

Os carrapatos estão amplamente distribuídos no Brasil, com 67 espécies descritas até o momento. Apesar de amplamente estudados, esses parasitas estão se mantendo na natureza – nos setores produtivos e animais de companhia –, transmitindo patógenos e mantendo agentes patogênicos no meio ambiente, além de causar prejuízos à cadeia produtiva pecuária. A crise existente hoje no controle desses agentes deve-se ao fato de esses animais terem desenvolvido resistência aos produtos utilizados em seu controle. Neste livro, especialistas apresentam os protocolos e técnicas para estudo de carrapatos para que os técnicos possam ampliar e aprofundar o embasamento para a tomada de decisões e para a formulação de políticas públicas visando o controle deste ectoparasito.

Patrocínio:



Biogénesis Bagó



CGPE 12528

Ministério da  
Agricultura, Pecuária  
e Abastecimento

GOVERNO FEDERAL  
**BRASIL**  
PÁTRIA EDUCADORA

**Embrapa**

# CARRAPATOS

PROTOCOLOS E TÉCNICAS PARA ESTUDO



Editores Técnicos

**Renato Andreotti**  
**Wilson Werner Koller**  
**Marcos Valério Garcia**

**Embrapa**

CARRAPATOS  
PROTOCOLOS E TÉCNICAS PARA ESTUDO

# CARRAPATOS

PROTOCOLOS E TÉCNICAS PARA ESTUDO



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária  
Embrapa Gado de Corte  
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

# CARRAPATOS

PROTÓCOLOS E TÉCNICAS PARA ESTUDO

Editores Técnicos

**Renato Andreotti  
Wilson Werner Koller  
Marcos Valério Garcia**

**Embrapa**  
Brasília, DF  
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

**Embrapa Gado de Corte**

Avenida Rádio Maia, 830 – Zona Rural

CEP 79106-550 - Campo Grande, MS

Telefone: (67) 3368.2000

Fax: (67) 3368.2150

www.embrapa.br/fale-conosco/sac

**Unidade responsável pelo conteúdo e pela edição**

Embrapa Gado de Corte

**Comitê Local de Publicações da Embrapa Gado de Corte**

Presidente: *Ronney Robson Mamede*

Secretário executivo: *Rodrigo Carvalho Alva*

Membros:

*Andréa Alves do Egito*

*Davi José Bungenstab*

*Guilherme Cunha Malafaia*

*Lucimara Chiari*

*Roberto Giolo de Almeida*

Supervisão editorial: *Rodrigo Carvalho Alva*

Revisão de texto: *Wilson Werner Koller, Rodrigo Carvalho Alva*

Normalização bibliográfica: *Wilson Werner Koller*

Projeto gráfico, capa, editoração eletrônica e tratamento das ilustrações: *Rosane Guedes*

**1ª edição**

1ª impressão (2016): 1.000 exemplares

**Todos os direitos reservados.**

A reprodução não autorizada desta publicação, no todo ou em parte,  
constitui violação dos direitos autorais (Lei nº 9.610).

**Direitos Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Embrapa Gado de Corte

---

Carrapatos: protocolos e técnicas para estudo / editores técnicos, Renato Andreotti,  
Wilson Werner Koller, Marcos Valério Garcia. – Brasília, DF : Embrapa, 2016.  
240 p. : il. color. ; 17 cm x 24 cm.

ISBN: 978-85-7035-259-0

1. Carrapato – Brasil. I. Andreotti, Renato, ed. II. Koller, Wilson Werner, ed. III.  
Garcia, Marcos Valério. IV. Embrapa Gado de Corte.

CDD 22.ed. 595.42

---

© Embrapa 2013



## Editores técnicos

### **Renato Andreotti**

Médico-veterinário, Doutor em Biologia Molecular, Pós-doutorado na ARS/USDA, Kerrville, Texas, Estados Unidos, Pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

### **Wilson Werner Koller**

Biólogo, Doutor em Ciências Biológicas – Entomologia, Pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

### **Marcos Valério Garcia**

Biólogo, Doutor Microbiologia Agropecuária, Pós-doutorando CNPq/Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS



## Autores

### **Ana Maria Sastre Sacco**

Médica-veterinária, Doutora em Parasitologia, Pesquisadora aposentada da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS

### **André de Abreu Rangel Aguirre**

Médico-veterinário, Doutorando em Doenças Infecciosas e Parasitárias/UFMS, Campo Grande, MS

### **Bárbara Guimarães Csordas**

Bióloga, Doutoranda em Doenças Infecciosas e Parasitárias/UFMS, Bolsista CNPq/Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

### **Carlos Alberto do Nascimento Ramos**

Médico-veterinário, Doutor em Medicina Veterinária, Professor Adjunto da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, campus de Campo Grande, MS

### **Cláudia Cristina Gulias Gomes**

Médica-veterinária, Doutora em Parasitologia, Pós-doutorado em Ecologia Química de Artrópodes Vetores, Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS

### **Emanuelle Baldo Gaspar**

Médica-veterinária, Doutora em Microbiologia e Imunologia, Pesquisadora da Embrapa Pecuária Sul, Bagé, RS

### **Fabiane Siqueira**

Bióloga, Doutora em Genética, Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

**Fábio Pereira Leivas Leite**

Médico-veterinário, Ph.D. em Ciências Veterinárias, Pós-doutorado na Universidade de Idaho nos Estados Unidos, Docente da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS

**Fernando de Almeida Borges**

Médico-veterinário, Doutor em Medicina Veterinária, Docente da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS

**Flávio Ribeiro de Araújo**

Médico-veterinário, Doutor em Imunologia, Pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

**Isabella Maiumi Zaidan Blecha**

Bióloga, Doutoranda no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal – FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS

**Jacqueline Cavalcante Barros**

Economista, Mestre em Administração em Agronegócio/UFMS, Analista da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

**Jaqueline Matias**

Bióloga, Doutoranda em Doenças Infecciosas e Parasitárias/UFMS, Bolsista CNPq/Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

**Larissa Bezerra dos Santos**

Médica-veterinária, Doutoranda em Ciência Animal/UFMS, Bolsista FUNDECT, Campo Grande, MS

**Leandro de Oliveira Souza Higa**

Biólogo, Mestrando no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal – FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS

**Lenita Ramires dos Santos**

Médica-veterinária, Doutora em Imunologia, Pesquisadora da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

**Luiz Lehmann Coutinho**

Engenheiro-agrônomo, PhD em Animal Science, Professor Titular da Universidade Estadual Luiz de Queiroz – ESALQ – USP, Piracicaba, SP

**Magda Vieira Benavides**

Zootecnista, Doutora em Ciência da Lã, Pesquisadora da Embrapa Pesca e Aquicultura, Palmas, TO

**Marco Antônio Machado**

Engenheiro-agrônomo, Doutor em Genética e Melhoramento, Pesquisador da Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, MG

**Marcos Valério Garcia**

Biólogo, Doutor em Microbiologia Agropecuária, Pós-doutorando CNPq/Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

**Namor Pinheiro Zimmermann**

Médico-veterinário, Doutorando no Programa de Pós Graduação em Ciência Animal da FAMEZ/UFMS, Campo Grande, MS

**Poliana Fernanda Giachetto**

Zootecnista, Doutora em Zootecnia, Pós-doutorado em Melhoramento Genético Animal – FMVZ/UNESP – Botucatu, Pesquisadora da Embrapa Informática Agropecuária, Campinas, SP

**Renato Andreotti**

Médico-veterinário, Doutor em Biologia Molecular, Pós-doutorado na ARS/USDA, Kerrville, Texas, Estados Unidos, Pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

**Rodrigo Casquero Cunha**

Médico-veterinário, Doutor em Ciência Animal na UFMS, Bolsista PNPd/CAPES do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, RS

**Vinicius da Silva Rodrigues**

Médico-veterinário, Mestrando em Doenças Infecciosas e Parasitárias, FAMED/UFMS, Campo Grande, MS

**Wilson Werner Koller**

Biólogo, Doutor em Ciências Biológicas – Entomologia, Pesquisador da Embrapa Gado de Corte, Campo Grande, MS

**Zoraida del Carmen Fernandez Grillo**

Graduação em Biologia, Doutorado em Saúde Pública e Epidemiologia pela Faculdade de Saúde Pública/Universidade de São Paulo, Pesquisadora em Saúde Pública da Fiocruz, Campo Grande, MS



## **Agradecimentos**

Os autores fazem especial agradecimento aos técnicos que trabalham com o manejo de animais no país que, ao desenvolverem as suas atividades no controle sanitário desses animais, ao compartilhar a sua experiência contribuem para o direcionamento da pesquisa na busca de soluções para a agropecuária do país a partir da realidade e ações por eles enfrentadas no campo.



## Apresentação

O livro que ora se apresenta ao leitor originou-se da publicação anterior, *Carrapatos no Brasil: biologia, doenças transmitidas e controle* (Andreotti; Koller, 2013). No citado livro, um grupo de especialistas brasileiros divulgou resultados de pesquisa sobre a biologia dos carrapatos, as doenças por ele transmitidas e os aspectos relacionados ao controle com ênfase no controle do carrapato-do-boi, oferecendo, a técnicos e estudantes, um conjunto de informações importantes para a tomada de decisões sobre o controle do carrapato.

Após dois anos de divulgação dessa publicação, leitores solicitaram informações sobre os procedimentos e técnicas que constituíram a base para as pesquisas relatadas.

Esse foi o estímulo para a elaboração deste livro, *Carrapatos: Protocolos e técnicas para estudo*, no qual especialistas expõem os protocolos e técnicas para estudo de carrapatos para que a comunidade científica possa ampliar e aprofundar o embasamento para a tomada de decisões, e para a formulação de políticas públicas visando o controle deste ectoparasito.

Carrapatos são ectoparasitos do filo Arthropoda, classe Arachnida, ordem Acari e subordem Ixodida. As quase 900 espécies de carrapatos atuam como parasitas sobre a grande maioria dos vertebrados e apresentam uma ampla distribuição geográfica no planeta.

Os carrapatos estão amplamente distribuídos no Brasil, com 67 espécies descritas até o momento, exercendo diversos efeitos deletérios no organismo do hospedeiro, que vão desde a lesão cutânea, à anemia ocasionada por uma infestação maciça, à inoculação de toxinas neurotrópicas que causam paralisia e que podem, eventualmente, induzir à morte, dependendo da espécie de carrapato e o respectivo hospedeiro.

Apesar de amplamente estudados esses parasitas estão se mantendo na natureza; setores produtivos e animais de companhia, transmitindo patógenos e mantendo agentes patogênicos no meio ambiente, além de causar prejuízos à cadeia produtiva.

Este livro pretende possibilitar a técnicos e estudantes o acesso a um conjunto de protocolos importantes para a tomada de decisões sobre estudos relacionados a carra-

patos em geral, desde a sua identificação, ecologia, doenças transmitidas e, principalmente, ações com relação ao controle do carrapato-do-boi.

É sempre importante olhar para a cadeia produtiva de bovinos e reforçar a ênfase dos prejuízos econômicos causados por estes parasitos na pecuária brasileira: produção de leite e carne; danos no couro; transmissão de doenças; além dos prejuízos relacionados com os custos para controle: a mão-de-obra, despesas com instalações, aquisição de carrapaticidas e de equipamentos de suporte.

A pecuária brasileira movimenta em torno de 212 milhões de bovinos, representando o segundo maior rebanho bovino do mundo e, atualmente, tendo a liderança das exportações de carne. Ocupa também o quinto lugar na produção de leite. Contudo, a produtividade da pecuária é reduzida por prejuízos causados pelo carrapato, prejuízos da ordem de 3,2 bilhões de dólares ao ano.

Os capítulos foram organizados com base na lógica de busca do leitor para a sequência ordenada dos protocolos técnicos necessários para os estudos dos carrapatos.

É indiscutível a importância do controle do carrapato para a cadeia produtiva de bovinos e para a saúde pública, e a conseqüente necessidade de se pensar no seu controle com base no manejo da população. Neste livro teve-se por objetivo organizar informações sobre protocolos para os estudos sobre carrapatos que podem ser úteis à formulação de políticas públicas, no sentido de aperfeiçoar a produtividade da pecuária; aumentar a segurança ambiental e alimentar, e promover ações de saúde pública.

*Renato Andreotti  
Wilson Werner Koller  
Marcos Valério Garcia*

## Prefácio

As bovinoculturas de corte e de leite no Brasil têm o maior valor bruto entre as cadeias produtivas agropecuárias. Os produtos derivados dessas cadeias são, na sua grande parte, consumidos pelo mercado interno. Como exemplo da importância e impacto dessas cadeias produtivas, apenas 20 a 25% da produção de carne bovina garante a liderança do Brasil como o maior exportador de carne bovina, cerca de 33% do comércio mundial, com projeções crescentes de aumentar a sua participação no mercado externo.

A sanidade animal e a higiene sanitária dos rebanhos têm papel vital para o sucesso das cadeias de produção de bovinos, quer pela sua relação direta com a saúde do animal, quer pelos impactos na saúde pública – especialmente quando relacionadas às zoonoses, ou mesmo pelas exigências e dinamismo dos hábitos de consumo humano. A importância estratégica das cadeias produtivas de proteína de origem animal está, portanto, diretamente relacionada às tendências do mercado agroalimentar, em que a segurança dos alimentos, a qualidade dos mesmos e a necessidade de aumentar a produtividade são pilares essenciais.

Os artrópodes e os patógenos por eles transmitidos são, na história da sociedade moderna, os agentes que maiores danos e prejuízos causaram à humanidade. Neste contexto, os carrapatos, em especial os ixodídeos (carrapatos “duros”), parasitas externos de animais e eventualmente de humanos, constituem o complexo que determina graves prejuízos à produção de proteína animal no mundo, além de serem transmissores da maior diversidade de agentes patogênicos (vírus, bactérias, protozoários, fungos, dentre outros). Assim, todo conhecimento adicional ao estado-da-arte dos artrópodes é um tijolo a mais na busca de soluções para esse sério problema.

Desta forma, o livro *Carrapatos: protocolos e técnicas para estudo* reúne conhecimentos de especialistas da Embrapa e de instituições parceiras em temas relacionados a procedimentos, protocolos, métodos e técnicas que subsidiam estudos e rotinas laboratoriais em carrapatos, agentes transmissíveis por estes e temas correlatos.



Estruturado em 11 capítulos, o livro apresenta abordagens práticas: desde a coleta, preservação e identificação de carrapatos; o diagnóstico de doenças transmitidas por carrapatos pelo uso de biologia molecular; estudos de avaliação da resistência genética de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus microplus*; passando por metodologias para obtenção de extratos vegetais e técnicas de biomonitoramento *in vitro*; até o uso de fungos entomopatogênicos para o controle de carrapatos e bioensaios para diagnóstico da resistência aos acaricidas. Neste rol, há os procedimentos para o controle do carrapato-do-boi de forma prática, em dez passos.

Assim, esperamos que o leitor aprecie e faça uma boa aplicação das informações e aprendizados aqui descritos.

Boa Leitura!

Cleber Oliveira Soares  
Chefe-Geral da Embrapa Gado de Corte

# Sumário

- 1. Coleta, preservação e identificação de carrapatos, 1**  
*Wilson Werner Koller*  
*Jaqueline Matias*
- 2. Métodos de contenção de animais para coleta de carrapatos, 35**  
*Vinicius da Silva Rodrigues*  
*Namor Pinheiro Zimmermann*  
*Marcos Valério Garcia*  
*Francisco Tobias Barradas Pina*
- 3. Protocolos para o diagnóstico de doenças transmitidas por carrapatos pelo uso de biologia molecular, 59**  
*Zoraida Fernández Grillo*  
*Renato Andreotti*
- 4. Protocolos para diagnóstico de babesiose e anaplasnose, 75**  
*Lenita Ramires dos Santos*  
*Flávio Ribeiro Araújo*  
*Emanuelle Baldo Gaspar*  
*Cláudia Cristina Gúlias Gomes*  
*Ana Maria Sastre Sacco*  
*Magda Vieira Benavides*  
*Carlos Alberto do Nascimento Ramos*

- 5. Uso de técnicas de biologia molecular em estudos de avaliação da resistência genética de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus microplus*, 99**  
*Fabiane Siqueira*  
*Isabella Maiumi Zaidan Blecha*  
*Marco Antônio Machado*  
*Luiz Lehmann Coutinho*
  
- 6. Protocolos para o desenvolvimento de antígenos para vacinas contra o carrapato-do-boi, 115**  
*Rodrigo Casquero Cunha*  
*André de Abreu Rangel Aguirre*  
*Fabio Pereira Leivas Leite*  
*Renato Andreotti*
  
- 7. Protocolos para estudos de variabilidade genética em populações de carrapatos, 143**  
*Bárbara Guimarães Csordas*  
*Poliana Fernanda Giachetto*  
*Renato Andreotti*
  
- 8. Metodologias para extração de extratos vegetais e técnicas de biomonitoramento *in vitro*, 155**  
*Larissa Bezerra dos Santos*  
*Fernando de Almeida Borges*
  
- 9. Utilização de fungos entomopatogênicos para o controle de carrapatos: protocolos experimentais, 169**  
*Marcos Valério Garcia*  
*Leandro de Oliveira Souza Higa*  
*Vinicius da Silva Rodrigues*  
*Jacqueline Cavalcante Barros*
  
- 10. Protocolos sobre bioensaios para diagnóstico da resistência de *Rhipicephalus microplus* aos acaricidas, 179**  
*Marcos Valério Garcia*  
*Leandro de Oliveira Souza Higa*  
*Jacqueline Cavalcante Barros*  
*Renato Andreotti*
  
- 11. Procedimentos para o controle do carrapato-do-boi em dez passos, 195**  
*Renato Andreotti*  
*Wilson Werner Koller*  
*Marcos Valério Garcia*

**Glossário, 209**

CAPÍTULO

1



**Coleta,  
preservação e  
identificação de  
carrapatos**

*Wilson Werner Koller  
Jaqueline Matias*





*Para a ciência, a identificação e o registro de novas espécies representa mais um passo, porque ainda se conhece muito pouco sobre os organismos existentes, e a coleta e identificação acrescentam conhecimento científico. Cada vez que uma espécie nova é descoberta, um novo mundo se descortina. Se a espécie tem importância ou não, o tempo dirá, mas enquanto não for conhecida, ela não existe para a ciência. A revisão taxonômica é um trabalho minucioso, dispendioso e moroso. Leva tempo, exige paciência e meticulosidade. A taxonomia, ou sistemática, é uma ciência de base. Ela dá suporte a outras. O nome científico é um dos processos primordiais, sem ele são difíceis os passos seguintes. (Texto extraído e adaptado do Boletim de Pautas n. 52, em 3.nov.2015, da Agência Embrapa de Notícias, da matéria produzida pela jornalista Dalízia Aguiar, sob o título “Insetos descobertos por pesquisadores da Embrapa são catalogados”).*

De fato, para que qualquer ser passe a existir para a ciência, é preciso que ele seja identificado, e receba um nome, de acordo com a sua relação de parentesco dentro do sistema de classificação dos seres vivos. Esse nome será único e valerá em qualquer parte do mundo.

