a pré-postura e 30 e 70 dias para a incubação dos ovos (FLECHTMANN, 1977) e ainda, 9 a 20 dias para a pré-postura e 37 a 154 dias para a incubação dos ovos, dependendo das condições ambientais (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1981).

Foram realizadas 34 infestações com larvas em 31 coelhos. O ingurgitamento larval se efetuou entre quatro e seis dias, com uma média de cinco dias. O período compreendido entre o desprendimento da metalarva e o término da ecdise larva/ninfa foi de $11,29 \pm 1,19$ dias, oscilando entre nove e 14 dias. A análise de variância a nível de significância de 5% revelou que não houve diferenças significativas quanto ao período de ecdise larva/ninfa relacionado ao sexo nem à cor da pelagem do coelho utilizado para ingurgitamento larval. HOOKER *et alii* (1912) relataram que o ingurgitamento larval oscilou entre três e sete dias, com uma maior quantidade de larvas levando quatro a cinco dias para completar o ingurgitamento. São relatados ainda, períodos de três a seis dias para o ingurgitamento de larvas e 18 a 26 dias para a ecdise larva/ninfa (FLECHTMANN, 1977). OLIVIERI & SERRA FREIRE (1984a), analisando o ciclo biológico do *A. cajennense* a partir de amostra F₁, obtida de fêmeas coletadas de bovinos, registraram períodos de três a oito dias para ingurgitamento larval e 16,48 dias para o término da ecdise larva/ninfa, sob condições controladas.

Foram realizadas 28 infestações com ninfas em 20 coelhos. O ingurgitamento ninfal foi efetuado entre três e cinco dias, com uma maior quantidade de ninfas necessitando de cinco

Quadro 1 - Ensaio metodológico do desenvolvimento do ciclo biológico do *Amblyomma cajennense* realizado em laboratório.

Fase evolutiva/condições de realização	Eventos	Dia
Fim da fase parasitária, sob condições ambientais	Coleta de fêmeas ingurgitadas, limpeza, pesagem e acondicionamento em placas de Petri	0
Desenvolvimento da fase não parasitária, em condições de laboratório	Início de postura Pesagem de ovos e transferência para seringas Início de eclosão	+5 +25 +38
Fase parasitária em coelhos	1ª infestação em coelhos. Material infestante: larvas Recolhimento de metalarvas, contagem e transferência para seringas	+43 +48
Fase não parasitária, em condições de laboratório	Obtenção de ninfas	+60
Fase parasitária em coelhos	2ª infestação em coelhos. Material infestante: ninfas Recolhimento de metaninfas, contagem e transferência para seringas	+63 +68
Fase não parasitária, em condições de laboratório	Obtenção de adultos jovens, machos e fêmeas	+82
Fase parasitária em equinos	Infestação em equinos Material infestante: casais de adultos jovens Recolhimento de fêmeas ingurgitadas	+85 +93 a +95

dias para completar o processo de ingurgitamento. O tempo transcorrido entre o desprendimento das metaninfas e o término da ecdise ninfal/adulto foi de $13,43 \pm 0,50$ dias. Do mesmo modo que para a ecdise larval, esse período não foi afetado pelo sexo nem pela cor da pelagem do coelho utilizado para ingurgitamento ninfal. SMITH (1975) verificou que, sob condições de laboratório, a ecdise ninfal/adulto levou 14 a 18 dias para se completar. Observaram-se ainda, relatos de períodos de cinco a sete dias para ingurgitamento ninfal e 23 a 25 dias para a ecdise ninfal/adulto (FLECHTMANN, 1977). OLIVIERI & SERRA FREIRE (1984b), em experimento com metodologia semelhante à do presente trabalho, registraram períodos de $5,31 \pm 0,18$ dias em média, para o ingurgitamento ninfal em coelhos e $19,57 \pm 2,16$ dias para a ecdise ninfal/adulto.

