

PATOGENICIDADE *IN VITRO* DE *Metarhizium anisopliae* S.L. SOBRE LARVAS E NINFAS DE *Ornithodoros mimon* (ACARI: ARGASIDAE)*

Wendell Marcelo de Souza Perinotto¹, Gabriel Alves Landulfo², Mariana Guedes Camargo², Patricia Silva Gôlo², Isabele da Costa Angelo³, Simone Quinelato¹ Darci Moraes Barros-Battesti⁴ e Vânia Rita Elias Pinheiro Bittencourt⁵⁺

ABSTRACT. Perinotto W.M.S., Landulfo G.A., Camargo M.G., Golo P.S., Angelo I.C., Quinelato S., Barros-Batesti D.M., Bittencourt V.R.E.P. [*In vitro* pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* s.l. on larvae and nymphs of *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae).] Patogenicidade *in vitro* de *Metarhizium anisopliae* s.l. sobre larvas e ninfas de *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae). *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*, 35(Supl.2):43-47, 2013. Departamento de Parasitologia Animal, IV, Anexo 1, Universidade Federal Rural do Estado do Rio de Janeiro, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: vaniabit@ufrj.br

Ornithodoros mimon is an argasid tick common on Chiroptera in the Neotropical region, which also bites humans aggressively and it is often found in human habitations. Currently, there are no control methods for argasid ticks. However, previous works already reported the susceptibility of species of Argasidae to entomopathogenic fungi. Thus, the present study aimed to determine the *in vitro* pathogenicity of *Metarhizium anisopliae* s.l. on larvae and nymphs first instar of *O. mimon*. The biological parameter evaluated was the percentage of mortality of the larvae and nymphs. The results showed 80% larval mortality in the concentration of 10⁷ conidia/mL and 91.4% for larvae subjected to a concentration of 10⁸ conidia/mL. The engorged nymphs immersed in suspensions 10⁷ conidia/ml were more susceptible to fungus than unfed nymphs. In the suspensions 10⁸ conidia/mL no difference was observed, because the average percentage mortality was above 95% for engorged and unfed nymphs. Based on the results obtained, we concluded that immature stages of *O. mimon* are susceptible to *M. anisopliae* s.l.

KEY WORDS. Argasidae, biological control, entomopathogenic fungi.

RESUMO. *Ornithodoros mimon* é um carrapato argasídeo comum a Chiroptera na região Neotropical, mas bastante agressivos aos humanos, pois a espécie é frequentemente encontrada em habitações humanas. Atualmente, não foram estabelecidos métodos de controle. Porém, trabalhos prévios já

demonstraram a susceptibilidade de outros argasídeos a fungos entomopatogênicos. Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo verificar a patogenicidade *in vitro* de *Metarhizium anisopliae* s.l. sobre larvas e ninfas de primeiro ínstar ingurgitadas e não ingurgitadas de *O. mimon*. O parâmetro

* Recebido em 10 de outubro de 2013.

Aceito para publicação em 6 de novembro de 2013.

¹ Departamento de Parasitologia Animal (DPA), Instituto de Veterinária (IV), Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ), BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970, Brasil. E-mail: wendellufrj@hotmail.com e squinelato@gmail.com

² Médico-veterinário, MSc. Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, UFRRJ, BR 465 Km 7, Seropédica, RJ 23897-970. E-mail: gabriel_alves_landulfo@hotmail.com; mari_gc6@yahoo.com.br; patricia_golo@yahoo.com.br

³ Médica-veterinária, DSc. Departamento de Parasitologia, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG 31270-901, Brasil. E-mail: isabeleangelo@yahoo.com.br

⁴ Bióloga, DSc. Instituto Butantan, Laboratório Especial de Coleções Zoológicas, Av. Vital Brasil 1500, São Paulo, SP 05503-900, Brasil. E-mail: dbattesti@butantan.gov.br