Essa simples relação de parentesco, por si só, muitas vezes traz uma série de informações sobre possíveis características de uma nova espécie, entre outras, aquelas de caráter comportamental, preferências alimentares, agressividade ou não, mecanismos de defesa que podem possuir e, eventualmente, se podem atuar como potenciais vetores de organismos patogênicos.

No caso de carrapatos, é de conhecimento geral que todas as espécies se alimentam de sangue e, portanto, são parasitas de diferentes espécies de animais. Tal fato é suficiente para que sejam envidados esforços para coletar e identificar o máximo possível das espécies existentes; para depois estudar a sua bioecologia e seus hospedeiros preferenciais. A partir disso será possível avaliar sua capacidade de transmitir doenças prejudiciais à saúde de homens e animais domésticos, bem como de causar impactos negativos à economia humana.

Tais conhecimentos formam a base para estudos epidemiológicos visando ao controle das espécies de interesse, que é o escopo principal ao qual se propõe o presente livro. A atualização permanente e a busca por novos conhecimentos constituem tarefas sem tréguas, pois além da necessidade de conhecermos com urgência a diversidade de carrapatos em nosso país, temos ainda razões suficientes para nos preocuparmos com espécies que podem vir a se somar, que podem ser trazidas via animais migratórios ou introduzidas no país por descuido do próprio homem.

## **COLETA DE CARRAPATOS – FASES DE VIDA LIVRE E PARASITÁRIA**

Existem diferentes métodos de coleta ou captura de carrapatos dependendo da finalidade de sua obtenção. Muitas espécies têm importância por danos diretos ou a capacidade de veicularem agentes patogênicos aos animais domésticos, porém, há também aquelas de interesse à saúde pública por poderem transmitir doenças ao homem. Os

carrapatos encontrados em mamíferos silvestres, tais como, aves; anfíbios e répteis respondem por cerca de 90% das espécies conhecidas.

A remoção ou fragmentação progressiva da cobertura vegetal original diante da expansão das fronteiras da agricultura e pecuária acelera o contato de animais domésticos e o homem com as espécies de carrapatos até então comuns apenas em animais silvestres. Diante disso, é necessário conhecer as espécies presentes nos diferentes ambientes e a importância epidemiológica de cada uma delas.

Para coletar carrapatos de vida livre existem, basicamente, três métodos. Um deles caracteriza-se pela observação visual, pelo exame das folhas em arbustos rasteiros em bosques e matas, nos quais os espécimes podem ser localizados sob ou na extremidade das folhas (Figura 1.1).

A procura, nestes casos, deve ser efetuada nas trilhas utilizadas pelos animais silvestres. Os locais mais indicados são aqueles próximos às fontes de água, onde os animais afluem para matar a sede e ou fuçar no barro. As folhas com “bolinhos” de larvas de carrapatos podem ser destacadas com uma pinça ou manualmente, colocando-as num frasco e cobrindo o mesmo com pano poroso ou tampa contendo pequenos furos para manter a aeração (Figura 1.2), sendo os carrapatos ainda na fase de larvas, posteriormente, colocados sobre animais em cativeiro para a obtenção de ninfas ou adultos, os quais são mais fáceis de identificar (Figura 1.3).

Exemplares assim obtidos, depois de ingurgitados podem, também, ser mantidos em estufas de BOD para acompanhamento do ciclo de vida, quando for de interesse.

Um segundo método de captura, que também deve priorizar os locais acima detalhados, vale-se da técnica de armadilhas que empregam gelo seco (Figura 1.4). O gelo seco, ao sublimar libera dióxido de carbono ( $\text{CO}_2$ ), que constitui excelente atrativo químico, por imitar o  $\text{CO}_2$  liberado pela respiração de hospedeiros.



**FIGURA 1.1.** Bolinho de larvas de carrapatos em folha de arbusto em clareira na mata.  
*Foto: Jaqueline Matias.*

As armadilhas compreendem retalhos de pano branco de algodão, com medida aproximada de 50 x 70 cm, colocando-se fita dupla face na face superior a quatro centímetros da borda (em todo o perímetro) e pouco mais de 200 gramas de gelo seco na área central do pano. A fita dupla face facilita a recuperação dos indivíduos aderidos à fita, que morreriam em contato com o gelo.

Finalmente, em áreas abertas e de fácil acesso, pode utilizar-se a técnica de arrasto (Figura 1.5). Neste caso, emprega-se um pano branco de algodão com largura ao redor

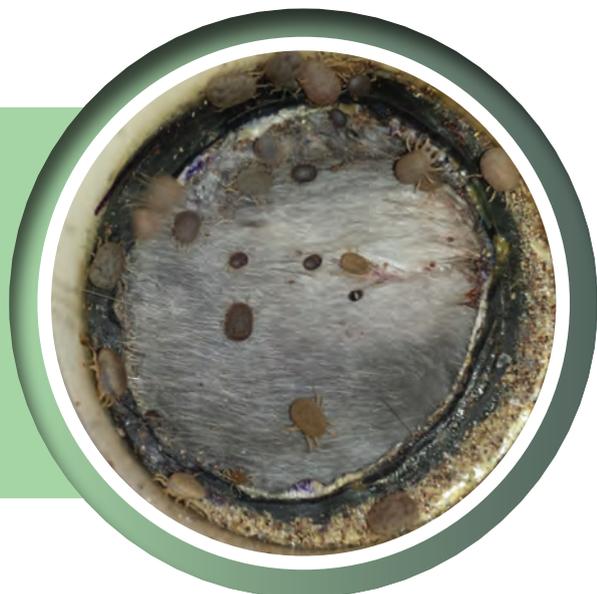
**FIGURA 1.2.** Frasco plástico com pequenos furos nas tampas para acondicionamento de carrapatos vivos. Devem ser colocados alguns pedaços de folhas de plantas para manter a umidade interna.

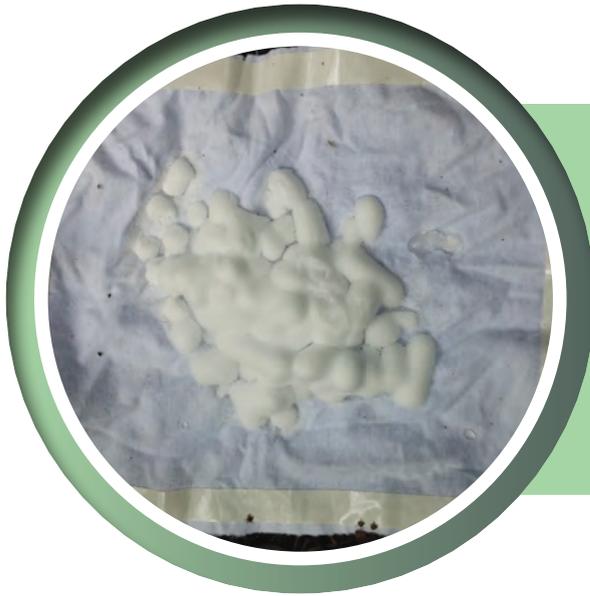
*Foto:* Leandro de Oliveira Souza Higa.



**FIGURA 1.3.** Carrapatos colhidos (coletados) no ambiente e colocados sobre animais em baias cobertas para obtenção das fases nas quais a identificação se torna mais fácil (ninfas ou adultos).

*Foto:* Vinicius da Silva Rodrigues.





**FIGURA 1.4.** Armadilhas com atração por gelo seco.  
*Foto:* Namor Pinheiro Zimmermann.



**FIGURA 1.5.** Pano de arrasto para captura de carrapatos de vida livre.  
*Foto:* Leandro de Oliveira Souza Higa.

de 70 cm e comprimento de 1,5 a 2 metros. Na extremidade anterior o pano é forçado a permanecer distendido por um suporte de madeira. Nas extremidades desse suporte é amarrada uma corda com pouco mais de um metro para servir de apoio para puxar o pano de arrasto.

As distâncias a serem percorridas a cada coleta com o pano de arrasto, bem como o número de vezes que o processo deve ser repetido e a distribuição espacial dos pontos de coleta, inclusive nos métodos anteriores, depende do objetivo do estudo a ser feito. Então, a decisão para estes quesitos deve ser tomada com antecedência sob a orientação

de um especialista em estatística (delineamento experimental), com vistas à devida confiabilidade das informações a serem obtidas em contraposição ao esforço mínimo necessário a ser empreendido.

Para a coleta de carrapatos em fase parasitária é necessário efetuar a contenção prévia dos hospedeiros (este assunto será tratado no Capítulo 2), capturando-os e sedando-os, quando oferecem algum risco a quem for manipulá-los. Para a captura de aves silvestres de pequeno tamanho podem ser empregadas “redes de neblina”, comumente utilizadas na captura de morcegos. Armadilhas do tipo “live trap”, ou seja, armadilhas que não comprometem a integridade física da presa são especialmente úteis para aprisionar roedores, marsupiais, lobinhos e quatis, utilizando, respectivamente, milho e bacon. Contudo, há várias opções entre os alimentos preferidos de cada espécie a ser capturada.

Tais armadilhas, logicamente, devem ser armadas em clareiras ou próximo aos locais de moradia ou abrigo dos animais que se pretende capturar.

As armadilhas contendo animais de interesse que forem capturados devem ser conduzidas ao laboratório dentro de sacos plásticos opacos para causar o mínimo de estresse aos animais. Quando o deslocamento até o laboratório tiver inconvenientes os animais podem ser examinados no próprio local de captura, sendo, em seguida, devolvidos nos seus próprios domínios de território.

Depois de anestesiados, sobre uma cuba ou travessa de cor branca, em se tratando de marsupiais e roedores, deve-se passar um pente no pelo dos animais de modo que os carrapatos caiam na travessa. Estes, com auxílio de um pincel de cerdas macias devem ser transferidos para frascos contendo álcool a 80%.

Em seguida o hospedeiro deve ser minuciosamente inspecionado para localizar espécimes já fixados. Estes, caso forem utilizados para estudos que requerem que permaneçam vivos devem ser removidos com pinças, se forem muito pequenos, ou com a mão protegida por luva. Neste último caso sugere-se que não sejam simplesmente puxados, mas que se aplique uma pequena torsão no sentido do eixo do parasito no ato de puxá-los, de modo a garantir a integridade do hipostômio que é vital para quando se pretender dar sequência ao desenvolvimento dos mesmos.

A medida acima citada também deve ser observada quando se for remover carrapatos em animais domésticos ou animais encontrados mortos, pois garantir a integridade do hipostômio pode ajudar, inclusive, na identificação da espécie.

Alguns EPIs são indispensáveis para adoção por aqueles que forem coletar carrapatos de vida livre para reduzir ao máximo a infestação própria durante a coleta. As roupas devem, preferencialmente, ser de cores claras para facilitar a percepção e remoção de carrapatos.

O uso de macacões com mangas longas é recomendável, mas caso utilizar camisas que as mesmas sejam de mangas longas. Botas de cano longo também ajudam, porém, ainda assim, sugere-se o emprego de fita dupla face ou fita adesiva larga para isolar a entrada entre o cano da bota e a roupa. A fita larga pode ser parcialmente virada ao contrário de modo que os carrapatos fiquem aderidos a ela, impedindo que subam.

A roupa utilizada durante a coleta deve ser substituída tão logo possível. Nessa ocasião, todos os que participaram da coleta devem efetuar uma vistoria e remoção dos carrapatos andando ou já fixados no corpo. Um banho quente esfregando bastante a pele também pode ajudar na remoção de carrapatos ainda não fixados.

## **FIXAÇÃO DE ESPÉCIMES DE CARRAPATO PARA PRESERVAÇÃO**

O meio mais prático e normalmente disponível para manter carrapatos em via úmida é em frascos contendo álcool a 70 % ou acima disso. Entretanto, dependendo do interesse na condução de exames envolvendo caracterização molecular, então é conveniente que sejam preservados em álcool absoluto. Também podem ser preservados a seco, montados em lâminas permanentes (quando para fins didáticos), após passarem pelo processo de clarificação. É preferível que a montagem a seco seja utilizada apenas quando tal montagem não tenha que ser desfeita, posteriormente, ou então se utilize a montagem em meio de gelatina + glicerina, que pode facilmente ser revertida.

## **ASPECTOS MORFOLÓGICOS EM SISTEMÁTICA DE CARRAPATOS (ACARI; IXODIDES) COM ÊNFASE PARA OS GÊNEROS *Amblyomma* E *Rhipicephalus***

Os carrapatos pertencem ao Filo Arthropoda, subfilo Chelicerata, Classe Arachnida, Subclasse Acari, Superordem Parasitiformes, Ordem Ixodida, Superfamília Ixodoidea.

As características básicas da classe são a ausência de antenas e asas; a presença de quelíceras e pedipalpos; possuem quatro pares de pernas (exceção em larvas que apresentam três pares); e o corpo dividido em cefalotórax e abdome, sendo que as segmentações abdominais (tagmas) apresentam-se fundidas.

Os diferentes estádios do ciclo evolutivo de carrapatos podem ser caracterizados pela ausência de um quarto par de pernas nas larvas e as ninfas se distinguem dos adultos pela ausência de abertura genital e ornamentações nos escudos.

Em Ixodoidea encontram-se registradas três famílias: Argasidae, Ixodidae e Nuttalliellidae, sendo que esta última é representada por apenas uma espécie africana, *Nuttalliella namaqua*.

Os ixodídeos (Figuras 1.6 e 1.7) são facilmente diferenciados dos argasídeos por apresentarem escudo dorsal e as peças bucais projetadas para frente (Figura 1.8), e porque, em relação aos argasídeos, são considerados carrapatos de corpo duro.

Os argasídeos, além de serem considerados de corpo mole, não apresentam escudo verdadeiro em nenhuma de suas fases de vida. As peças bucais de ninfas e adultos situam-se ventralmente no interior de uma depressão, chamada camerostoma.

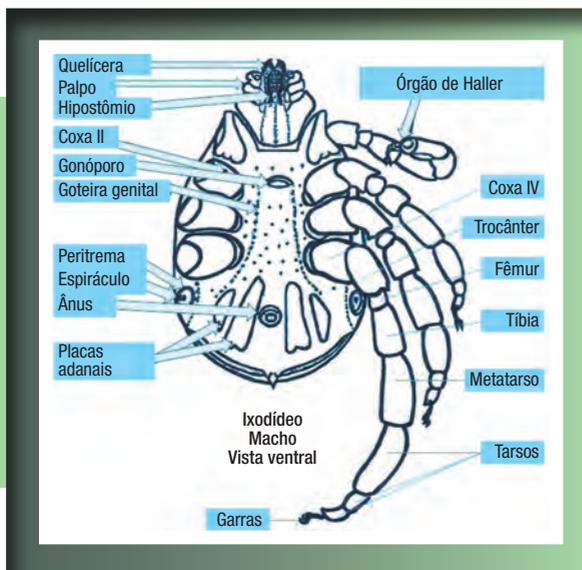
A única espécie descrita de Nuttalliellidae tem características intermediárias entre as anteriormente mencionadas, tendo como distinção um pseudoescudo com a parte mais elevada rígida e articulações nas pernas lembrando bolas encaixadas entre si. Análises filogenéticas recentes comprovaram não se tratar de uma evolução intermediária entre Ixodidae e Argasidae, mas que *N. namaqua* ocupa uma posição basal dentro da classe Ixodida.

Neste capítulo serão apresentadas as principais características morfológicas externas de carrapatos de interesse médico-veterinário, de alguns gêneros que ocorrem no Brasil, em função da sua importância quanto à transmissão de patógenos e as perdas econômicas que podem ocasionar.

Será dada ênfase especial aos gêneros *Amblyomma* e *Rhipicephalus*, sendo que muitas das informações aqui fornecidas, e outras complementares, encontram-se disponíveis, entre outros, nos trabalhos de Barros-Battesti (2006), Onofrio (2007) e Martins et al. (2010).

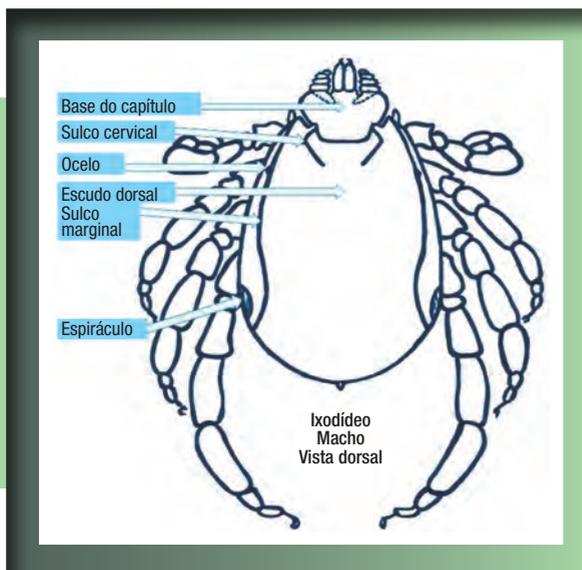
**FIGURA 1.6.** Morfologia externa básica de Ixodídeo em vista dorsal.

*Ilustração:* Wilson Werner Koller.



**FIGURA 1.7.** Morfologia externa básica de Ixodídeo em vista ventral.

*Ilustração:* Wilson Werner Koller.



### Principais características morfológicas externas de gêneros

A família Ixodidae constitui-se de cinco gêneros: *Amblyomma*, *Dermacentor*, *Rhipicephalus*, *Ixodes* e *Haemaphysalis*. Em Argasidae tanto a sistemática clássica quanto Guglielmono et al. (2010) reconhecem os gêneros *Antricola*, *Argas*, *Nothoaspis*, *Ornithodoros* e *Otobius*.

Entretanto há outras escolas divergindo entre si, de modo que não há consenso quanto à classificação superior em Argasidae. Para ajudar a resolver esta questão tem



**FIGURA 1.8.** Gnatossoma de *Amblyomma longirostre* com detalhe para os palpos dispostos lateralmente ao hipostômio denteado.  
Foto: Marcos Valério Garcia.

sido sugerida a necessidade de análises morfológicas incluindo o uso de marcadores multimoleculares para diferentes taxas de mutações.