Foram efetuadas 42 infestações com casais de adultos jovens de *A. cajennense* em seis equinos. O tempo de ingurgitamento das fêmeas oscilou entre oito e dez dias, período idêntico ao citado por FLECHTMANN (1977). CUNHA (1978), ao efetuar infestações experimentais com adultos de *A. cajennense* em coelhos, obteve um período de oito a 30 dias para o completo ingurgitamento. Há, ainda, relatos de período entre sete e 12 dias para o ingurgitamento de adultos de *A. cajennense* (UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, 1981). A partir dos parâmetros obtidos e da metodologia empregada,

pôde-se estabelecer um esquema para reprodução do ciclo biológico do *A. cajennense* em laboratório (Quadro 1).

Descrição dos procedimentos utilizados para reprodução do ciclo biológico do *Amblyomma cajennense* em laboratório:

a. Procedimento para obtenção de larvas: no dia zero era realizada a coleta de fêmeas ingurgitadas, limpeza, pesagem e acondicionamento das mesmas em placas de Petri, mantidas em BOD sob condições controladas (temperatura de 27°C, umidade relativa superior a 70% e 12 horas de fotofase). Em torno de cinco dias após a coleta era iniciada a postura. Vinte dias após o início da postura, ou seja, em torno do dia +25, realizava-se a pesagem dos ovos e transferência para seringas plásticas vedadas com bucha de algodão. Cada seringa continha 0,2 a 0,3 g de postura ou 3000 a 5000 ovos, baseando-se que em 1g de postura há cerca de 16400 ovos (PRATA *et alii*, 1995d). Por volta do dia +38 era iniciada a eclosão dos ovos. Adotando-se essa metodologia, foi obtido um percentual de eclosão em torno de 95% (PRATA *et alii*, 1995b).

b. Fase larval: por volta do dia +43 era realizada a primeira infestação em coelhos, segundo a técnica de NEITZ *et alii* (1971) modificada. Cinco dias após a infestação eram recolhidas as metalarvas, que eram contadas e transferidas para seringas, mantidas em BOD por aproximadamente 12 dias, para efetuar ecdise. Em estudos anteriores, aproximadamente 46% do total de larvas infestantes foram recolhidas como metalarvas (PRATA & SANAVRIA, 1995). Destas, por volta de 95% realizaram ecdise completa, obtendo-se ninfas (PRATA *et alii*, 1995b).

c. Fase ninfal: em torno do dia +63 era realizada nova infestação em coelhos, desta vez utilizando-se ninfas. Em estudos anteriores foram utilizados os mesmos animais que haviam sido infestados com larvas, obtendo-se resultados satisfatórios no que concerne ao percentual de recuperação de formas ingurgitadas (PRATA & SANAVRIA, 1995). Cada coelho era infestado com até 1500 ninfas. Cinco dias após a infestação eram recolhidas as metaninfas, que eram contadas e transferidas para seringas plásticas, mantidas em BOD por aproximadamente 14 dias para efetuar ecdise. Em pesquisas anteriores, do total de ninfas infestantes, em torno de 50% foram recolhidas como metaninfas (PRATA & SANAVRIA, 1995). Destas, aproximadamente 95% realizaram ecdise completa, obtendo-se adultos jovens, machos e fêmeas, na proporção de 1:1 (PRATA *et alii*, 1995c).

d. Fase adulta: em torno do dia +85 era realizada infestação em equinos, utilizando-se casais de adultos jovens de *A. cajennense*. Oito a dez dias após a infestação recolhiam-se as fêmeas ingurgitadas. Em pesquisas anteriores, aproximadamente 40% do total de fêmeas infestantes foram recolhidas como teleóginas ingurgitadas (PRATA *et alii*, 1995a).

A partir da metodologia descrita, verificou-se que o ciclo biológico do *A. cajennense* em laboratório levou aproximadamente 93 a 95 dias para se completar, mantendo-se os estágios não parasitários sob condições controladas (temperatura de 27°C, umidade relativa superior a 70% e 12 h de fotofase) e realizando-se infestações experimentais com larvas a partir de cinco dias e ninfas e adultos a partir de três dias de idade.