⁵ Médica-veterinária, PhD. DPA, IV, Anexo 1, UFRRJ, Seropédica, RJ, 23897-970. +Author for correspondence, E-mail: vaniabit@ufrj.br - bolsista CNPq.

avaliado foi o percentual de mortalidade das larvas e ninfas. Como resultados, observaram-se 80% de mortalidade do estágio larval na concentração de 10^7 conídios/mL e 91,4% para larvas submetidas à concentração de 10^8 conídios/mL. As ninfas ingurgitadas imersas na concentração 10^7 conídios/mL foram mais susceptíveis ao fungo que as ninfas não ingurgitadas. Com relação à concentração 10^8 conídios/mL não foi observada diferença significativa, uma vez que se obteve um percentual médio de mortalidade acima de 95% tanto para as ninfas alimentadas como para as não alimentadas. Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que os estágios de *O. mimon* estudados são susceptíveis a *M. anisopliae*.

PALAVRAS-CHAVE. Argasidae, controle biológico, fungo entomopatogênico.

INTRODUÇÃO

Ornithodoros mimon é um carrapato argasídeo parasito de Chiroptera, mas bastante agressivo aos humanos, que ocorre na Bolívia, Uruguai, Argentina e Brasil (Venzal et al. 2003, 2004, Dantas-Torres et al. 2009). No Brasil, há relatos de parasitismo em humanos (Barros-Battesti et al. 2011). Recentemente, os estágios adultos e ninfais foram descritos, a larva redescrita e o ciclo de vida do carrapato argasídeo elucidado em laboratório (Barros-Battesti et al. 2011, Landulfo et al. 2012, 2013). O papel de *O. mimon* como transmissor de patógenos é ainda desconhecido, porém ocasiona intensas lesões ou injúrias no homem decorrente da picada. Além disso, a espécie é constantemente encontrada em habitações e residências humanas (Barros-Battesti et al. 2011).

Até o presente momento, ainda não foram estabelecidos protocolos específicos de controle para a espécie. Entretanto, pela proximidade de *O. mimon* com os seres humanos, a escolha do método de controle deve ser realizada de maneira segura, para evitar riscos de intoxicação. Nesta perspectiva, um método que vem sendo amplamente estudado para o controle de carrapatos é o biológico, usando fungos entomopatogênicos (Bittencourt et al. 1992, Fernandes & Bittencourt 2008). Estes microrganismos já foram testados e não são nocivos a saúde humana, exceto em pessoas imunossuprimidas (Zimmermann 2007). Dentre os fungos estudados no controle de carrapatos, *Metarhizium anisopliae sensu lato* (s.l.) e *Beauveria bassiana* (s.l.) merecem destaque, pois já demonstraram atividade acaricida às diversas espécies de carrapatos, principalmente aos ixo-

dídeos (Fernandes & Bittencourt 2008). Outro fator importante é a ocorrência natural destes fungos em carrapatos, como já foi observado por Fernandes et al. (2004). Com relação à utilização deste agente biológico no controle de argasídeos, poucos são os relatos encontrados na literatura.

Assim, o presente trabalho tem como objetivo verificar a susceptibilidade de larvas e ninfas de *O. mimon* ao fungo entomopatogênico, *M. anisopliae* s.l em condições laboratoriais.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e preparo da suspensão de *M. anisopliae* s.l.

O isolado ESALQ 959 de *M. anisopliae* s.l. utilizado neste estudo foi cedido pelo Departamento de Entomologia da Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz da Universidade de São Paulo (USP), Brasil. Para a manutenção no laboratório, o fungo foi cultivado em meio Batata, Dextrose e Ágar (BDA) (Himedia, Mumbai, Índia) e mantido à temperatura $25^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa (UR) $\geq 80\%$ por 15 dias. Para o preparo das suspensões fúngicas, os conídios foram suspensos em solução de água destilada estéril e Tween 80 a 0,01%, quantificados em câmara de Neubauer em microscópio óptico e ajustadas nas concentrações de 10^7 e 10^8 conídios/mL.