**Amblyomma** (Figura 1.9) – Em *Amblyomma* sp. os palpos e o hipostômio são, em geral, longos, especialmente o segundo artigo dos palpos; possuem olhos predominantemente convexos ou eventualmente achatados (raramente orbitados); o escudo é, geralmente, ornamentado, mas a ornamentação pode ser inconspícua e desaparecer quando os espécimes não tiverem preservação adequada; a base do capítulo ou gnatossoma apresenta formas variadas, de quadrangular a hexagonal; ausência de placas adanais nos machos; a placa espiracular (peritremas) têm a forma triangular ou de uma vírgula.

**Dermacentor** (Figura 1.10) – Neste gênero os machos de todas as espécies apresentam coxas aumentando progressivamente de tamanho a contar do par anterior para o par terminal; os escudos são ornamentados, excetuando-se apenas o caso da espécie *D. nitens*; a base dorsal do capítulo é sempre quadrangular; a dentição do hipostômio varia de 3/3 a 4/4; presença de olhos, e festões (linhas curtas presentes na margem lateral do opistossoma e que são delimitados pelo sulco marginal) variando de sete a onze.

**Rhipicephalus** (Figura 1.11) – Os machos possuem duas ou quatro placas adanais e, em alguns casos, um apêndice caudal; escudo sem ornamentações; possuem olhos; a base do capítulo tem a forma hexagonal e o rosto é curto; a coloração em todas as espécies varia de castanha avermelhada a castanha (tons de marrom).

**Ixodes** (Figura 1.12) – A presença de sulco anal anterior ao ânus constitui a principal característica deste gênero, característica esta definida como Prostriata. Não possuem olhos e festões; também estão ausentes as ornamentações nos escudos; as placas espiraculares apresentam formato oval ou circular; presença de placas ventrais nos machos e o hipostômio destes pode apresentar dentição semelhante à da fêmea

**FIGURA 1.9.** *Amblyomma dubitatum* em vista dorsal.  
Foto: Jaqueline Matias. Museu do carrapato, Embrapa Gado de Corte MS.



**FIGURA 1.10.** *Dermacentor nitens* em vista dorsal.  
Foto: Jaqueline Matias. Museu do carrapato, Embrapa Gado de Corte MS.



ou crenulações. Em função das fêmeas estarem alimentadas ou não pode mudar a coloração do aloescudo, o qual pode ser creme ou amarelo claro quando não ingurgitadas, variando para diferentes tons azulados ou de cinza depois de ingurgitadas. **Haemaphysalis** (Figura 1.13) – Caracterizam-se pela ausência de olhos e de ornamentação nos escudos; o hipostômio é curto e espatulado, apresentando denticção variável de 3/3 a 6/6; os palpos são curtos e com aspecto cônico exibindo uma projeção lateral no fêmur (segundo artícuo); a base dorsal do capítulo tem forma retangular,



**FIGURA 1.11.** Fêmeas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ingurgitadas.  
*Foto:* Jaqueline Matias. Museu do carrapato, Embrapa Gado de Corte MS.



**FIGURA 1.12.** *Ixodes loricatus* em vista dorsal.  
*Foto:* Jaqueline Matias. Museu do carrapato, Embrapa Gado de Corte MS.

sendo mais larga do que longa; as placas espiraculares variam entre os sexos, assumindo a forma oval nas fêmeas e de vírgula nos machos.

**Ornithodoros** (Figura 1.14) – Apresentam formato diverso em sua placa dorsal o que é determinante na separação das espécies. O hipostômio é bem desenvolvido e sempre apresenta denticulos, seja qual for o estágio de desenvolvimento; presença de capuz; o idiossoma tem a forma suboval e margem arredondada, no geral, porém sem suturas.

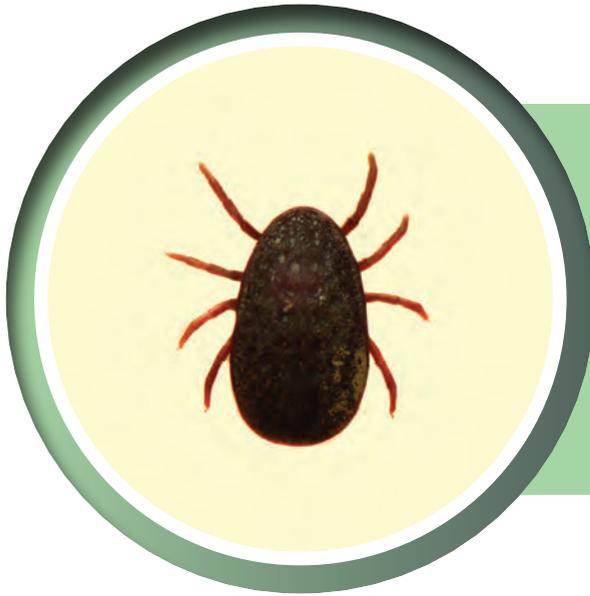
**FIGURA 1.13.** *Haemophysalis leachi* em vista dorsal. Fêmea.  
Foto: Jaqueline Matias. Museu do carrapato, Embrapa Gado de Corte MS.



**FIGURA 1.14.** *Ornithodoros rostratus* em vista dorsal.  
Foto: Jaqueline Matias. Museu do carrapato, Embrapa Gado de Corte MS.



**Argas** (Figura 1.15) – Não há presença de olhos. A forma geral é ovalada, sendo o corpo dorso-ventralmente achatado; a separação da face dorsal e ventral é demarcada por uma sutura e a margem lateral; discos arredondados ou ovais encontram-se distribuídos de forma quase que regular sobre o tegumento. Cerdas pós-palpais podem estar presentes em algumas espécies.



**FIGURA 1.15.** *Argas miniatus*.  
Vista dorsal.

Foto: Jaqueline Matias. Museu do carrapato, Embrapa Gado de Corte MS.

**Chave para a identificação de ninfas de carrapatos do gênero *Amblyomma* que ocorrem no Brasil, segundo Martins et al. (2010):**

1.	Coxa I com um espinho (ou esporão), capítulo com presença de aurículas – semelhante a espinhos projetados posteriormente, não curvos, situados ventralmente na região póstero lateral	2
	Coxa I com 2 espinhos	3
2.	Espinho da coxa I robusto com bordo medial voltado mais internamente, dando ao espinho um aspecto de mais largo; escudo com bordo posterior cordiforme	<i>A. triste</i>
	Espinho da coxa I pontiagudo um pouco mais longo e afilado; escudo com bordo posterior não cordiforme	<i>A. tigrinum</i>
3.	Coxa II com dois espinhos, sendo o interno bem pequeno	4
	Coxa II com somente um espinho	5
4.	Escudo com pontuações profundas distribuídas uniformemente; denteção do hipostômio 2/2	<i>A. humerale</i>
	Escudo com pontuações profundas concentradas nas áreas laterais; denteção do hipostômio 2,5/2,5	<i>A. rotundatum</i>

5.	Córnuas “espessamento angular póstero-lateral do capítulo” presentes	6
	Córnuas ausentes	12
6.	Presença de tubérculos quitinosos em ângulos póstero-interiores dos festões	7
	Ausência de tubérculos quitinosos em ângulos póstero-interiores dos festões	9
7.	Escudo com comprimento > 0,75 mm	8
	Escudo com comprimento < 0,75 mm	<i>A. brasiliense</i>
8.	Festões com tubérculos esbranquiçados, bem desenvolvidos, presentes nos ângulos póstero-interiores dos festões; escudo mais amplo, sendo a relação entre a largura e o comprimento > 1,3, e apresentando margem póstero-lateral cordiforme	<i>A. incisum</i>
	Presença de tubérculos quitinosos amarronzados e discretos nos ângulos internos dos festões; escudo ligeiramente mais estreito, relação largura/comprimento < 1,3 com bordo posterior não cordiforme	<i>A. sculpturatum</i>
9.	Coxa IV com um pequeno espinho triangular tão longo quanto largo; espinho interno na coxa I mais curto do que o espinho na coxa II	10
	Coxa IV com um pequeno espinho triangular mais longo do que largo; espinho interno na coxa I tão longo quanto o espinho da coxa II	11
10.	Base dorsal do capítulo com forma hexagonal; córnuas triangulares pronunciadas	<i>A. naponense</i>
	Base dorsal do capítulo com forma retangular; córnuas triangulares diminutas; idiossoma longilíneo	<i>A. parvum</i>
11.	Córnua distintamente triangular; escudo com comprimento > 0,8 mm; ninfa normalmente de tamanho grande	<i>A. latepunctatum</i>
	Córnua diminuta; escudo com comprimento < 0,7 mm; ninfa normalmente de tamanho pequeno	<i>A. oblongoguttatum</i>
12.	Presença de aurícula na forma de projeções póstero-laterais arredondadas	13
	Aurícula ausente	15

13.	Coxa I com dois espinhos curtos; olhos localizados no meio do comprimento do escudo	14
	Coxa I com dois espinhos de tamanho médio; olhos localizados no terço posterior do escudo; idiossoma longilíneo; hipostômio espatulado	<i>A. ovale</i>
14.	Superfície do escudo extensivamente rugosa (esta característica visualiza-se melhor sob microscopia óptica do que sob microscopia eletrônica de varredura) com alguns pontilhados grandes e profundos nas áreas laterais; hipostômio lanceolado	<i>A. longirostre</i>
	Superfície do escudo ligeiramente rugosa, com muitos pontilhados grandes e profundos uniformemente distribuídos; hipostômio espatulado [esta característica foi baseada em ninfa desta espécie que, segundo Fonseca e Aragão (1952), apresenta hipostômio espatulado e com denteção 2/2]	<i>A. parkeri</i>
15.	Denteção apical do hipostômio 3/3.	16
	Denteção do hipostômio 2/2 em toda a sua extensão	17
16.	Poucas e pequenas cerdas no aloescudo base dorsal do capitulo retangular; placa espiracular não festonada; denteção 2,5/2,5	<i>A. dissimile</i>
	Aloescudo densamente piloso; base dorsal do capitulo sub-triangular; placa espiracular ligeiramente festonada; denteção 3/3	<i>A. romitii</i>
17.	Coxa I com dois espinhos desiguais, sendo o externo mais longo do que o interno	18
	Coxa I com dois espinhos curtos pouco diferenciados; base dorsal do capitulo com formato pentagonal; artículo IV do palpo apicalmente projetado	<i>A. fuscum</i>
18.	Pontilhados profundos raramente presentes no escudo ou, quando presentes, estão concentrados nas áreas laterais	19
	Escudo moderadamente pontilhado – pontilhados profundos distribuídos uniformemente	23

19.	Base dorsal do capítulo com forma triangular ou subtriangular; face dorsal do escudo extensivamente rugosa (esta característica visualiza-se melhor sob microscopia óptica do que sob microscopia eletrônica de varredura)	20
	Base dorsal do capítulo perfeitamente retangular; superfície do escudo ligeiramente rugosa	22
20.	Espinhas da coxa I pontiagudas e bem separados	21
	Coxa I com espinhas robustas, próximos entre si; idiossoma longilíneo	<i>A. aureolatum</i>
21.	Escudo amplo, mais largo do que comprido na razão > 1,3 e pontuações raras	<i>A. nodosum</i>
	Escudo levemente mais longo quanto à relação largura/comprimento, com pontilhados profundos concentrados nas áreas laterais	<i>A. calcaratum</i>
22.	Escudo amplo, mais largo do que comprido na razão > 1,3 e sulco cervical estendendo-se até a borda posterior do escudo	<i>A. pseudoconcolor</i>
	Escudo mais largo quanto à relação largura/comprimento < 1,3, com sulco cervical estendendo-se até o meio do escudo	<i>A. auricularium</i>
23.	Coxa I com espinho externo duas vezes mais longo que o interno	24
	Coxa I com espinho externo mais longo do que o interno, contudo não alcançando duas vezes o comprimento do espinho interno	25
24.	Base dorsal do capítulo ligeiramente hexagonal; espinhas da coxa I triangulares	<i>A. varium</i>
	Base dorsal do capítulo retangular; espinhas da coxa I pontiagudas	<i>A. cajennense</i>
25.	Sulco cervical longo, bem adiante da margem posterior dos olhos; escudo com pontuações grandes e profundos nas áreas laterais e pontuações menores na região central	26
	Sulco cervical curto, terminando como uma depressão rasa ao nível da margem posterior dos olhos; escudo com pontuações grandes e profundos, tanto nas áreas laterais quanto no centro	<i>A. coelebs</i>

26.	Sulco cervical profundo na metade anterior convergente, tornando-se uma depressão rasa e larga na metade posterior divergente; escudo mais largo, relação largura/comprimento > 1,33	<i>A. pacae</i>
	Sulco cervical profundo em toda a sua extensão, sem uma grande depressão rasa em sua metade posterior divergente; escudo mais estreito, com relação largura/comprimento < 1,33	<i>A. dubitatum</i>

**Chave para a identificação de adultos de carrapatos do gênero *Amblyomma*, separadamente para machos e fêmeas, que ocorrem no Brasil, segundo Onofrio (2007)**

**Machos**

1.	Sulco marginal distinto limitando posteriormente todos os festões	2
	Sulco marginal incompleto ou ausente	13
2.	Coxa I com dois espinhos menores que a altura da coxa, um dos quais, em geral, cobrem o artigo seguinte, ou se ambos o cobrem, não alcançam a metade desse artigo	3
	Coxa I com dois espinhos contíguos, agudos e tão longos quanto o comprimento da coxa, o externo é ligeiramente encurvado para fora e pouco mais longo que o interno, ambos cobrindo o artigo seguinte; escudo castanho com manchas acobreadas a esverdeadas; hipostômio 3/3	<i>A. ovale</i>
3.	Coxa IV com um só espinho, tão ou mais longo que o comprimento do artigo	4
	Coxa IV com um só espinho, mais curto que o comprimento do artigo	6
4.	Coxa I com o espinho externo longo e o interno quase obsoleto; escudo castanho com manchas esbranquiçadas; espécies pequenas; espinhos (esporões) nos tarsos II, III e IV; pernas IV mais robustas	5
	Coxa I com dois espinhos desiguais; escudo castanho claro com manchas esbranquiçadas ou acobreadas; hipostômio longo com dente 3/3	<i>A. cajennense</i>

5.	Escudo com listras, a banda marrom central do escudo é nitidamente interrompida na porção mediana; espinho da coxa IV longo, aproximadamente do mesmo comprimento que a coxa, com a ponta ligeiramente voltada para fora; hipostômio 3/3	<i>A. tigrinum</i>
	Escudo com listras, a banda marrom central é fracamente interrompida na porção mediana onde está localizada a fôvea; espinho da coxa IV muito longo e fino, ultrapassando o comprimento da coxa, terminando em ponta reta; hipostômio 3/3	<i>A. triste</i>
6.	Coxa I com dois espinhos muito curtos, com aproximadamente $\frac{1}{4}$ do comprimento do artigo	7
	Coxa I com espinhos desiguais, o externo podendo apresentar tamanho equivalente à $\frac{1}{2}$ do comprimento da coxa	8
7.	Presença de cinco placas esclerotinizadas ventrais, próximas aos festões, sendo uma mediana angulosa anteriormente, e dois pares laterais, um dos quais é alongado, o outro é arredondado; hipostômio 3/3; escudo de cor castanha com manchas acobreadas a esverdeadas, e alargado posteriormente; base dorsal do capítulo subtriangular	<i>A. geayi</i>
	Presença de cinco placas esclerotinizadas ventrais, a mediana arredondada anteriormente, o par posterior externo alongado e o interno arredondado; escudo castanho com manchas acobreadas a esverdeadas; hipostômio 3/3; a base dorsal do capítulo é triangular	<i>A. parkeri</i>
8.	Trocânteres com espinhos	9
	Trocânteres sem espinhos	11
9.	Escudo com suave ornamentação	10
	Escudo castanho claro sem ornamentação; palpos curtos e espessos, artigo I com um espinho ventral retrógrado; coxa I com dois espinhos muito desiguais, sendo que o externo alcança a coxa II; hipostômio 3/3; córnua salientes	<i>A. parvum</i>

10.	Escudo castanho claro com duas manchas esbranquiçadas de cada lado nos bordos laterais, duas no início do sulco marginal e duas na região posterior; o artículo I do palpo tem forte espinho retrógrado; coxa I com dois espinhos fortes e curtos, quase do mesmo comprimento, sendo o externo ligeiramente maior que o interno; hipostômio 3/3; córnuas ausentes	<i>A. pseudoconcolor</i>
	Escudo castanho claro com duas suaves manchas na região posterior; coxa I com dois espinhos fortes e curtos, quase do mesmo comprimento, sendo o externo ligeiramente maior que o interno; hipostômio 3/3; córnuas ausentes	<i>A. auricularium</i>
11.	Espinhas da coxa I fortes e subiguais	12
	Espinhas da coxa I desiguais, bem separados, de comprimento moderado não ultrapassando a 1/2 da altura da coxa, o interno correspondendo a 2/3 do comprimento do externo; coxa IV com um espinho moderadamente longo e forte; placas espiraculares muito grandes. Escudo castanho claro com manchas esbranquiçadas nas porções laterais; festões com prolongamentos quitinosos moderados; denteção hipostomal geralmente 3/3, mas podendo ser 4/4 da base até a metade e 3/3 da metade ao ápice	<i>A. dubitatum</i>
12.	Coxa I com dois espinhos fortes e separados, não ultrapassando a 1/2 da altura da coxa, coxa IV com um espinho moderadamente longo e forte; escudo castanho escuro com manchas esbranquiçadas, dando à região anterior aspecto de um pseudoescudo de fêmea; festões sem prolongamentos quitinosos; hipostômio curto com denteção 3/3	<i>A. coelebs</i>
	Coxa I com dois espinhos finos, subiguais, de comprimento ligeiramente menor que a altura da coxa; coxa IV com um espinho fino e longo; escudo castanho 58 claro com manchas suavemente esbranquiçadas nas porções: laterais e posterior; festões com pequenos prolongamentos; hipostômio longo, com denteção 3/3	<i>A. oblongoguttatum</i>
13.	Sulco marginal incompleto (alcançando no máximo o 3º festão)	14
	Sulco marginal ausente	19