SUMMARY

Aiming the development of adequate methodology for the laboratory colonization of *Amblyomma cajennense*, thirty-four larval and twenty-eight-nymph infestations were made by using thirty-one and twenty rabbits, respectively. Forty-two experimental infestations with the obtained young adults were made in six horses. The preoviposition and the egg incubation periods were 5.30 ± 1.02 days and 33.04 ± 1.69 days, respectively. The time elapsed between the detachment of moulting-larvae and the final ecdysis to nymphs was 11.29 ± 1.19 days; from the detachment of moulting -nymphs to the final ecdysis of adults it was 13.43 ± 0.50 days. The observed periods during the parasitic stages were: five days for both larval and nymph engorgements and eight to ten days for adults. Under the conditions of the study the life-cycle of *A. cajennense* took 93-95 days.

KEY WORDS: Biological cycle, *Amblyomma cajennense*, ixodidae, laboratory.

REFERÊNCIAS

- CUNHA, D.W. da. (1978). *Estudos da toxicidade de alguns carrapatos comumente encontrados no Brasil (Acarina: Ixodidae)*. Tese de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ, 89 p.
- DRUMMOND, R. O. & WHETSTONE, T. M. (1975). Oviposition of the Cayenne Tick, *Amblyomma cajennense* (F.), in the Laboratory. *Annals of the Entomological Society of America*, 68(2):214-216.
- FLECHTMANN, C. H. W. (1977). *Ácaros de Importância Médico Veterinária*. São Paulo, Liv. Nobel, 2ª edição, 192 p.
- HOOKE, W. A.; BISHOPP, F. C. & WOOD, H. P. (1912). *The Life History and Bionomics of Some North American Ticks*. U.S. Dept. Agricult., Bur. Entomol. Plant. Quar. Bull. n. 106, Washington, D.C., 239 p.
- NEITZ, W. O.; BOUGHTON, F. & WALTERS, H. S. (1971). Laboratory investigations on the life-cycle of the karoo paralysis tick (*Ixodes rubicundus* Neumann, 1904). *Onderstepoort Journal Veterinary Research*, 38(3):215-224.
- OLIVIERI, J. A. & SERRA FREIRE, N. M. (1984a). Estádio larval do ciclo biológico de *Amblyomma cajennense*. *Arquivos da Universidade Federal Rural Rio de Janeiro*, 7:139-147.
- OLIVIERI, J. A. & SERRA FREIRE, N. M. (1984b). Estádio ninfal do ciclo biológico de *Amblyomma cajennense*. *Arquivos da Universidade Federal Rural Rio de Janeiro*, 7(2):149-156.
- PRATA, M. C. A. & SANAVRIA, A. (1995). Alterações determinadas por larvas e ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em orelhas de coelhos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Anais, 4(2):62, supl. 1, Resumo.
- PRATA, M. C. A.; MORAIS, M. C.; ALONSO, L. S. & SANAVRIA, A. (1995a). Determinação de alguns parâmetros biológicos de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em infestação artificial de equinos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Anais, Anais, 4(2):49, supl. 1, Resumo.
- PRATA, M. C. A.; SANAVRIA, A. & ALONSO, L. S. (1995b). Parâmetros biológicos do estágio larval de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em coelhos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Anais, Anais, 4(2):59, supl. 1, Resumo.
- PRATA, M. C. A.; ALONSO, L. S. & SANAVRIA, A. (1995c). Parâmetros biológicos do estágio ninfal de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) em coelhos. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Anais, Anais, 4(2):60, supl. 1, Resumo.
- PRATA, M. C. A.; DAEMON, E. & SANAVRIA, A. (1995d). Determinação do número de ovos por grama de postura de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae). *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, Anais, Anais, 4(2):64, supl. 1, Resumo.
- ROIR, C.J. (1909) Estudos sobre Ixodidae do Brasil. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro 200 p
- SMITH, M. W. (1975). Some aspects of the ecology and life cycle of *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) in Trinidad and their influence on tick control measures. *Ann. Tropical Medical Parasitology*, 69:121-129.
- TRAVASSOS, J. & VALLEJO-FREIRE, A. 1944. Criação artificial de *Amblyomma cajennense* para o preparo de vacina contra a febre maculosa. *Memórias do Instituto Butantan*, 18:145-235
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. (1981). *Ticks of Veterinary Importance*. Animal and Plant Health Inspection Service. Agriculture Handbook, n. 485, 122 p. U.S. Government Printing Office.

(Received 15 March 1996, Accepted 25 June 1996)