Viabilidade dos conídios

Uma alíquota da suspensão 10^8 conídios/mL de *M. anisopliae* s.l. foi depositada em placa de Petri contendo meio BDA e incubada sob temperatura de $25 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa $\geq 80\%$ durante 24 horas. O cálculo da germinação dos conídios foi realizado segundo Alves (1998).

Obtenção dos carrapatos

As larvas e ninfas de primeiro ínstar (N1) de *O. mimon* utilizadas no estudo, foram provenientes da colônia de argasídeos do Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan, São Paulo, Brasil. A colônia iniciou-se com a coleta de ninfas e adultos de *O. mimon* do teto de uma residência no município de Araraquara, São Paulo, Brasil (Landulfo et al., 2012).

Para testar a susceptibilidade de *O. mimon* após a alimentação, algumas ninfas de primeiro instar (N 1) foram alimentadas em coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) mestiços (Califórnia X Nova Zelândia) de ambos os sexos, sem contato prévio com carrapatos e carrapaticidas. A utilização dos coelhos para a alimentação artificial dos carrapatos foi permitida pela Comissão de Ética na Pesquisa da UFRRJ / COMEP-UFRRJ, cujo número de protocolo é 140/2011.

Infecção *in vitro* de *O. mimon* com *M. anisopliae* s.l.

Para realização do bioensaio, foram formados três grupos: controle aquoso (solução de água destilada estéril e Tween 80 a 0,01 %) e suspensões conidiais de *M. anisopliae* s.l. nas concentrações de 10^7 e 10^8 conídios/mL. No experimento de susceptibilidade de larvas ao fungo, foram utilizados 70 espécimes por grupo, distribuídos em sete frascos 10 larvas em cada. No ensaio de susceptibilidade de N1, foram utilizados 10 espécimes por grupo (5 frascos com 2 ninfas em cada), tanto de não ingurgitadas quanto ingurgitadas.

As larvas e ninfas foram imersas em um mL de suspensão conidial e/ou solução de controle por três minutos, em seguida os frascos foram invertidos para absorção do excesso de líquido pelo algodão. Posteriormente, os carrapatos foram acondicionados em estufas B.O.D. a 27°C ± 1°C e 90% ± 10°C de UR para avaliar o efeito das soluções fúngicas sobre os estágios imaturos de *O. mimon*. Observações diárias foram realizadas com o objetivo de registrar o percentual de mortalidade dos espécimes tratados.

Análise estatística

Os dados foram analisados estatisticamente conforme a normalidade, ou seja, para os resultados com distribuição normal, foram empregados testes paramétricos, como ANOVA. Teste não-paramétrico, como Kruskal-Wallis foi implicado na análise dos dados de distribuição não normal ou livre. A análise estatística foi feita com o auxílio do programa estático Bioestat 5.0.

RESULTADOS

A análise do percentual de germinação do isolado ESALQ 959 de *M. anisopliae* s.l. 24 horas após a elaboração da suspensão fúngica, demonstrou que 100% dos conídios haviam germinado sob temperatura de 25 ± 1°C e umidade relativa ≥ 80%, evidenciando que os fungos estavam aptos a serem utilizados no experimento.

No bioensaio com larvas de *O. mimon*, pode-se observar que ambas concentrações conidiais de *M. anisopliae* s.l. foram capazes de provocar altos percentuais de mortalidade, tanto que não houve diferença significativa entre as concentrações ($p > 0,05$), alcançando índices de mortalidade de 80 e 91,4% nas concentrações 10⁷ e 10⁸ conídios/mL, respectivamente. Entretanto, quando foram comparados ao controle, cujo percentual de mortalidade foi de 8,6%, houve diferença significativa ($p < 0,05$), como pode ser observado na Tabela 1. O período de mortalidade as larvas tratadas variou entre 4 a 10 dias (Figura 1). Os maiores índices de mortalidade foram registrados no 6° e no 7° dia pós-tratamento dos carrapatos (Figura 1).