14.	Coxa IV com um espinho	15
	Coxa IV com dois espinhos, o externo longo e afilado, maior que a $\frac{1}{2}$ do comprimento do artículo, e o interno reduzido a um pequeno tubérculo arredondado; coxas II e III com dois espinhos, sendo o interno reduzido a um tubérculo; escudo castanho claro, com manchas amareladas, festões prolongados por lâminas quitinosas, salientes não incisadas; sulco marginal não ultrapassando o 2 <sup>o</sup> fest�o; hipostômio com dente�o 3/3	<i>A. brasiliense</i>
15.	Coxa I com dois espinhos fortes, mais longos ou iguais ao comprimento do artículo	16
	Coxa I com dois espinhos muito curtos, o externo correspondendo a $\frac{1}{4}$ do comprimento do artículo e o interno reduzido a $\frac{1}{2}$ do externo; presença de cinco áreas esclerotinizadas ventrais, próximas aos festões, sendo uma mediana alongada e quatro laterais; base dorsal do gnatossoma subtriangular; escudo castanho escuro com manchas esverdeadas e acobreadas; sulco marginal terminando na altura do 3 <sup>o</sup> fest�o; hipostômio com dente�o 3/3	<i>A. longirostre</i>
16.	Coxa I com dois espinhos longos e subiguais, mas não ultrapassando o comprimento do artículo	17
	Coxa I com dois espinhos longos, subiguais e contíguos, maiores que o comprimento do artículo, o externo terminando em ponta reta; escudo castanho-claro, predominando o colorido amarelo-dourado; sulco marginal alcançando até o 2 <sup>o</sup> fest�o; hipostômio com dente�o 3/3	<i>A. aureolatum</i>
17.	Lâminas quitinosas (prolongamentos) nos festões, longas ou curtas, geralmente não incisadas	18
	Lâminas quitinosas nos festões invariavelmente incisadas; coxa I com dois espinhos largos, fortes e subiguais, o interno pouco mais largo que o externo; escudo ornamentado e com pontua�es profundas e grandes; espinho da coxa IV, curto, medindo aproximadamente $\frac{1}{3}$ do comprimento do artículo	<i>A. incisum</i>

18.	Escudo castanho com elevações escuras desprovidas de pontuações, sobretudo nas porções mediano-posteriores e laterais; lâminas quitinosas nunca incisadas nos festões; espinhos da coxa I fortes, subiguais	<i>A. sculpturatum</i>
	Escudo castanho claro, completamente pontuado, sem elevações escuras desprovidas de pontuações; lâminas quitinosas geralmente não incisadas, mas se incisadas, ocorrem nos festões 1, 2, 10 e 11	<i>A. latepunctatum</i>
19.	Hipostômio com dentição 3/3	20
	Hipostômio com dentição 4/4 (exceto em <i>A. romitii</i> que pode apresentar dentição 5/5 da base até o terço posterior e 4/4 deste até a coroa)	27
20.	Coxa IV com um só espinho	21
	Coxa IV com dois espinhos, o externo é moderadamente longo e afilado, igual ou menor que a ½ do comprimento do artícuo e o interno curto e afilado; coxas II e III com dois espinhos, sendo o interno menor; escudo castanho com manchas esbranquiçadas ou acobreadas, que na porção anterior, tomam aspecto de um pseudoescudo de fêmea, com pontuações grandes, principalmente nas margens, entremeadas de outras menores irregularmente distribuídas; festões sem prolongamentos; sulco marginal ausente	<i>A. dissimile</i>
21.	Espinhos da coxa I menores que a ½ do comprimento do artícuo	22
	Espinhos da coxa I iguais ou maiores que a ½ do comprimento do artícuo	25
22.	Espinho interno da coxa I, vestigial	23
	Espinho interno da coxa I, curto, mas evidente	24
23.	Escudo densamente pontuado, a área contida entre os sulcos cervicais é de coloração esbranquiçada, apresentando uma banda escura longitudinal central, as áreas laterais são entremeadas de regiões esbranquiçadas e escuras; os festões laterais são esbranquiçados e o central escuro; coxa I com dois espinhos muito curtos, sendo o interno vestigial, e o externo menor que 1/5 da altura da coxa	<i>A. scutatum</i>

	<p><i>A. albopictum</i></p>
<p>24. Escudo castanho escuro, bem ornamentado, com manchas esverdeadas e numerosas pontuações grandes, irregularmente distribuídas; coxa I com dois espinhos curtos e largos; o espinho da coxa IV geralmente é curto correspondendo a 1/3 do comprimento do artigo, com raras exceções em que pode ser tão longo quanto o comprimento do artigo. Espécie grande (acima de 0,5 cm)</p>	<p><i>A. varium</i></p>
<p>Escudo castanho-claro fracamente ornamentado, com algumas manchas esbranquiçadas e pouco distintas no terço posterior, delimitando a região central em um contorno linear dando aspecto de um pseudoescudo de fêmea; numerosas pontuações pequenas, regularmente distribuídas; coxa I com dois espinhos finos e pontiagudos. Espécie pequena (menor que 0,5 cm)</p>	<p><i>A. pacae</i></p>
<p>25. Festões normais sem tubérculos ventrais quitinosos nos ângulos internos</p>	<p>26</p>
<p>Festões com tubérculos quitinosos dispostos ventralmente nos ângulos internos; escudo castanho claro, com manchas amareladas ou acobreadas; coxa I com espinho externo fino e alongado, o interno curto e largo alcançando a 1/2 do comprimento do externo</p>	<p><i>A. naponense</i></p>
<p>26. Palpos normais, o artigo II com uma projeção dorsal; córnua longas; escudo castanho-claro, com manchas esbranquiçadas, que nos campos laterais apresentam o aspecto de um “Y”; coxa I com dois espinhos fortes e 60 subiguais, coxa IV com um espinho pontiagudo, tão longo quanto o artigo; escudo ornamentado com manchas esbranquiçadas</p>	<p><i>A. calcaratum</i></p>
<p>Palpos muito nodosos, o artigo II com uma projeção dorsal e uma forte prega oblíqua, artigo I com uma extensão látero-ventral; córnua longas; escudo castanho, com algumas manchas esbranquiçadas, que nos campos cervicais apresentam o aspecto de um “J”; coxa I com dois espinhos longos e grossos, sendo o externo ligeiramente menor que o interno</p>	<p><i>A. nodosum</i></p>

27.	Coxa IV com um espinho	28
	Coxa IV com dois espinhos	31
28.	Escudo com ornamentação	29
	Escudo não ornamentado, castanho escuro nas regiões anteriores laterais, com pontuações profundas, grandes, regularmente distribuídas; coxa I com dois espinhos fortes e subiguais, correspondendo a 1/3 do comprimento do artigo; coxa IV com um espinho curto, não ultrapassando 1/4 do comprimento da coxa artigo	<i>A. goeldii</i>
29.	Coxa IV com um espinho curto, menor que a metade do comprimento do artigo	30
	Coxa IV com um espinho muito longo, igual ou maior que o comprimento do artigo, coxa I com dois espinhos longos e fortes, em forma de pinça, o externo mais fino; escudo castanho, com manchas esbranquiçadas e pontuações grandes e numerosas, irregularmente distribuídas	<i>A. multipunctum</i>
30.	Escudo castanho bem claro, sem ornamentação, embora na região mediana exista uma linha suave, mais clara, formando um pseudoescudo de fêmea; coxa I com dois espinhos muito curtos e bem separados; sulco marginal ausente	<i>A. pictum</i>
	Escudo castanho-claro com manchas pardas pouco evidentes nas regiões anteriores laterais, com pontuações pouco abundantes, grandes e profundas nas laterais; coxa I com dois espinhos curtos, o interno ligeiramente mais curto do que o externo e apresentando um tubérculo forte e esclerotizado, situado anterior e medianamente aos espinhos	<i>A. fuscum</i>
31.	Placa espiracular normal e sem bordos festonados, escudo castanho com manchas esbranquiçadas, às vezes pouco visíveis, salvo duas manchas lineares situadas nas zonas escapulares; coxa I com dois espinhos subiguais, curtos e arredondados, não alcançando um terço do comprimento do artigo	<i>A. humerale</i>
	Placa espiracular grande e com bordos festonados; escudo castanho claro, elevado na região central mediana, fracamente ornamentado e pontuado, apresentando duas manchas pardas longitudinais que contornam a elevação central e outras manchas menores menos evidentes	<i>A. romitii</i>

**Fêmeas**

1.	Coxa IV com um só espinho	2
	Coxa IV com dois espinhos, em geral curtos	22
2.	Hipostômio 3/3 (exceto em <i>A. dubitatum</i> que pode ter denteção 4/4 da base até a metade do hipostômio e 3/3 da metade ao ápice)	3
	Hipostômio 4/4 ou 5/5	26
3.	Coxa I com dois espinhos evidentes	6
	Coxa I com dois espinhos, porém o interno vestigial	4
4.	Espinho externo da coxa I longo, ultrapassando a metade do artícolo	5
	Espinho externo muito curto, não ultrapassando a 1/5 do comprimento do artícolo, escudo castanho-claro, com manchas esbranquiçadas pouco evidentes nos campos cervicais e bordo posterior, com pontuações profundas nos campos laterais; áreas porosas grandes, arredondadas e separadas	<i>A. albopictum</i>
5.	Festões com mamilos quitinosos nos ângulos internos; banda marrom central do escudo contínua, não sendo interrompida na porção posterior por uma mancha esbranquiçada; presença de espinho nos pré-tarsos	<i>A. triste</i>
	Festões sem tubérculos nos ângulos internos; banda marrom central do escudo interrompida na porção posterior por uma mancha esbranquiçada; presença de espinho nos pré-tarsos	<i>A. tigrinum</i>
6.	Trocâter com espinhos	7
	Trocâter sem espinhos	9
7.	Escudo fracamente ou não ornamentado	8
	Escudo ornamentado, de bordos sinuosos, com manchas esbranquiçadas evidentes nos campos laterais; presença de um forte espinho retrógrado ventral no artícolo I do palpo. Espécie pequena	<i>A. pseudoconcolor</i>

8.	Escudo fracamente ornamentado apresentando raras manchas esbranquiçadas nos campos cervicais, com bordos sinuosos; coxa I com dois espinhos curtos, fortes e separados, quase do mesmo comprimento, sendo o externo ligeiramente maior que o interno, correspondendo a 1/3 do artículo; presença de um espinho retrógrado ventral no artículo I do palpo	<i>A. auricularium</i>
	Escudo sem ornamentação, castanho-claro, de bordos sinuosos; espinhos da coxa I muito desiguais e separados, o interno correspondendo a menos de 1/3 do comprimento do externo; presença de espinho retrógrado no artículo I do palpo	<i>A. parvum</i>
9.	Hipostômio espatulado	10
	Hipostômio longo e lanceolado; escudo alongado, ornamentado com manchas acobreadas a esverdeadas, que na porção mediana, formam um desenho de losango; base dorsal do capítulo subtriangular; coxa I com dois espinhos curtos. Espécie de tamanho médio antes de ingurgitar e muito grande quando ingurgitada	<i>A. longirostre</i>
10.	Coxa I com dois espinhos maiores que o comprimento do articulo	11
	Coxa I com dois espinhos mais curtos que o comprimento do articulo	12
11.	Coxa I com dois espinhos muito longos, contíguos, o externo pouco maior que o interno, terminando em ponta aguda e ligeiramente encurvada para fora; escudo apresentando uma mancha central que vai desde a porção anterior até a posterior e outras bem menores nos campos laterais, todas de coloração esverdeada a acobreada	<i>A. ovale</i>
	Coxa I com dois espinhos muito longos, subiguais e contíguos, o externo terminando em ponta reta; escudo castanho-claro, predominando o colorido amarelo dourado	<i>A. aureolatum</i>
12.	Com tubérculos ou mamilos quitinosos nos ângulos internos dos festões	13
	Sem tubérculos quitinosos nos festões	14

13.	Hipostômio curto; escudo com bordos laterais castanhos e centro acobreado, com pontuações largas e superficiais mais numerosas nas porções laterais, entremeadas de outras finas na porção posterior; coxa I com dois espinhos desiguais, sendo o interno largo, atingindo a metade do comprimento do externo que é longo e pontiagudo	<i>A. naponense</i>
	Hipostômio longo; escudo com bordos castanhos e centro esbranquiçado; face dorsal e ventral pilosa; ápice dos festões com pequenos tubérculos quitinosos mamiliformes no ângulo interno; espinhos da coxa I desiguais, separados e pontiagudos	<i>A. cajennense</i>
14.	Forte prega oblíqua de posição dorsal no artículo II do palpo	15
	Artículo II do palpo normal	16
15.	Escudo castanho-escuro, com manchas acobreadas, que nos campos laterais lembrando um “Y”; áreas porosas menores e distantes duas vezes o diâmetro de uma delas; coxa I com dois espinhos longos e largos, o externo ligeiramente menor que o interno	<i>A. nodosum</i>
	Escudo com bordos laterais castanhos e manchas acobreadas amplamente distribuídas, sendo mais evidentes na região posterior; áreas porosas maiores e com distância igual ao diâmetro de uma delas; coxa I com dois espinhos moderadamente longos e separados, o externo ligeiramente menor que o interno	<i>A. calcaratum</i>
16.	Coxas II e III com uma prega no lugar dos espinhos; coxa I com espinhos curtos; fórmula dental geralmente 3/3, mas pode ser 4/4 da base até a metade do hipostômio e 3/3 da metade ao ápice; placas espiraculares grandes. Mancha esbranquiçada central do escudo interrompida na porção mediana posterior por faixa escura longitudinal	<i>A. dubitatum</i>
	Coxas II e III com espinhos evidentes	17
17.	Espinhas da coxa I muito curtos, o externo correspondendo a 1/5 do comprimento do artículo	18
	Espinhas da coxa I de comprimento médio, o externo correspondendo à quase metade do comprimento do artículo	20

18. Espécies de grandes dimensões, com idiossoma acima de 0,5 cm 19
- Espécie pequena, idiossoma com aproximadamente 0,3 cm na fêmea não ingurgitada; escudo com bordos sinuosos, castanho-claro, com manchas longitudinais lineares quase alcançando a margem posterior e manchas escuras atrás dos olhos; coxa I com dois espinhos muito curtos e arredondados, sendo o externo ligeiramente maior alcançando aproximadamente 1/5 do comprimento do artícuo, e o interno vestigial *A. scutatatum*
19. Escudo castanho-claro, com manchas esverdeadas pouco evidentes nos campos cervicais e bordo posterior; coxa I com dois espinhos muito curtos e arredondados, sendo o externo maior que o interno, correspondendo a 1/4 do comprimento do artícuo *A. geayi*
- Escudo castanho claro, com manchas acobreadas irregulares no centro estendendo-se até o bordo posterior lembrando um losango e nos campos cervicais; coxa I com dois espinhos muito curtos e arredondados, sendo o externo maior que o interno, correspondendo a 1/4 do comprimento do artícuo *A. parkeri*
20. Espinhos da coxa I, largos, fortes e separados, ambos de comprimento médio, o externo, ligeiramente maior que o interno, correspondendo à metade do comprimento do artícuo; escudo muito ornamentado, com manchas esbranquiçadas que cobrem quase toda a superfície, sendo mais evidentes na região posterior *A. coelebs*
- Espinhos da coxa I, finos 21
21. Escudo castanho avermelhado, fracamente ornamentado, apresentando duas manchas pardas na porção posterior; palpos longos e delgados; espinho interno da coxa I correspondendo a 2/3 do comprimento do externo que termina em ponta afilada voltada para fora *A. pacae*
- Escudo castanho claro, com uma mancha acobreada na região posterior lembrando um triângulo, e manchas longitudinais nos campos cervicais estendendo-se posteriormente; palpos longos e delgados; coxa I com dois espinhos finos, sendo o interno mais largo e ligeiramente menor que o externo *A. oblongoguttatum*

22.	Hipostômio 3/3	23
	Hipostômio 4/4 (exceto <i>A. romitii</i> que pode apresentar dentição variando de 4.5/4.5 a 5.5/5.5)	24
23.	Escudo castanho, ornamentado com manchas longitudinais acobreadas nos campos laterais e entre os sulcos cervicais, com doze pontuações muito grandes e profundas, principalmente atrás dos olhos, entremeadas por outras menores que também estão presentes na região mediana central; a mancha acobreada central é bem evidente e se estende até o bordo posterior; coxa I com dois espinhos curtos, fortes e separados, o externo ligeiramente maior que o interno; coxas II-IV com dois espinhos, sendo que o interno das coxas III e IV é reduzido a um tubérculo	<i>A. dissimile</i>
	Escudo castanho claro, ornamentado com manchas suaves nas laterais e na região central, sendo mais esbranquiçadas no bordo posterior; com poucas pontuações grandes, concentradas principalmente nas porções laterais anteriores, e outras pequenas, mais numerosas; coxa I com dois espinhos subiguais, curtos e arredondados; coxas II-IV com dois espinhos, também arredondados	<i>A. rotundatum</i>
24.	Ausência de tubérculos quitinosos nos ângulos internos dos festões	25
	Presença de tubérculos quitinosos nos ângulos internos dos festões, exceto no central; espinhos da coxa I, fortes, o interno correspondendo a 2/3 do externo que, por sua vez, tem a metade do comprimento do artículo; os espinhos internos das coxas II-IV são muito curtos e pouco evidentes; escudo muito ornamentado com manchas esbranquiçadas que cobrem quase toda a superfície	<i>A. brasiliense</i>
25.	Escudo castanho-escuro, com duas manchas escapulares alongadas, paralelas aos bordos laterais e uma mancha arredondada limitada ao bordo posterior; aloescudo não piloso; palpos muito longos; espinhos curtos e arredondados similares em todas as coxas	<i>A. humerale</i>

	Escudo castanho claro, elevado na porção central entre os sulcos cervicais, ornamentado com manchas pardas a esbranquiçadas, mais evidentes no bordo posterior; olhos grandes e convexos; palpos longos; aloescudo densamente piloso; espinhos internos das coxas muito curtos e arredondados, sendo ligeiramente maiores nas coxas I e IV; placas espiraculares muito grandes e com as margens festonadas	<i>A. romitii</i>
26.	Hipostômio 4/4	27
	Hipostômio 5/5 ou 4/5; escudo castanho-escuro com a ornamentação restrita a uma mancha na região posterior; base dorsal do gnatosoma retangular, córnua suaves; artigo I dos palpos com espinho retrógrado; coxa I com dois espinhos longos e fortes, em forma de pinça, sendo o externo mais fino e ligeiramente mais curto que o interno	<i>A. multipunctum</i>
27.	Com tubérculos ou mamilos quitinosos nos festões	28
	Sem prolongamentos ou tubérculos quitinosos nos festões	30
28.	Escudo castanho escuro com campos laterais elevados posteriormente aos olhos	29
	Escudo sem elevações laterais posteriormente aos olhos, e com ornamentação branco-amarelada, distinta, em toda a sua superfície; coxas I com espinhos fortes, subiguais e separados	<i>A. incisum</i>
29.	Escudo castanho escuro com grandes pontuações irregularmente distribuídas, ornamentado, apresentando uma mancha branco-amarelada na porção central entre os sulcos cervicais, estendendo-se ao bordo posterior onde se torna mais acentuada; porções laterais elevadas, de coloração castanho-escuro, entremeadas por manchas menores esbranquiçadas; espinhos das coxas I, longos, subiguais, o interno mais largo que o externo que é quase tão longo quanto o comprimento do artigo	<i>A. latepunctatum</i>
	Escudo castanho escuro, com ornamentação constituída primariamente por uma mancha arredondada branco-amarelada no bordo posterior; com elevação lateral nítida posteriormente aos olhos; coxas I com espinhos fortes, subiguais e separados	<i>A. sculpturatum</i>

30.	Escudo ornamentado	31
	Escudo sem ornamentação, castanho escuro brilhante, com numerosas pontuações uniformemente distribuídas; coxa I com dois espinhos subiguais, fortes e longos, correspondendo a 1/3 do comprimento do artigo	<i>A. goeldii</i>
31.	Presença de um tubérculo fortemente esclerotizado situado anteriormente e medianamente aos espinhos regulares da coxa I, os quais são curtos, subiguais, separados; escudo castanho-claro fracamente ornamentado com manchas pardas pouco evidentes, visíveis somente em espécimes vivos, apresentando cerca de 30 pontuações grandes e numerosas nas porções laterais	<i>A. fuscum</i>
	Ausência de um tubérculo fortemente esclerotizado situado anteriormente e medianamente aos espinhos regulares da coxa I; escudo com manchas amareladas ou esverdeadas	32
32.	Escudo de bordo castanho escuro, muito ornamentado apresentando manchas brancas por quase toda a superfície e grandes pontuações nas regiões laterais; base dorsal do gnatossoma retangular, com córnua suaves; coxa I com espinhos grossos, afastados e de mesmo comprimento	<i>A. pictum</i>
	Escudo castanho-escuro com manchas esverdeadas a acobreadas; base dorsal do gnatossoma retangular, com córnua arredondadas não salientes; coxa I com dois espinhos curtos, largos e fortes, sendo o externo ligeiramente maior que o interno, correspondendo 1/3 do comprimento do artigo. Espécie muito grande, podendo atingir acima de 3 cm de diâmetro quando ingurgitada	<i>A. varium</i>

### Subgênero e espécies do gênero *Rhipicephalus*

Este gênero de carrapatos inclui, até o momento, apenas duas espécies no Brasil, *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Esta última espécie manteve sua posição taxonômica anterior de gênero mudada para subgênero, contudo, diversos autores deixam de citar o subgênero. Como curiosidade o seu nome tem um significado particular, sendo “Boo” = boi, “philus” = amigo, “micro” = pequeno e “plus” = mais, resultando disso que este carrapato seria “o melhor amigo do boi”.

A espécie *R. sanguineus* parasita principalmente cães, mas pode infestar diversos animais silvestres (FERNANDES et al., 2010) e, muito raramente, o homem. Em comparação com outras espécies de carrapatos é considerada como sendo de tamanho pequeno a médio. Os machos medem de 1,7 a 2 mm e as fêmeas de 2,5 a 12 mm (quando

ingurgitadas). Devido à sua forte associação com cães este carrapato é, popularmente, conhecido como “carrapato-vermelho-do-cão” e os patógenos que pode transmitir aos cães podem tornar-se, muitas vezes, letais aos mesmos.

Sob o ponto de vista econômico, *R. microplus* causa grandes prejuízos à pecuária, sendo que a estimativa dos seus danos anuais no Brasil foi calculada em US\$ 3,24 bilhões por Grisi et al. (2014). Esta espécie infesta, especialmente, bovinos, mas pode ocorrer, também, em outros hospedeiros, tanto silvestres quanto domésticos, podendo constituir-se em problema, por exemplo, para a criação de ovinos deslançados em pastagens muito próximas ou compartilhadas com bovinos infestados (KOLLER et al., 2015). Os machos são de tamanho pequeno, entre 1,5 e 2 mm e, as fêmeas, medem entre 2,35 e 13 mm (depois de ingurgitadas).

As características morfológicas externas básicas para estas duas espécies são:

### *Rhipicephalus sanguineus*

Em *R. sanguineus* o idiossoma apresenta-se com coloração marrom escura em ambos os sexos. Os olhos são um pouco convexos. Não há presença de ornamentação nos escudos. Contudo, no macho estão presentes três sulcos na porção posterior do escudo e, ventralmente, quatro placas adanais, sendo duas internas e bem desenvolvidas e, as demais, externas e rudimentares. Os espinhos das coxas são, em geral, similares em ambos os sexos, porém mais desenvolvidos na coxa IV dos machos. No capítulo a base dorsal tem formato hexagonal; os palpos e o hipostômio são curtos e a dentição é 3/3.

### *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Apresenta escudo liso na porção dorsal do idiossoma, de coloração geralmente castanha. Nesta espécie os machos apresentam uma projeção caudal, e as fêmeas ostentam espinhos bem desenvolvidos na coxa I. O capítulo é curto, possuindo base hexagonal, e os palpos um pouco mais curtos do que o hipostômio. A dentição do hipostômio pode ser 5/5 ou, eventualmente, 4/5. Esta espécie não apresenta festões. As placas espiraculares possuem formato oval e não diferem entre os sexos. Na porção lateral do poro anal dos machos existem dois pares de placas adanais.

---

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. **Carrapatos de importância médico-veterinária da região neotropical: um guia ilustrado para identificação de espécies**. São Paulo: VOX/ICTTD-3/ Butantan, 2006. 223 p.
- FERNANDES, J. I.; CORREIA, T. R.; RIBEIRO, F. A.; CID, Y. P.; TAVARES, P. V.; SCOTT, F. B. Eficácia in vitro do nim (*Azadirachta indica*) no controle de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**, v. 32, n. (Supl. 1), p. 64-68, 2010.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- KOLLER, W. W.; GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R.; REIS, F. A.; AGUIRRE, A. A. R.; BARROS, J. C.; MATIAS, J. **Carrapatos em ovelhas deslançadas e suas implicações**. -- Dados eletrônicos -- Brasília, DF: Embrapa, 2015. 6p. (Embrapa Gado de Corte. Comunicado Técnico, 130).

- MARTINS, T. F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Nymphs of the genus *Amblyomma* (Acari: Ixodidae) of Brazil: descriptions, redescrptions, and identification key. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 1, n. 2, p. 75-99, 2010.
- ONOFRIO, V. C.; LABRUNA, M. B.; PINTER, A.; GIACOMIN, F.G.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Comentários e chaves para as espécies do gênero *Amblyomma***, pp. 53-113. In: BARROS-BATTESTI, D. M.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. Carrapatos de Importância Médico-Veterinária da Região Neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. São Paulo: Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006.
- ONOFRIO, V. C. **Revisão do gênero *Amblyomma* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae) no Brasil**. Doutorado em Ciências Veterinárias, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2007, 174p.



CAPÍTULO

2



**Métodos de  
contenção de  
animais para coleta  
de carrapatos**

*Vinicius da Silva Rodrigues  
Namor Pinheiro Zimmermann  
Marcos Valério Garcia  
Francisco Tobias Barradas Pina*





## INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da humanidade os animais fascinam os seres humanos e, até hoje, os homens buscam o domínio sobre eles, quer sejam como alimento, transporte, trabalho ou companhia, criando assim uma próxima convivência. Vale ressaltar que quase todos os vertebrados terrestres são parasitados, especialmente, por carrapatos e que esses ectoparasitas comumente são vetores de uma grande variedade de agentes patogênicos.

Os carrapatos transmitem uma maior variedade de microrganismos patogênicos do que qualquer outro grupo de artrópodes e estão entre os vetores das doenças mais importantes que afetam animais e seres humanos (JONGEJAN; UILENBERG, 2004).

Exemplos clássicos são as bactérias do gênero *Rickettsia* (*Rickettsia rickettsii* e *Rickettsia parkeri*) responsáveis pela Febre Maculosa em humanos e também os agentes da Tristeza Parasitária Bovina, que é causada pela riquetsia *Anaplasma marginale* e pelos protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*.

Por esses motivos existe um interesse em se estudar esses artrópodes tanto por causa da saúde humana quanto da saúde animal. Para tal finalidade esse capítulo abordará algumas técnicas de contenção animal para coleta de carrapatos. Isso não impede, porém, que tais métodos não possam ser empregados para outras finalidades de manejo animal.

Para uma eficiente coleta de carrapatos com finalidade de pesquisa, ou simples retirada e limpeza de ectoparasitos de animais domesticados ou selvagens, há necessidade de se realizar uma correta contenção. Para tal pode-se utilizar tanto métodos de contenção físicos quanto químicos.

Os métodos de contenção são empregados visando o bem estar dos animais, proporcionando a eles o mínimo de estresse, mas também visam proteger a integridade física deles e das pessoas que irão manipulá-los.

Os hospedeiros devem permanecer imóveis, pois só assim será possível uma eficiente coleta dos ectoparasitos.

Os carrapatos retirados dos animais podem ter diferentes destinos após a coleta. Por esse motivo todos devem ser coletados com o máximo de cuidado a fim de que nenhuma estrutura do ectoparasito seja danificada, assegurando que os mesmos não venham a morrer antes de efetuadas as investigações de interesse, ou mesmo que haja prejuízo em estruturas necessárias para a respectiva identificação.

Por exemplo, a retirada do carrapato merece um cuidado especial para evitar a perda do hipostômio (parte do aparelho bucal dos carrapatos que é introduzida na pele dos animais), estrutura essa importante no auxílio para identificação do espécime coletado. Para tanto os hospedeiros devem permanecer imóveis ou com mínima movimentação e, além disso, o desprendimento dos carrapatos deve ser cuidadoso, lento, executando-se uma leve torsão do parasito enquanto for puxado.

O mesmo cuidado deve ser observado se a coleta consiste somente na retirada do carrapato com o intuito de limpeza mecânica do animal, porque a parte do parasita que ficar na pele do animal pode causar lesões ou reações indesejáveis. Portanto é necessário e de grande importância uma correta contenção dos animais para a coleta dos carrapatos.

## Coleta em animais domésticos

Cada espécie animal tem suas particularidades em relação aos métodos de contenção. Nesse contexto foram listados abaixo alguns métodos utilizados para uma eficiente imobilização do animal, segundo Feitosa (2008) e Novaes (1990).

### Bovinos

O carrapato-do-boi (*Rhipicephalus microplus*) pode estar distribuído em toda a extensão do corpo dos animais, porém maiores concentrações podem ser observadas em algumas regiões como a barbela e região posterior. Em animais dóceis, como é o caso de vacas leiteiras acostumadas ao manejo diário, os carrapatos podem ser facilmente coletados sem que haja risco para a pessoa que estiver coletando.

Os carrapatos podem ser coletados até mesmo na sala de ordenha, onde os animais estão acostumados a permanecer por algum tempo, quando já se encontram contidos, facilitando a retirada. Deve-se, porém, ter cuidado especial no caso de animais arredios, pois a coleta torna-se mais difícil e os riscos para a ocorrência de acidentes são maiores. Portanto, reforçamos que as coletas sejam realizadas após uma correta contenção.

Geralmente os animais destinados ao corte têm pouco contato com pessoas, por serem manejados apenas algumas poucas vezes no ano, por exemplo, no período de vacinação da febre aftosa do rebanho. Como estes animais são arredios, e o acesso a algumas regiões onde esses carrapatos estão presentes não é fácil, pode haver riscos à pessoa que estiver fazendo a coleta, tais como: coices, chifradas ou qualquer outro método de defesa empregado pelo animal. Os métodos de contenção também podem ser empregados na aplicação de carrapaticidas.

Na falta de um tronco de contenção adequado alguns métodos alternativos podem ser utilizados, como por exemplo, a colocação de peias. Isso contribuirá para que a coleta de carrapatos se torne mais segura, tanto para o animal quanto para o ser humano.

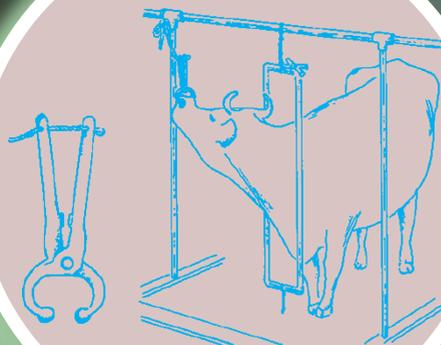
### Colocação de peias

- Faça uma laçada para prender os dois membros posteriores na altura do jarrete com uma corda comprida ( $\pm 1,5\text{m}$ ).
- Junte os membros, tracionando-se as extremidades da peia.
- Faça outra laçada e cruze uma das extremidades – a outra deve ficar segura por uma das mãos por sobre as laçadas feitas, passando, em seguida, por baixo das mesmas.
- Cruze as extremidades.
- Faça um nó de fácil retirada.

### Utilização da “formiga”

Consiste de um instrumento metálico que é colocado entre as narinas do animal e deve ser segurado por uma pessoa auxiliar. A formiga geralmente é utilizada em animais bravios, os quais poderão ser mantidos imóveis, em virtude da dor na região nasal provocada por esse instrumento (Figura 2.1).

**FIGURA 2.1.** Contenção de bovinos com o uso da “formiga”.  
Fonte: NOVAES, 1990.



### *Derrubamento de bovinos*

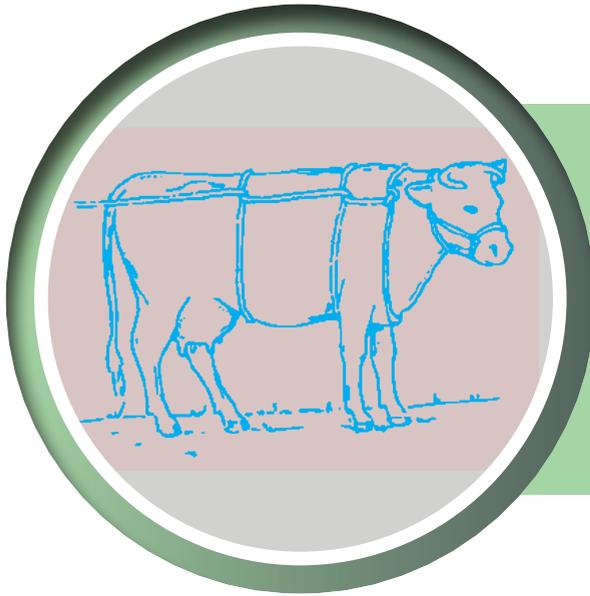
#### *Método de Rueff*

- Fixam-se ambas as extremidades dos chifres em suas bases ou no pescoço por um laço com nó escorregadio.
- Com uma das mãos se segura uma corda sobre o tórax do animal, passando-se sua extremidade por baixo da região ventral do tórax no sentido oposto ao corpo, levando-a, em seguida, novamente por cima e por dentro da parte da corda que está sendo segura.
- Repete-se a mesma operação na altura dos flancos, saindo, a ponta da corda, para trás.
- Faz-se tração firme, lenta e contínua sobre a corda, o que fará com que o animal caia vagarosamente, acompanhado por um ajudante que segura firmemente sua cabeça (Figura 2.2).

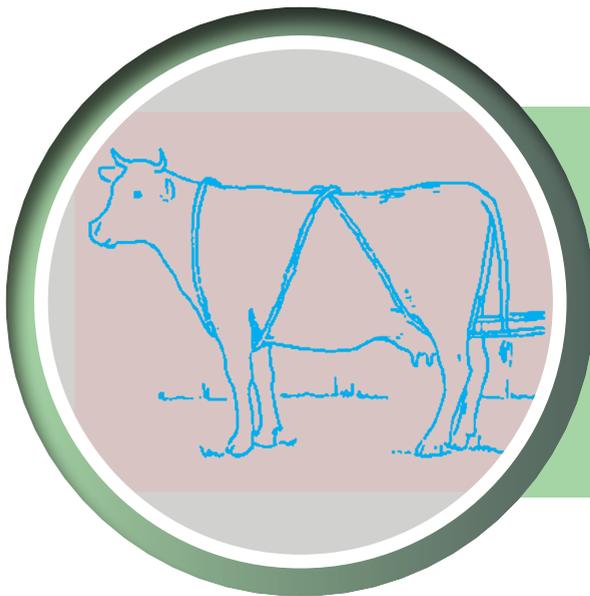
Segundo Novaes (1990) e Feitosa (2008) esse método deve ser evitado, pois a corda utilizada para o derrubamento pode lesar o prepúcio, pênis ou a veia mamária.

#### *Método Italiano*

- Passa-se metade de uma corda comprida por sobre o pescoço, na frente da cernelha, deixando o mesmo comprimento da corda livre em ambos os lados.
- Cruzam-se ambas as extremidades das cordas por baixo do pescoço e passando-as por entre os membros anteriores em direção ao dorso. No dorso – região torácica – cruzam-se as pontas das cordas e, mais uma vez, por sobre a região torácica, passando as pontas das cordas por entre os membros posteriores.
- Cada extremidade livre é puxada por uma pessoa, enquanto que um terceiro assistente segura a cabeça do animal (Figura 2.3).



**FIGURA 2.2.** Método de Rueff para derrubamento de bovinos.  
Fonte: NOVAES, 1990.



**FIGURA 2.3.** Método italiano para derrubamento de bovinos.  
Fonte: NOVAES, 1990.

## Equídeos

Os equídeos, em geral, são animais dóceis já acostumados ao manejo diário por este motivo são mais fáceis de conter. Geralmente um cabresto é eficaz e suficiente para a contenção desses animais. Porém deve-se ter cuidado especial com aqueles animais que ainda não passaram pela doma e não estão acostumados ao contato com as pessoas. Para a contenção desses animais algumas técnicas serão listadas posteriormente.

Duas espécies de carrapatos são conhecidas por acometer equídeos, *Amblyomma sculptum* (antigo *Amblyomma cajennense*), popularmente conhecido como “carrapato estrela” e *Dermacentor nitens*. *A. sculptum* parasita todas as áreas do corpo dos animais. *D. nitens*, conhecida como “carrapato da orelha dos cavalos”, é parasita preferencial do pavilhão auricular, crina, períneo e divertículo nasal (LABRUNA et al., 2002).

Altas infestações de *D. nitens* podem acarretar prejuízos zootécnicos aos animais. Essa espécie é o principal responsável por causar lesões no pavilhão auricular dos animais levando ao conhecido “cavalo com orelha troncha” ou “cavalo troncho”.

Além da necessidade de se observar toda a extensão corporal dos animais, quanto à presença dos carrapatos, deve-se, também, ter atenção ao divertículo nasal, região de difícil acesso e que os animais geralmente se sentem incomodados quando examinados.

Vale ressaltar que as duas espécies de carrapatos apresentam ciclos de vida diferentes. *D. nitens* é monóxeno, necessitando de apenas um hospedeiro para completar o seu ciclo de vida e, *A. sculptum*, heteróxico, pois necessita de três hospedeiros.