Tabela 1. Percentagem média de mortalidade de larvas e ninfas de primeiro instar de *Ornithodoros mimon* expostas a diferentes concentrações conidiais do isolado ESALQ 959 de *Metarhizium anisopliae* s.l.

Estádio	% de Mortalidade(*)		
	Grupo controle	Grupo Ma 959 107	Grupo Ma 959 108
Larva	6/70 (8.6%) ^a	56/70 (80%) ^b	64/70 (91.4%) ^b
N1 ingurgitada	0/10 (0%) ^a	8/10 (80%) ^b	9/10 (100%) ^b
N1 não ingurgitada	0/10 (0%) ^a	3/10 (30%) ^a	10/10 (100%) ^b

(*) Médias seguidas de letras iguais na mesma linha não diferem entre si em nível de 5% de significância ($p \geq 0,05$).

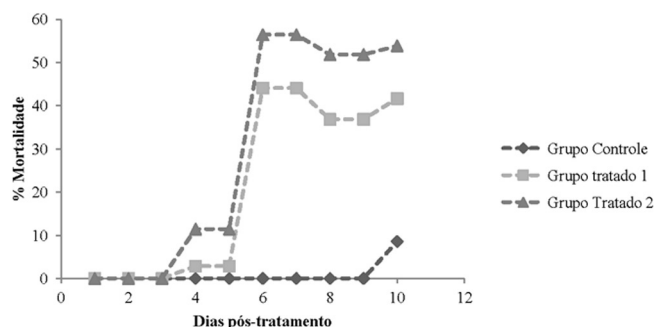


Figura 1. A variação da porcentagem de mortalidade de larvas de *Ornithodoros mimon* infectadas com *Metarhizium anisopliae* s.l. durante o período de dias pós-tratamento. Grupo Tratado 1= Grupo ESALQ 959 10⁷; Grupo Tratado 2 = Grupo ESALQ 959 10⁸.

No ensaio biológico com ninfas de *O. mimon*, foi observado que as N1 ingurgitadas foram mais susceptíveis a *M. anisopliae* s.l. que as ninfas não ingurgitadas para concentração de 10⁷ conídios/mL, apresentando percentagens médias de 80 e 30% de mortalidade, respectivamente. Porém, na concentração de 10⁸ conídios/mL tanto as ninfas ingurgitadas como as não ingurgitadas tiveram 100% de mortalidade. Já as ninfas do grupo controle permaneceram vivas durante todo o experimento (Tabela 1). Comparando estatisticamente os tratamentos de ninfas, foi observada diferença significativa ($p < 0,05$) entre o grupo controle e os grupos tratados (ESALQ 959 10⁷ e 10⁸ conídios/mL) para as N1 ingurgitadas. Porém, no grupo não ingurgitado, a exposição a suspensão conidial na concentração de 10⁷ conídios/ml não diferiu estatisticamente do controle, já a concentração de Ma 10⁸ conídios/mL apresentou um percentual significativamente maior (Tabela 1). O único registro de mortalidade das ninfas ocorreu no 4° dia pós-tratamento.

DISCUSSÃO

O controle biológico de argasídeos utilizando fungos entomopatogênicos é recente, tendo como pioneiros os pesquisadores Sewify & Habib (2001). Os autores verificaram a susceptibilidade de alguns estágios evolutivos de *Argas persicus* (Oken, 1818) a duas espécies de fungos entomopatogênicos, *M. anisopliae* e *B. bassiana*, sendo *M. anisopliae* mais virulenta que *B. bassiana*. Com relação ao gênero *Ornithodoros*, Zabalagoeazcoa et al. (2008) analisaram o efeito da patogenicidade de diferentes cepas de fungos entomopatogênicos em duas espécies, *Ornithodoros erraticus* (Lucas, 1849) e *Ornithodoros moubata* (Murray, 1877), e verificaram