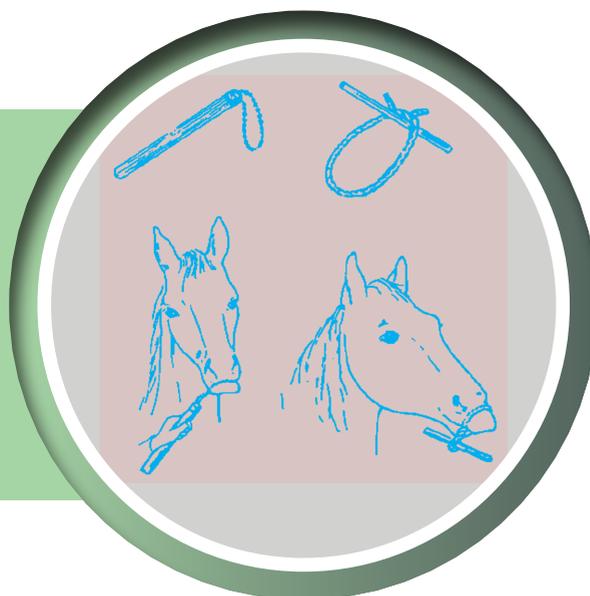
### Contenção manual

- Aprisiona-se uma dobra de pele na região da escápula e uma das orelhas do animal.

### Colocação do cachimbo ou pito

- Segure o cabo do cachimbo com a mão na qual possuir maior firmeza e agilidade.
- Coloque os dedos da mão oposta sob a laçada e segure o lábio superior, elevando-o discretamente.
- Deslize a laçada por entre os seus dedos, envolvendo o máximo que puder o lábio superior.
- Aperte a laçada rapidamente com a mão direita.
- Fique atento para possíveis reações do animal (manotadas, saltos, etc.) (Figura 2.4).

**FIGURA 2.4.** Colocação do cachimbo ou pito. Fonte: NOVAES, 1990.



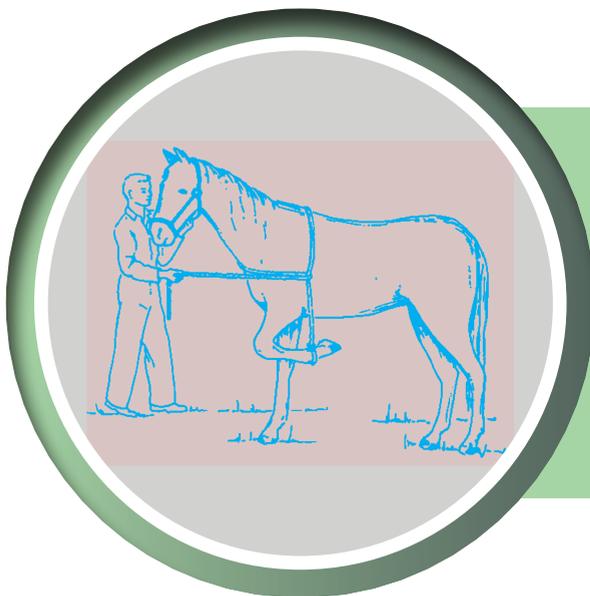
Não se deve aplicar força exagerada na utilização do cachimbo, pois com o emprego de força exagerada o animal pode tornar-se agressivo. Portanto, o cachimbo deve ser aplicado de maneira firme, aumentando a pressão gradativamente apenas até que o animal se torne cooperativo.

### *Contenção do membro anterior (mão de amigo)*

- Dê alguns tapinhas ou afagos (gentis) no pescoço ou no dorso do animal para distraí-lo.
- Com uma das mãos, desvie o peso do animal para o lado oposto que você deseja suspender.
- Posicione a outra mão na região do boleto e suspenda o metacarpo (canela) rapidamente em direção ao seu antebraço.
- Mantenha o corpo do animal desviado para o lado oposto do membro suspenso.
- Acompanhe com cuidado os movimentos do animal, evitando movimentos bruscos. Esse método também pode ser realizado com o auxílio de cordas ou peias (Figura 2.5).

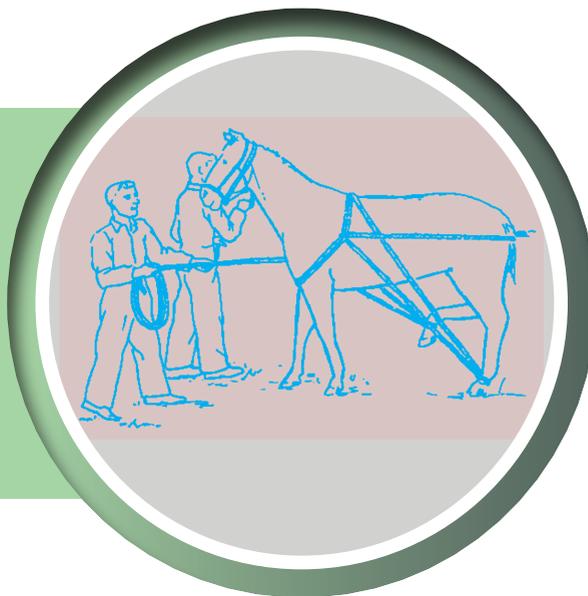
### *Contenção do membro posterior (pé de amigo)*

- Posicione-se de costas para as partes anteriores do animal.
- Com uma das mãos desvie o peso do animal para o lado oposto que você deseja suspender.
- Posicione a outra mão na região do boleto, suspenda o metatarso e desvie o membro para trás ou para frente.
- Se desviado para trás, coloque-o sobre a perna e descanse-o na coxa.



**FIGURA 2.5.** Contenção de equinos através do membro anterior (mão de amigo) utilizando-se cordas ou peias. Fonte: NOVAES, 1990.

**FIGURA 2.6.** Contenção de equinos através do membro posterior (pé de amigo) utilizando-se cordas ou peias. Fonte: NOVAES, 1990.



Cordas ou peias também podem ser utilizadas como auxiliares nesse caso (Figura 2.6). Vale ressaltar que os animais não permitem a elevação de um dos membros posteriores por muito tempo, devendo-se, em intervalos regulares, deixá-lo descansar.

### Caprinos e ovinos

Os caprinos e ovinos, por se tratarem de animais de produção de pequeno porte, são facilmente contidos manualmente. Porém, algumas técnicas são descritas para orientar a contenção dos mesmos. Alguns estudos mostram que esses animais também são importantes como mantenedores de ectoparasitos nas pastagens. Garcia et al. (2014) constataram que ovinos deslançados, que são competentes hospedeiros para o carrapato-do-boi, são capazes de manter essas populações por pelo menos três gerações.

- Montar sobre o animal e contê-lo pelos chifres ou segurando-o sob o pescoço (Figura 2.7).
- Pegá-lo pelos chifres, colar, barba ou, em último caso, pelas orelhas.
- Outra maneira seria o ajudante se posicionar lateralmente ao animal e, com uma das mãos, segurar a prega do godinho ou do flanco e, com a outra, a mandíbula do animal, mantendo-o parado.

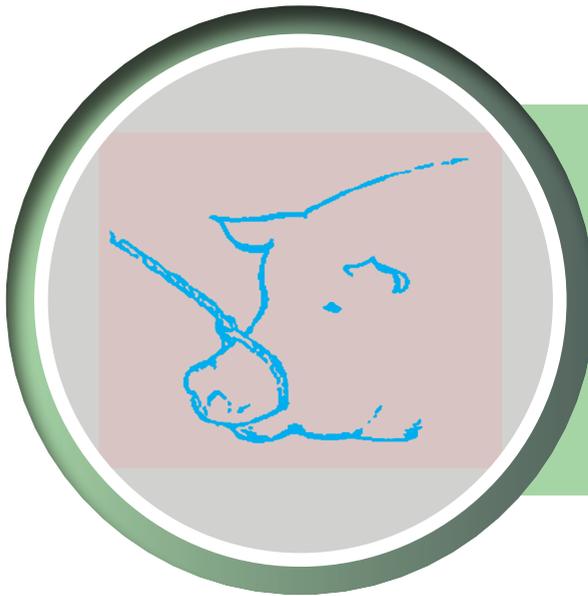
### Suínos

Os suínos, devido ao sistema de criação atualmente utilizado, são menos relatados quanto a problemas relacionados a carrapatos.

Devido à preocupação com o bem estar desses animais, e a tentativa de reduzir a agressão ao meio ambiente na produção dos mesmos, algumas fazendas estão adotando um sistema de criação no qual esses animais são alojados em piquetes ao ar livre diferentemente das granjas suínas convencionais. Esse sistema é denominado Sistema Intensivo



**FIGURA 2.7.** Contenção manual dos caprinos e ovinos. Fonte: NOVAES, 1990.



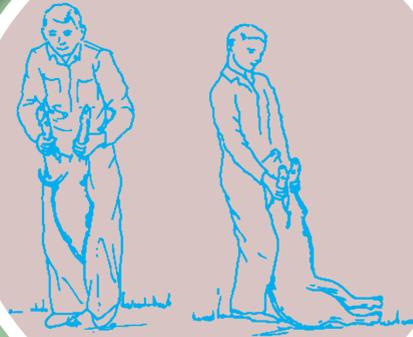
**FIGURA 2.8.** Contenção de suínos utilizando-se cordas. Fonte: NOVAES, 1990.

de Suínos Criados ao Ar Livre (SISCAL). Daí causa preocupação de que esse sistema de criação possa, no futuro, precisar de pesquisas em relação a carrapatos nesses animais.

É importante ressaltar que suínos são altamente competentes hospedeiros para algumas espécies de carrapatos (RAMOS et al., 2014).

- Animais adultos podem ser contidos com uma corda, colocada atrás dos dentes caninos e em torno do focinho, e atados a um poste ou seguros por um auxiliar (Figura 2.8).
- Leitões devem ser posicionados em decúbito dorsal com os membros anteriores esticados em direção à cauda.

**FIGURA 2.9.** Contenção manual de leitões. Fonte: NOVAES, 1990.



- A contenção de leitões e de animais um pouco maiores pode ser realizada também em uma mesa em forma de calha, ou com uma pessoa ajoelhada sobre o animal; neste caso a cabeça é contida por um auxiliar ou um laço ao redor do focinho.
- No caso dos leitões ainda podemos segurar pelos membros posteriores e o corpo do animal colocado entre as pernas da pessoa que o segura, ou então, segurar pelos membros anteriores e encostar o dorso do animal nas pernas da pessoa que o segura (Figura 2.9).

### Cães

Os cães são eficientes hospedeiros para algumas espécies de carrapatos, inclusive aqueles que são importantes vetores da Febre Maculosa Brasileira (FMB), doença letal aos seres humanos.

Cães que têm contato com áreas de matas podem ser parasitados por uma grande variedade de espécies de carrapatos (LABRUNA; PEREIRA, 2001). Vale aqui ressaltar que antes de se tentar conter cães devemos buscar informações sobre o temperamento dos mesmos. Alguns animais, por serem agressivos, necessitam de maiores cuidados para evitar possíveis acidentes.

### Mordaça

- Utilize um cordão de algodão ou tira de gaze resistente com aproximadamente 125 cm de comprimento.
- Promova uma laçada de duplo nó com o dobro do diâmetro do focinho do animal antes de sua aproximação.
- Coloque a laçada ao redor do focinho, posicionando o nó duplo acima deste. Aperte o nó e cruze as extremidades sob o queixo do cão.

- Desloque as pontas da mordaca para que elas permaneçam atrás das orelhas e amarre-as com firmeza; caso contrário, o animal conseguirá tirá-la com as patas dos membros anteriores (Figura 2.10).

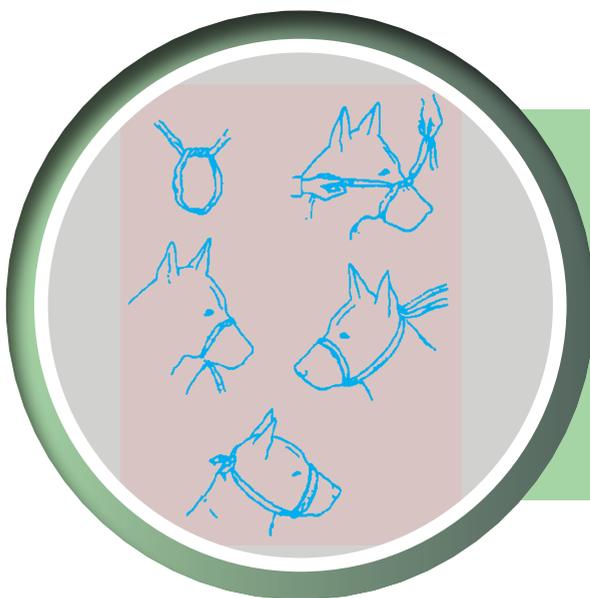
Caso, após a colocação da mordaca, for observado dificuldade respiratória, ela deve ser retirada imediatamente.

### Contenção

- Coloque o braço sob o pescoço, prendendo-o moderadamente com o antebraço.
- Passe o outro braço sob o abdome do animal, segurando o membro anterior que se encontra do mesmo lado de quem executa a contenção.

### Derrubamento

- Posicione os dois braços sobre o dorso do animal.
- Leve os braços em direção às regiões ventrais dos membros anterior e posterior (tarsos e carpo), localizados próximos ao corpo de quem executa o derrubamento.
- Puxe o animal de encontro ao corpo do executor e retire, ao mesmo tempo, o apoio dos membros que estavam presos com as duas mãos. Durante a queda, o animal deve ser amparado pelo corpo da pessoa executora, sob o risco de acidentes indesejáveis (fratura de costelas, queda da mesa de exame, etc.).
- Com o animal posicionado em decúbito lateral, prenda os membros anteriores e posteriores com as mãos, colocando os dedos indicadores entre os respectivos membros.
- Prenda a cabeça do animal com o antebraço mais próximo a ela, mantendo os membros posteriores estendidos.



**FIGURA 2.10.** Colocação da mordaca para contenção de cães. Fonte: NOVAES, 1990.

## Coleta em animais selvagens

Quanto aos animais selvagens o método correto de contenção para cada espécie animal deve ser escolhido com extrema cautela a fim de evitarem-se acidentes. São empregados tanto métodos de contenção física quanto química.

As situações de manipulação desses animais podem depender de alguns aspectos, tais como: particularidades da espécie animal; condições e segurança do animal; treinamento e seguridade da equipe; se o objetivo do procedimento utilizado é compatível com o método de contenção a ser utilizado; o local do manejo; técnicas e fármacos empregados na contenção química (zarabatana, pistola, espingarda) em determinada espécie animal; verificação prévia do material (*checklist*); fármacos de emergência, e se é possível dar total atenção ao animal após a contenção até a total recuperação dos efeitos físicos ou químicos.

Este tópico é voltado para a contenção física e química de algumas espécies de animais selvagens brasileiros, com um enfoque direcionado, principalmente, para a coleta de ectoparasitas, em especial carrapatos.

Portanto, antes da coleta de amostras nos animais, o planejamento prévio é de extrema importância para a execução bem sucedida do projeto de pesquisa a ser desenvolvido e este deve estar obrigatoriamente dentro das normas da legislação e devidamente licenciado junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), com aprovação prévia também no conselho de ética e uso de animais em experimentos.

## Répteis

O manejo de répteis deve ser baseado e determinado de acordo com a espécie e o propósito do estudo. Serpentes peçonhentas, por exemplo, podem ser capazes de infligir sérios danos à pessoa que a está contendo. Mesmo a mordida de alguns lagartos pode causar lesões.

Por isso, tornam-se imprescindíveis o uso de equipamentos de segurança pessoal e de boas práticas de manejo, entre os quais, o uso de ganchos para manejo, luvas de raspa de couro. É recomendável, para a segurança de quem manuseia o espécime e trabalhar sempre acompanhado de outra pessoa com a função de auxiliar na contenção.

### *Quelônios (cágado, jabuti, tigre d'água)*

A maioria das espécies de quelônios é, aparentemente, de fácil manipulação. O maior cuidado é o de não derrubar o animal, evitando fraturas no casco por exemplo. Em geral são animais fortes e podem esconder a cabeça e os membros no interior do casco. Alguns espécimes possuem garras e/ou mordem podendo causar lesões.

A forma mais segura de contenção física destes animais é a de segurar com ambas as mãos o casco firmemente, tendo o cuidado para não prender o dedo entre o membro locomotor e a carapaça (GIRLING; RAITI, 2004; CUBAS et al., 2006; WEST et al., 2007).

Os locais de coleta de sangue em quelônios, pouco resistentes ao manejo, são: a veia jugular direita; a veia caudal dorsal em jabutis e, opcionalmente, o corte da unha.

Em alguns animais resistentes ao manejo, a sedação é requerida para a coleta de sangue (WAPPEL; SCHULTE, 2004; CUBAS et al., 2006).

### *Lagartos (teiú, calango-verde, camaleão)*

A melhor forma de realizar a contenção física em lagartos é a de segurar com uma mão para conter os membros pélvicos mantendo os estendidos para trás, paralelamente ao corpo do animal, enquanto a segunda mão segura à parte anterior do corpo e a cabeça.

Se o animal estiver muito agitado, pode-se lançar uma toalha molhada sobre o animal e esperar que se acalme. Alguns espécimes de pequeno porte podem ser difíceis de capturar, e conter, devido à sua velocidade e agilidade, como é o caso do calango-cobra (*Copeoglossum nigropunctatum*) e da cobra-de-vidro (*Ophiodes fragilis*).

Nunca se deve agarrar um lagarto diretamente pela cauda, já que muitas espécies podem voluntariamente desprender a cauda (autotomia). Quando isso acontece o re-crescimento da cauda leva muitos meses e não apresentará a mesma coloração e padrão de tamanho da cauda original (WAPPEL; SCHULTE, 2004).

Os carrapatos geralmente são de fácil visualização nos lagartos, geralmente ficam localizadas na região ventral, entre a boca e o início do tórax, algumas larvas ficam entre as escamas desses animais. São facilmente retirados apenas com a necessidade da contenção física manual do animal.

O acesso às veias para coleta de sangue para diagnóstico laboratorial pode ser feita através da venopunção da veia jugular; veia caudal ventral; veias caudais laterais; veias braquiais e poplíteas; cardiocentese, e por corte da unha (CUADRADO et al. 2002; CUBAS et al., 2006).

### *Serpentes (jiboias, jararacas e cascavéis)*

A contenção de serpentes exige atenção e pode ser facilitada com o uso de instrumentos de manuseio.