que ambas foram susceptíveis aos fungos. Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram a susceptibilidade de larvas e ninfas de *O. mimon* ao fungo entomopatogênico *M. anisopliae* s.l., pois em ambos estágios foram registrados altos percentuais de mortalidade. Porém, há de se destacar que a concentração de 10^8 conídios/mL foi a que promoveu os melhores resultados tanto para larvas como para as ninfas. Isto corrobora com os achados de Sewify & Habib (2001), Pourseyed et al. (2010) e Travassoli et al. (2012). Nestes trabalhos os autores verificaram os maiores efeitos de fungos entomopatogênicos em carrapatos da família Argasidae nas maiores concentrações testadas, concluindo que a patogenicidade dos fungos sobre estes carrapatos é dose dependente.

Um dos entraves da utilização de fungos entomopatogênicos no controle de carrapatos é o tempo que estes microrganismos levam para matar o hospedeiro. Neste contexto, Pourseyed et al. (2010) ao verificarem o efeito de diferentes cepas de *M. anisopliae* à larvas de *Argas persicus* Oken, 1818 observaram altos percentuais de mortalidade a partir do 4º dia pós-tratamento. Com relação a espécies do gênero *Ornithodoros*, Travassoli et al. (2012) observaram mortalidade de larvas de *Ornithodoros lahorensis* Neumann, 1908 tratadas com diferentes cepas de *M. anisopliae* com apenas três dias pós-tratamento. Os resultados encontrados por Pourseyed et al. (2010) e Travassoli et al. (2012) corroboram com os resultados observados no presente estudo, pois ao 4º dia pós tratamento foram obtidos altos percentuais de mortalidade. De acordo com Arruda et al. (2005) *M. anisopliae* leva mais ou menos 72 horas para colonizar o carrapato ixodídeo *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) e, em média, seis dias para matá-lo. Provavelmente, em argasídeos esse tempo é menor devido à composição do idiossoma destes carrapatos, que é menos quitinizado, facilitando desta forma a infecção fúngica.

Outro fator analisado neste estudo foi a diferença na susceptibilidade conforme o estado nutricional (alimentado e não alimentado) do carrapato. Pode-se observar que as ninfas alimentadas foram mais sensíveis ao fungo *M. anisopliae* s.l. do que as não alimentadas, pois mesmo na menor concentração conidial, tiveram maiores percentuais de mortalidade. Resultados similares foram obtidos por Sewify & Habib (2001) e Pourseyed et al. (2010), ao verificarem o efeito de *M. anisopliae* em fêmeas de carrapatos argasídeos ingurgitadas e não ingurgita-

das e concluíram que a diferença de susceptibilidade entre carrapatos alimentados e não alimentados, está associada às aberturas naturais do idiossoma e gnatossoma dos argasídeos, como dobras tegumentais, espiráculos e peças bucais. Estas aberturas ficam mais fáceis de serem penetradas nos espécimes ingurgitados, facilitando a infecção do fungo entomopatogênico no artrópode.

CONCLUSÃO

Desta maneira, com base nos resultados obtidos no presente estudo conclui-se que o fungo entomopatogênico *M. anisopliae* s.l. tem atividade acaricida sobre os estágios imaturos de *O. mimon*, e de rápida ação, pois as observações de mortalidade ocorreram em curtos períodos de pós-tratamento dos espécies. Com isso, acreditamos que futuramente este método de controle biológico possa ser aplicado nesta espécie de argasídeo.

Agradecimentos. À FAPERJ, ao CNPq e à CAPES, pelo financiamento desta pesquisa e ao funcionário Edson Maria Torres da Câmara Municipal de Araraquara, SP que gentilmente nos ajudou na coleta dos carrapatos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves S.B. *Controle Microbiano de Insetos*. 2ª Ed. FEALQ, Piracicaba, 1998. 1163p.
- Arruda W., Lübeck I., Schrank A. & Vainstein M.H. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. *Exp. App. Acarol.*, 37:231-244, 2005.
- Barros-Battesti D.M., Landulfo G., Onofrio V.C., Faccini J.L.H., Marcili A., Nieri-Bastos F., Venzal J. & Labruna M. *Carios mimon* (Acari: Argasidae): description of adults and redescription of larva. *Exp. App. Acarol.*, 54:93-104, 2011.
- Bittencourt V.R.E.P., Massard C.L. & Lima A.F. Uso do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, no controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Arq. Univ. Rur. Rio de J.*, 15:197-202, 1992.
- Dantas-Torres F., Onofrio V.C & Barros-Battesti D.M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. *Syst. Appl. Acarol.*, 14:30-46, 2009.
- Fernandes E.K.K. & Bittencourt V.R.E.P. Entomopathogenic fungi against South American tick species. *Exp. App. Acarol.*, 64:71-93, 2008.
- Fernandes E.K.K., Costa G.L., Moraes A.M.L. & Bittencourt V.R.E.P. Entomopathogenic potential of *Metarhizium anisopliae* isolated from engorged females and tested in eggs and larvae of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Bas. Microbiol.*, 44:27-274, 2004.
- Landulfo G.A., Pevidor L.V., Sampaio J.S., Luz H.R., Onofrio V.C., Faccini J.L.H & Barros-Battesti D.M. Life cycle of *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) under laboratory conditions. *Exp. App. Acarol.*, 58:69-80, 2012.
- Landulfo G.A., Pevidor L.V., Luz H.R., Faccini J.L.H., Nunes

- P.H. & Barros-Battesti D.M. Description of nymphal instars of *Ornithodoros mimon* Kohls, Clifford & Jones, 1969 (Acari: Argasidae). *Zootaxa*, 3710:179-191, 2013.
- Pourseyed S.H., Tavassoli M., Bernousi I. & Mardani K. *Metarhizium anisopliae* (Ascomycota: Hypocreales): An effective alternative to chemical acaricides against different developmental stages of fowl tick *Argas persicus* (Acari: Argasidae). *Vet. Parasitol.*, 172:305-310, 2010.
- Sewify G.H & Habib S.M. Biological control of the tick fowl *Argas persicargas persicus* by the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Anz. Schadlingskunde/ J. Pest. Sci.*, 74:121-123, 2001.
- Tavassoli M., Malekifard F., Soleimanzadeh A., Pourseyed H.S., Bernousi I & Mardani K. Susceptibility of different life stages of *Ornithodoros lahorensis* to entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana*. *Parasitol Res.*, 4:1779-83, 2012.
- Venzal J.M., Autino A.G., Nava S & Guglielmone A.A. *Ornithodoros mimon* Kohls, Clifford & Jones, 1969 (Acari: Argasidae) on Argentinean bats, and new records from Uruguay. *Syst. Appl. Acarol.*, 9:37-39, 2004.
- Venzal J.M., González E.M., Capellino D., Estrada-Peña A & Guglielmone A.A. First record of *Amblyomma triste* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) and new records of *Ornithodoros mimon* Kohls, Clifford & Jones, 1969 (Acari: Argasidae) from Neotropical bats. *Syst. Appl. Acarol.* 8:93-96, 2003.
- Zabalgogezcoa I., Oleaga A. & Pérez-Sánchez R. Pathogenicity of endophytic entomopathogenic fungi to *Ornithodoros erraticus* and *Ornithodoros moubata* (Acari: Argasidae). *Vet. Parasitol.*, 158:336-343, 2008.
- Zimmermann G.G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Bio. Sci. Tech.*, 17:879-920, 2007.