Se as serpentes estiverem dentro de um saco de pano, por exemplo, a contenção pode ser feita antes de retirá-la do saco. Com uma das mãos segurar-se-á a cobra na região cervical, logo após a cabeça, utilizando o polegar e os outros dedos da mão, enquanto que a segunda mão segura o corpo da serpente na região próxima ao meio do corpo do animal. É importante lembrar que as serpentes podem morder através dos sacos de pano ou materiais mais finos (WAPPEL; SCHULTE, 2004).

Uma forma mais prática e segura é a utilização de ganchos ou pinças para a contenção de serpentes. As pinças de serpentes devem ser utilizadas para agarrar o animal para que este possa, em seguida, segurar a região logo após a cabeça, devendo sempre ter-se cuidado com o excesso de força na hora de segurar a serpente. Os ganchos são úteis especialmente para serpentes ágeis e de maior periculosidade.

Nas espécies mais ágeis deve-se tomar o cuidado para que a serpente não suba pelo gancho. Tubos plásticos transparentes podem ser utilizados, sendo escolhido o tubo de acordo com o diâmetro e comprimento da serpente. Os tubos são mais indicados para a contenção e exame de serpentes de pequeno a médio porte (CUBAS et al., 2006).

Serpentes com mais de dois metros de comprimento devem ser manejadas com a participação de mais de uma pessoa.

Deve-se evitar o manejo de serpentes durante o período de troca de pele (ecdise), já que a pele pode ser facilmente danificada. Recomenda-se evitar segurar a serpente pela cabeça, pois pode resultar em lesão vertebral (GIRLING; RAITI, 2004).

As espécies peçonhentas devem ser manejadas com maior precaução, mesmo em espécimes mortos, e por profissionais qualificados.

A coleta de carrapatos pode ser feita durante a contenção física sendo que estes são encontrados ao longo do corpo do animal entre as escamas. No geral as larvas requerem uma atenção maior para serem encontradas.

Os principais locais utilizados para a coleta de sangue em serpentes são: a veia caudal; coccígea caudal e palatina, e como alternativa tem-se ainda a cardiocentese. Esta última via recomenda-se que seja utilizada somente após a sedação (MITCHELL, 2004; CUBAS et al., 2006).

A anestesia injetável pode ser feita utilizando-se a associação de cloridrato de xilazina (20 mg/kg) e cloridrato de cetamina (60 mg/kg), tiletamina e zolazepam (3-5 mg/kg) (MITCHELL, 2004).

## Mamíferos

### *Canídeos brasileiros (lobinho, lobo guará e cachorro-vinagre)*

Para os canídeos, a mordedura é o método de defesa mais eficiente. No entanto, escudos, puçás, pinças para mamíferos e cambões podem ser utilizados na maioria das espécies nas diferentes situações.

Nas situações de pesquisa de campo, para a captura desses animais, podem-se utilizar armadilhas como as do tipo Tomahawk (Figura 2.11 A), que são úteis para a captura e diminuem o risco na hora da contenção. Deve-se, porém, ficar atento para o tipo de isca a utilizar (bacon, sardinha, frutas etc.) e o tamanho da armadilha utilizada dependendo da espécie a ser capturada.

A contenção química de animais em recintos ou armadilhas é feita através da administração intramuscular do fármaco. Há uma variedade de protocolos anestésicos utilizados para os canídeos.

Para a contenção química, sem a realização de procedimentos cruentos, objetivando a coleta de amostras biológicas, há algumas opções como as associações de cloridrato de cetamina (8 mg/kg), cloridrato de xilazina (0,8 mg/kg) e acepromazina (0,1 mg/kg), ou a associação de cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam (5 a 7 mg/kg) (CUBAS et al., 2006).

A coleta de carrapatos nos canídeos de vida livre é possível apenas recorrendo-se à contenção química desses animais (Figura 2.11 B). Nos recintos de animais em cativeiro é permitida em muitos casos apenas a contenção física.

Os acessos para a venopunção em canídeos mais utilizados são as veias jugular, cefálica e a safena lateral.

### *Grandes e pequenos felinos brasileiros (onça-parda, gato mourisco e jaguatirica)*

Os felinos de grande porte devem ser contidos por uma equipe de profissionais experientes, já os felinos de pequeno porte podem ser facilmente contidos de forma



**FIGURA 2.11. (A)** Armadilha do tipo Tomahawk. **(B)** Coleta de carrapatos em um lobinho (*Cerdocyon thous*) anestesiado.  
Fonte: Namor Pinheiro Zimmermann.

manual. Os pequenos felinos e a jaguatirica podem ser contidos com o uso de puçá, observando o tamanho do puçá para o tamanho da espécie.

Para a contenção química de felinos de vida livre, normalmente capturados em armadilhas ou em situações inusitadas em áreas urbanas, deve-se utilizar a via intramuscular para a administração do fármaco, de preferência um fármaco seguro e que proporcione um rápido retorno da anestesia.

Nos felinos de grande porte a aproximação só será possível após a contenção química. Sendo necessária à utilização de dardos anestésicos com auxílio da zarabatana ou mesmo armas com propulsão pneumática, dependendo da situação.

Para os pequenos felinos recomenda-se a contenção química utilizando-se a associação de cloridrato de cetamina (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina (2 mg/kg) e, em jaguatiricas, cetamina e xilazina (12 mg/kg + 1 mg/kg), com a possibilidade de usar o antagonista da xilazina, a ioimbina. Também pode ser utilizada a associação de tiletamina e zolazepam (4-7 mg/kg), porém o tempo de retorno é maior do que o protocolo anterior (CUBAS et al., 2006).

No caso de grandes felinos, como a onça-pintada e a onça-parda, são utilizadas as associações farmacológicas semelhantes as dos pequenos felinos.

Para as onças, entretanto, muda-se a dosagem da associação anestésica: cloridrato de cetamina (10 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg); cloridrato de tiletamina e

cloridrato de zolazepam (4-8 mg/kg). Para suplementação ou manutenção da anestesia pode-se utilizar a cetamina (0,2-2 mg/kg) pela via intramuscular ou endovenosa (CUBAS et al., 2006; WEST et al., 2007).

Um ponto importante é o acompanhamento do retorno anestésico em felinos que, de preferência devem ser mantidos em uma caixa de contenção ou cambiamento em um local isolado, tranquilo e arejado. Os animais devem ali ser deixados, de preferência, em decúbito esternal para facilitar a respiração.

Em geral a coleta dos carrapatos deve ser feita com os animais anestesiados. Nos pequenos felinos, em alguns casos, principalmente em animais de cativeiro, é possível à utilização da contenção física como descrito anteriormente.

A venopunção pode ser realizada por meio das veias, jugular e cefálica, nos felinos de pequeno porte, e nos de grande porte, das veias: jugular, cefálica, safena, femoral, ou a lateral da calda (CUBAS et al., 2006).

### *Ordem Xenarthra (tamanduás, preguiças e tatus)*

Para a contenção física dos Xenarthras devem ser levados em consideração detalhes da anatomia e fisiologia. Por serem animais heterotérmicos deve-se evitar a imobilização deles em dias de clima frio ou em dias de mudança brusca de temperatura (WEST et al., 2009).

A segurança do manipulador é um fator importante devido às poderosas unhas dos membros anteriores desses animais e, em algumas espécies, a sua mordida é perigosa na hora da contenção física.

A maioria dos xenartros pode ser capturada fisicamente com o auxílio de puçá, caixas de contenção e manualmente. Vale ressaltar que o tamanduá-bandeira (*Myrmecophaga tridactyla*) é o maior animal da ordem e requer experiência na sua contenção, pois o seu comportamento é imprevisível e agressivo.

Os tamanduás, em geral, podem ser contidos pela cauda. No caso do tamanduá-mirim (*Tamandua tetradactyla*) e do tamanduá-bandeira podem-se utilizar laços de corda de aço na região do carpo do animal, enquanto que outra pessoa segura a cauda como apoio.

No caso da preguiça de três dedos (*Bradypus* sp.), quando ameaçada a mesma fica paralisada, sendo facilmente contida. De modo diferente, a preguiça de dois dedos (*Choloepus* sp.), é ágil e agressiva e pode usar as unhas dos membros dianteiros para puxar e em seguida morder com os incisivos caniformes, causando sérias injúrias.

Pode-se fazer a coleta de sangue de preguiças, ou a indução da anestesia, segurando-a em decúbito dorsal com os membros anteriores estendidos lateralmente em uma superfície plana. Não é indicado o uso de laços e “enforcadores” devido às lesões que podem causar na coluna cervical.

Os tatus podem ser contidos fisicamente com luva de raspa de couro, segurando-o firmemente, nas laterais da armadura e com atenção aos movimentos das suas garras (CUBAS et al., 2006; WEST et al., 2009).

A contenção química dos xenartros requer adequado protocolo anestésico. Atenção especial à estimativa do peso, o baixo metabolismo, e o fator da armadura no peso total. As anestésias injetáveis, realizadas pela via intramuscular, devem ser feitas da melhor maneira para cada espécie, com a utilização de bastões, zarabatana e caixa de contenção.



**FIGURA 2.12.** Coleta de sangue na Preguiça-Real (*Choloepus hoffmanni*).

Fonte: Namor Pinheiro Zimmermann.

Uma variedade de fármacos tem sido usada para a contenção das espécies de tatus em condições de campo, incluindo as associações de cetamina-xilazina, tiletamina-zolazepam e cetamina e medetomidina.

Em tatus-galinhas as associações mais frequentemente usadas são o cloridrato de cetamina (40 mg/kg) e cloridrato de xilazina (1 mg/kg); cetamina (25 mg/kg) e acepromazina (0,3 mg/kg), e tiletamina e zolazepam (1,9 a 6 mg/kg). É importante o uso de atropina (0,04 mg/kg) para o controle da salivação durante a anestesia.

Em preguiças são descritas as associações de cetamina (3 mg/kg) e medetomidina (0,02 mg/kg); cetamina (5-10 mg/kg), midazolam (0,2 mg/kg), e tiletamina e zolazepam (2-6 mg/kg).

Em tamanduás têm-se descrito as associações de cetamina (5-10 mg/kg) e midazolam (0,2 mg/kg); cetamina (5-10 mg/kg) e xilazina (0,5-1,54 mg/kg), e cetamina (2-4 mg/kg) e medetomidina (0,02-0,04 mg/kg) (CUBAS et al., 2006; WEST et al., 2007; FOWLER, 2008).

A coleta de carrapatos nos xenarthras pode ser feita com a contenção física. Porém, em algumas espécies que apresentam maior risco de contenção é necessária a ajuda de auxiliares.

A coleta de sangue nos tamanduás pode ser feita pela veia jugular, cefálica ou caudal dependendo do tamanho da espécie animal. Nas preguiças, as veias de eleição para a coleta são a jugular, a braquial e a safena (Figura 2.12). Nos tatus deve-se utilizar a veia subclávia ou caudal, não sendo recomendado que se utilize a veia jugular (CUBAS et al., 2006; WEST et al., 2007).

### **Suidae (*Sus scrofa*) e Tayassuidae (*Pecari tajacu* e *Tayassu pecari*)**

Estes animais possuem caninos alongados que formam as presas, particularmente nos machos. Portanto, deve-se ter precaução com a mordida e a investida desses animais.

Os taiassuídeos, como o cateto, são rápidos e ágeis, requerendo habilidade da pessoa que faz a contenção em recintos, onde a melhor alternativa para a captura é a utilização do puçá de tamanho que permita o animal ficar totalmente dentro da malha, para que possa ser torcida ou obstruída pela borda do aro (CUBAS et al., 2006).

Taiassuídeos e suínos selvagens de vida livre podem ser capturados utilizando-se cercados (chiqueiro) de telas de alambrado ou armadilhas.

É necessário cevar o cercado até que se dê o acondicionamento do grupo ao local, quando então o chiqueiro é armado. A captura dos animais no chiqueiro pode ser feita com dardos, utilizando a zarabatana ou arma de projeção pneumática.

Os anestésicos dissociativos são os mais utilizados nos animais de vida livre. A associação tiletamina-zolazepam (2-5 mg/kg) fornece uma boa indução e imobilização para a coleta de amostras de sangue e outros procedimentos rápidos em taiassuídeos, porém, a recuperação poderá ser prolongada e agitada.

Outra associação utilizada é a de tiletamina-zolazepam (2-4 mg/kg) e xilazina (4,4 mg/kg), que pode ser revertida com a utilização de ioimbina para a reversão da xilazina e flumazenil para a reversão do zolazepam (1 mg de flumazenil para 20 mg de zolazepam IV ou IM) (CUBAS et al., 2006; WEST et al., 2007).

Em porcos selvagens com a utilização da associação de cetamina (10 mg/kg), xilazina (2 mg/kg); e midazolam (0,25 mg/kg) e a ioimbina, como reversor da xilazina, foi possível obter um período de anestesia de aproximadamente 55 minutos (Figura 2.13 A) (AJADI et al., 2008).

Nestas espécies a coleta de carrapatos (Figura 2.13 B) no campo é possível somente com os animais anestesiados. Em cativeiro, ou em recintos, é possível a contenção física com o uso de puçá.

A coleta de sangue (Figura 2.13 C) pode ser feita pelas veias jugular, femoral, cefálica, safena e auricular, os acessos vão depender do tamanho do animal, habilidade do veterinário e a contenção do animal, principalmente em porcos asselvajados onde a camada de gordura pode dificultar a localização e como alternativa para pequenos volumes pode-se utilizar a veia da cauda e as veias auriculares.

### *Cervídeos brasileiros (veado-mateiro, veado-catingueiro e veado-campeiro)*

Em cervídeos de vida livre, é importante planejar cuidadosamente a captura, pois os riscos de miopatia de captura, trauma e hipertermia são grandes. Os animais muitas vezes ficam agitados sendo de extrema importância o treinamento da equipe, conhecimento do comportamento normal dos animais e atenção às complicações que possam ocorrer.

Em cervídeos de cativeiro é necessário avaliar o animal e não fazer os procedimentos nos períodos mais quentes do dia, sendo que cervídeos em cativeiro podem, muitas vezes, apenas serem contidos fisicamente para procedimentos simples. Sempre vendar os olhos e tampar os ouvidos dos animais, tanto na contenção física como na química, para diminuir o estresse (CUBAS et al., 2006; WEST et al., 2007; FOWLER, 2008).

Entre os métodos de captura de cervídeos em vida livre está o uso de redes para a contenção dos animais. Algumas das opções descritas são as redes de direcionamento (*drive net*), rede de armação rápida, arma lançadora de redes (*Net Gun*) e *Bulldoging* (CUBAS et al., 2006).



**FIGURA 2.13. (A)** Monitoramento da anestesia em porco feral (*Sus Scrofa*). **(B)** Carrapatos em porco feral. **(C)** Coleta de sangue de porco feral.

Fonte: Namor Pinheiro Zimmermann.

Há uma grande variedade de protocolos anestésicos para a contenção química dos cervídeos. Contudo, a contenção química constitui a única maneira de se ter o acesso necessário aos animais (Figura 2.14 A).

As complicações decorrentes da contenção química em cervídeos é a ocorrência de timpanismo, hipertermia com a ocorrência de hipoxemia, acidose muscular, queda de pressão, arritmias, fibrilação cardíaca e anoxia cerebral (CUBAS et al., 2006).

Algumas das associações descritas para cervídeos são: cetamina e xilazina; cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam; cetamina, midazolam e acepromazina; xilazina e cloridrato de tiletamina e cloridrato de zolazepam; e medetomidina e cetamina (WEST et al., 2007).

Se a coleta de carrapatos nas espécies de vida livre (Figura 2.14 B) deve ser feita em animais contidos quimicamente, em algumas espécies em cativeiro a contenção física é a opção mais favorável.

Para a venopunção de cervídeos podemos usar às veias jugular, cefálica e safena.



**FIGURA 2.14. (A)** Monitoramento anestésico de um veado-campeiro macho. **(B)** Detalhe de uma fêmea de *Rhipicephalus microplus* em um veado-campeiro (*Ozotoceros bezoarticus*).

Fonte: Namor Pinheiro Zimmermann.

### *Primates (bugios, macaco-prego e saguis)*

Todas as espécies, em geral se defendem por meio de mordidas e muitas vezes arranhões. Os primatas de médio e grande porte são bastante fortes e podem puxar a roupa ou algum membro da pessoa que manipula o animal em direção à boca. Portanto não se recomenda o uso de roupas com bolsos, óculos, caneta ou outros objetos que possam ser pegos pelos macacos.

Deve-se ter em mente sempre que a captura e a contenção bem realizadas são aquelas que se preocupam com a saúde e segurança do animal e da equipe (FOWLER, 2008).

Em cativeiro, as espécies de menor porte podem ser contidas com as mãos, sendo que o contato inicial deve ser feito com luvas de couro. Muitas vezes o uso do puçá ou redes para uma contenção física inicial e em seguida a contenção com as mãos também é uma opção.

Para as espécies de maior porte, podem ser utilizadas as mesmas técnicas para as espécies de menor porte, porém pode-se utilizar zarabatana, pistolas ou rifles anestésicos.

No campo, a captura pode ser feita através do uso de armadilhas do tipo Tomahawk. O uso de pistolas ou rifles com dardos anestésicos pode ser necessário quando a contenção tiver que ser à longa distância, sendo necessária uma pessoa experiente para a função.

Uma desvantagem dessa prática são as lesões provocadas pelo impacto do dardo sobre os animais, que podem atingir acidentalmente, entre outros, a área abdominal, resultando em sérias lesões e podendo levar o animal a morte. Além disso, há também o risco de o animal anestesiado ficar preso em algum galho ou no tronco das árvores (FOWLER, 2008).

São vários os fármacos utilizados para a contenção química de primatas, muitas vezes dependendo do tipo de procedimento, duração necessária do procedimento e o tamanho da espécie.

O uso de cetamina, por exemplo, possui uma relação de quanto menor a espécie maior a dose proporcionalmente. A associação de tiletamina-zolazepam possui as dosagens de acordo com o tamanho das espécies, para espécies de menor porte 7 a 8 mg/kg; de médio porte 4 a 6 mg/kg, e de maior porte 3 a 4 mg/kg. Esta associação é descrita como excelente para imobilização, grande segurança no uso e bom retorno.

Também há as associações de cetamina (5-7,5 mg/kg) e medetomidina (0,05-0,075 mg/kg); cetamina (10 mg/kg) e xilazina (0,5 mg/kg), com a dose podendo variar dependendo do tipo de procedimento e peso do animal (CUBAS et al., 2006; WEST et al., 2007).

Em geral, os primatas de vida livre, especialmente as espécies de pequeno porte, podem ser contidos fisicamente ou quimicamente, e as espécies de maior porte sempre devem ser contidas quimicamente. Em zoológicos, ou locais onde o manejo é frequente, muitas vezes somente a contenção física de algumas espécies é o suficiente.

A coleta de sangue em primatas pode ser feita no plexo arteriovenoso inguinal, sendo, para tanto, necessária prática do veterinário que irá executar o procedimento. Pode-se coletar sangue, também, na veia cefálica e, nas espécies pequenas a médias, na veia safena na face posterior da perna.

### **Roedores silvestres (cutia, cutiarias, capivara e ouriços)**

A contenção física muitas vezes é o suficiente para muitos procedimentos para os animais mantidos em cativeiro. Em cutias (*Dasyprocta* sp.) e em cutiarias (*Myoprocta* sp.) podem-se utilizar sacos de pano, ajudando os animais a se acalmarem, pois são animais rápidos e nervosos. Os traumas mais frequentes, devido a acidentes na hora da contenção, são úlceras córneas devido à abrasão, laceração da pele, fratura dos incisivos e perda de unha.

Na contenção de capivaras (*Hydrochaeris hydrochaeris*) pode ser utilizado um puçá de grandes dimensões, e o uso de lona plástica de cor escura pode auxiliar como alternativa. O sucesso da contenção física depende da habilidade do operador. Após a contenção física do animal deve-se bloquear a sua visão com uma toalha para diminuir o estresse (CUBAS et al., 2006).

Os ouriços ou porcos-espinhos (*Coendu* sp. e *Sphigurus* sp.) são animais mais lentos, que exigem especial cuidado com os pelos modificados (hístriciformes, Figura 2.15 A) que funcionam como farpas (espinhos). Devem, por isso, ser contidos através da cauda na porção terminal (Figura 2.15 B) e mantidos sobre um galho. Nessa posição a aplicação de fármacos injetáveis poderá ser feita na musculatura da coxa, tendo como alternativa a introdução do animal em um cano de PVC onde permanecerá imobilizado (CUBAS et al., 2006).



**FIGURA 2.15. (A)** Detalhe da cauda com ausência de espinhos no Ouriço-cacheiro (*Coendou prehensilis*). **(B)** Carrapatos no espinho do Ouriço-cacheiro.  
 Fonte: Namor Pinheiro Zimmermann.

Para a contenção química, através da via intramuscular, são descritas as associações de cetamina (5-10 mg/kg) e xilazina (1-2 mg/kg); tiletamina e zolazepam (4-6 mg/kg), e cetamina (3-4 mg/kg) e medetomidina (0,03-0,04 mg/kg) (CUBAS et al., 2006).

Em capivaras de vida livre, para a coleta de carrapatos, é recomendada a contenção química, sendo suficiente a contenção física nas demais espécies.

Os acessos para a coleta de sangue dos roedores são as veias cefálica, safena, jugular e femoral. Muitas vezes, dependendo da espécie e o tamanho do animal, a predileção pelo local de acesso venoso pode mudar.

### **Anta (*Tapirus terrestres*)**

Apesar do tamanho as antas possuem uma fama de serem dóceis em ambientes de cativeiro. Em situações de vida livre o método de captura e contenção é feito através da atração do animal utilizando a ceva em estações ou armadilhas (tipo pitfall, caixas e capture pens). Todas as capturas são seguidas pela contenção química (WEST et al., 2007).

A contenção química em antas pode ser feita através de diversas associações anestésicas. A contenção química deve ser feita e calculada segundo o objetivo da contenção.

Para procedimentos simples são descritas as associações de butorfanol (0,15 mg/kg) e xilazina (0,3 mg/kg) ou medetomidina (0,05 mg/kg) via intramuscular com reversão utilizando ioimbina no caso da opção da xilazina, atipamezole no caso do uso da medetomidina e naltrexone (WEST et al., 2008).

Alguns casos de apneia durante a indução e recuperação foram descritos em antas, aparente hipotensão arterial e estados de agitação durante a recuperação anestésica (CUBAS et al., 2006).

O acesso venoso para a coleta das amostras sanguíneas, nestes animais, pode ser feito nas veias safena e cefálica ou seus ramos, e na veia jugular em se tratando de animais novos.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AJADI, R. A.; SMITH, O. F.; MAKINDE, A. F. M.; ADELEYE, O. E. Increasing ketamine dose enhances the anaesthetic properties of ketamine-xylazine-midazolam combinations in growing pigs. *Journal of the South African Veterinary Association*, v. 49, n. 4, p. 205-207, 2008.
- ASIH. American Society of Ichthyologists and Herpetologists. **Guidelines for use of live amphibians and reptiles in field research**. p. 1-12. Acesso: <http://www.asih.org/pubs/herpcoll.html>.
- CUBAS, Z. S.; SILVA, J. C. R.; CATÃO-DIAS, J. L. **Tratado de Animais Selvagens – Medicina Veterinária**. São Paulo, Brasil. Editora Roca, 2006, 1354p.
- FEITOSA, F. L. F. **Semiologia Veterinária – A Arte do Diagnóstico: cães, gatos, equinos, ruminantes e silvestres**. São Paulo, Brasil. Editora Roca. 2 ed., 2008, 735p.
- FOWLER, M. E. **Restraint and handling of wild and domestic animals**. 3rd ed., Wiley – Blackwell, 2008, 470p.
- GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R.; REIS, F. A.; AGUIRRE, A. A. R.; BARROS, J. C.; MATIAS, J.; KOLLER, W. W. Contributions of the hair sheep breed Santa Ines as a maintenance host for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 515, 2014.
- GIRLING, S. J.; RAITI, P. **Manual of Reptiles**. 2nd ed. British small animal veterinary association, p.51-62, 2004.
- JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, n. 1, p. 3-14, 2004.
- LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C. Carrapatos em cães no Brasil. **Clínica Veterinária (São Paulo)**, São Paulo, v. 6, n. 30, p. 24-32, 2001.
- LABRUNA, M. B.; KASAI, N.; FERREIRA, F.; FACCINI, J. L. H.; GENNARI, S. M. Seasonal dynamics of ticks (Acari: Ixodidae) on horses in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 105, n. 1, p. 65-77, 2002.
- MITCHELL, M. A. Snake care and husbandry. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*, v. 7, n. 2, p. 421-446, 2004.
- MORENO, A. M.; SOBESTIANSKY, J.; LOPEZ, A. C.; SOBESTIANSKY, A. A. B. **Colheita e processamento de amostras de sangue em suínos para fins de diagnóstico**. Concórdia: EMBRAPA-CNPISA, 1997. 30p. (EMBRAPA-CNPISA. Documentos, 41).
- NOVAES, A. P. **Contenção mecânica e farmacológica de animais**. São Carlos, 1990, 68p. (EMBRAPA – UEPAE de São Carlos. Documentos, 11).
- QUADRADO, M.; MOLINA-PRESCOTT, I.; FLORES, L. Comparison between tail and jugular venipuncture techniques for blood sample collection in common chameleons. **Veterinary Journal**, London, v. 163, n. 1, p. 93-97, 2002.
- RAMOS, V. N.; PIOVEZAN, U.; FRANCO, A. H. A.; OSAVA, C. F.; HERRERA, H. M.; SZABÓ, M. P. J. Feral pigs as hosts for *Amblyomma sculptum* (Acari: Ixodidae) populations in the Pantanal, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Experimental & Applied Acarology**, v. 63, n. 3, p. 393-406, 2014.
- WAPPEL, S. M. Turtle care and husbandry. *The veterinary clinics of North America. Exotic animal practice*, v. 7, n. 2, p. 447-472. 2004.
- WEST, G.; HEARD, D.; CAULKETT, N. **Zoo Animal & Wildlife Immobilization and Anesthesia**. Blackwell Publishing, Iowa, 2007.

CAPÍTULO

3

**Protocolos para  
o diagnóstico de  
doenças transmitidas  
por carrapatos pelo  
uso de biologia  
molecular**

*Zoraida del Carmen Fernández Grillo  
Renato Andreotti*





## INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes ectoparasitas hematófagos que transmitem elevado número de agentes etiológicos relacionados a zoonoses, afetando a saúde do homem, bem como dos animais domésticos e silvestres. Depois dos dípteros, os carrapatos são considerados como o segundo grupo em importância como vetores de doenças humanas e os mais importantes vetores de patógenos causadores de doenças de animais domésticos e silvestres (MASSARD; FONSECA, 2004; DE LA FUENTE et al., 2008; ANDREOTTI et al., 2011).

Certas características conferem aos carrapatos extraordinária capacidade de agirem como vetores de doenças, tais como: são persistentes sugadores de sangue, com lento e longo período de alimentação; apresentam grande espectro de hospedeiros, alta longevidade, grande potencial reprodutivo, transmissão transestadial e transovariana, além da alternativa não-virêmica por co-alimentação (MASSARD; FONSECA, 2004).

No Brasil, alguns gêneros da família Ixodidae são vetores de importantes doenças de interesse médico e veterinário. Dentre elas, destacam-se as riquetsioses e as arboviroses por serem consideradas de ameaça global. Abordaremos neste capítulo protocolos para o diagnóstico de algumas doenças causadas por riquetsias e arbovírus, que são transmitidas por carrapatos, com base na amplificação de RNA e DNA.

### As riquetsioses no Brasil

As riquetsioses constituem um grupo de doenças produzidas por bactérias Gram Negativas e intracelulares obrigatórias do gênero *Rickettsia*. Várias espécies desse gênero são relatadas como causadoras de doenças no homem e em outros hospedeiros vertebrados.

A espécie *Rickettsia rickettsii* é a que apresenta maior letalidade no mundo e é a principal causadora da febre maculosa. No Brasil, a febre maculosa brasileira (FMB) é uma doença reemergente e endêmica, com taxa de mortalidade entre 30%-50%.

No país, o maior número de notificações ocorre na região Sudeste do Brasil, onde se encontram os principais vetores e reservatórios, os carrapatos do Complexo *Amblyomma cajennense*. Porém, outras espécies de carrapatos também têm sido associadas à transmissão dessa bactéria, tais como, *A. aureolatum*, *A. dubitatum* e *Rhipicephalus sanguineus* (SARAIVA et al., 2014; BRITES-NETO et al., 2013; SZABÓ et al., 2013). O incremento no número de casos notificados, a expansão da área potencial de transmissão e a elevada taxa de mortalidade têm sido observados no país desde 1980.

A infecção é sazonal com a ocorrência de maior número de casos de febre maculosa durante o período de junho a outubro, correspondendo ao aumento da atividade dos carrapatos e, concomitantemente, ao maior contato do homem com estes artrópodes (DEL FIOLE et al., 2010).

A doença pode gerar sintomas variáveis, podendo observar-se comprometimento gastrointestinal, exantema, náusea, vômito, dor abdominal, diarreia, icterícia, manifestações renais, comprometimento pulmonar com outras complicações, manifestações neurológicas, meningite e encefalite.

O diagnóstico é difícil, principalmente nos primeiros dias, quando as manifestações clínicas podem sugerir outras doenças com sintomas similares, como: leptospirose,

dengue, hepatite viral, encefalite, infecções respiratórias, entre outras. Com o surgimento do exantema, o diagnóstico diferencial deve ser feito para outras doenças exantemáticas (BRASIL, 2010).

Os testes de ELISA e de imunofluorescência indireta (IFI), utilizados no diagnóstico sorológico de riquetsioses, apresentam elevada sensibilidade e especificidade. O teste ELISA é mais sensível do que o de IFI na detecção de baixos níveis de anticorpos presentes após a vacinação e durante a convalescência tardia. No entanto, o teste de IFI é a técnica “padrão de ouro” na maioria dos laboratórios (especificamente na detecção de anticorpos IgM) pelo fato de ser uma técnica mais econômica e de simples realização (LA SCOLA; RAOULT, 1997).

O diagnóstico laboratorial também pode ser realizado através do isolamento do agente etiológico, em ovos embrionados, em animais experimentais de laboratório e em linhagens celulares, a partir de amostras de sangue, biópsia de pele, tecido de necropsia e amostras de carrapatos (MELLES et al., 1999). Considerando que as doenças produzidas pelas riquetsias podem não ser diferenciadas através das manifestações clínicas, o isolamento do agente etiológico seguido pela caracterização molecular é de relevância na descoberta de novas cepas circulantes (LA SCOLA; RAOULT, 1997; CHOI et al., 2005). A técnica de Reação em Cadeia de Polimerase (PCR) e as análises de sequências de bases de fragmentos de genes do agente etiológico têm apresentado resultados eficientes na detecção e caracterização das espécies de riquetsias.

### **As arboviroses no Brasil**

Os arbovírus (*Arthropod-borne viruses*) são vírus mantidos na natureza mediante transmissão biológica entre hospedeiros vertebrados susceptíveis (principalmente mamíferos e aves) e artrópodes hematófagos (mosquitos e carrapatos) (FIGUEIREDO, 2007).

As arboviroses, ou doenças causadas pelos arbovírus, podem ocorrer de forma esporádica, epidêmica ou endêmica, adquirindo características regionais definidas. Estão frequentemente associadas a surtos em populações humanas e representam um problema de saúde pública com impacto econômico e social.

As arboviroses transmitidas por carrapatos podem ser produzidas por vírus pertencentes às famílias Bunyaviridae (gêneros *Bunyavirus*, *Nairovirus* e *Phlebovirus*), Flaviviridae, Asfarviridae, Orthomyxoviridae, Rhabdoviridae e Reoviridae (LABUDA; NUTTALL, 2004).

Dentre os arbovírus da família Bunyaviridae, a maioria dos vírus transmitidos por carrapatos estão dentro do gênero *Nairovirus*. O vírus da Febre Hemorrágica da Criméia-Congo é o de maior importância médica dentro desse grupo. Essa doença produz febre hemorrágica em humanos, com sintomas severos parecidos ao tifo e apresenta taxas de mortalidade superiores a 50%. Esse vírus circula em um ciclo enzoótico carrapato-vertebrado-carrapato. Apesar de já ter sido isolado em pouco mais de três dezenas de espécies de carrapatos pertencentes a sete gêneros diferentes da família Ixodidae, aparentemente os vetores mais eficientes e comuns são *Hyalomma* spp. (LABUDA; NUTTALL, 2004). O movimento dos animais de criação e a migração de aves têm um papel importante no transporte de carrapatos infectados (LANI et al., 2014).

Dentre os flavivírus transmitidos por carrapatos o vírus da encefalite do carrapato (vírus neurotrópico) endêmico da Europa e nordeste da Ásia é o de maior importância epidemiológica. É mantido na natureza entre os carrapatos ixodídeos e os mamíferos silvestres hospedeiros e, eventualmente, as aves migratórias (SÜSS, 2003; LANI et al., 2014; DE LA FUENTE et al., 2015). Os principais vetores são as espécies *Ixodes ricinus*, para o subtipo da Europa, e *Ixodes persulcatus*, para o subtipo da Sibéria (LANI et al., 2014).

Na família Reoviridae, o vírus da febre do carrapato de Colorado pertencente ao gênero *Coltivirus* é responsável pela segunda mais importante infecção causada por arbovírus no oeste do Canadá e dos Estados Unidos – o vírus do Oeste do Nilo está em primeiro lugar. O vetor principal é a espécie *Dermacentor andersoni*, embora também tenha sido isolado em *D. occidentalis*, *D. albipictus*, *D. parumapertus*, *Haemaphysalis leporispalustris* e em espécies de *Otobius*.

Os reservatórios vertebrados são os esquilos, os roedores silvestres e o porco-espinho. O homem pode padecer da doença quando picado pelo carrapato da espécie *D. andersoni* infectado. Como resultado apresentará febre, calafrios, mal-estar, linfadenopatia, dor de cabeça, conjuntivite, fotofobia, náusea, vômitos, astenia, mialgia, fraqueza e, em alguns casos, desenvolve meningite (LANI et al., 2014, RUST, 2012; LABUDA; NUTTALL, 2004).

A família Asfarviridae possui um único gênero reconhecido, *Asfivirus*, cuja espécie-tipo é o vírus da febre suína africana. É o único arbovírus conhecido com genoma DNA. Esse vírus é transmitido por carrapatos do gênero *Ornithodoros*, mais especificamente pelas espécies *O. moubata*, vetor em algumas regiões da África e sul do Saara, e *O. erraticus*, no sudeste da Europa (LABUDA; NUTTALL, 2004).

Os principais hospedeiros são o javali, o porco do mato e o porco doméstico. A transmissão entre porcos domésticos pode também ocorrer por contato direto ou ao ingerir carne ou alimentos contaminados. A doença é altamente contagiosa e afeta os suínos de todas as idades. Os sintomas podem variar dependendo do tipo de manifestação (hiperaguda, aguda, subaguda ou crônica). Na forma hiperaguda a taxa de mortalidade pode alcançar 100% (LABUDA; NUTTALL, 2004).

No Brasil, houve um primeiro surto da doença na localidade de Paracambi, no estado de Rio de Janeiro, em 1978. Os animais se infectaram pela ingestão de restos de comida de aviões procedentes de Portugal e da Espanha, países nos quais a doença existia. A partir daquele momento, 223 novos focos foram relatados em todas as regiões do país (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul). Em 1981, o Brasil foi declarado livre da doença (TOKARNIA et al., 2004). Porém, existem no país espécies de carrapato do gênero *Ornithodoros* (*O. talaje*, *O. rostratus*, *O. brasiliensis*, e *O. nattereri*) que, eventualmente, podem participar na transmissão do vírus da peste suína africana (LABUDA; NUTTALL, 2004).

O *Thogotovirus*, da família Orthomyxoviridae, é compreendido por seis vírus transmitidos por carrapatos: Araguari, Aransas Bay, Dhori, Jos, Thogoto e Upolu. No Quênia, na África e na Sicília (Itália) os *Thogotovirus* têm sido isolados de *Rhipicephalus* spp.; na Nigéria, de *Amblyomma variegatum* e, na Nigéria e Egito, de *Hyalomma* spp. (LABUDA; NUTTALL, 2004).

O vírus Aransas Bay é o único que circula no continente americano, especificamente nos Estados Unidos, e foi isolado em *Ornithodoros* spp. Em 2014 no estado de Kansas, Estados Unidos, foi isolado um novo *Thogotovirus* em paciente picado por carrapatos, que faleceu após apresentar febre, mal-estar, anorexia, dor de cabeça, vômito, diarreia, mialgia artralgia e rash maculopapular nas regiões do abdome, peito e costas. O isolado foi denominado vírus Bourbon que apresentou proximidade filogenética com os vírus Dhori e Batken (subtipo do vírus Dhoris) (KOSOY et al., 2015; LABUDA; NUTTALL, 2004).

A família Rhabdoviridae compreende seis gêneros e pelo menos seis sorogrupos não classificados em nenhum gênero. Muitos vírus do gênero *Vesiculovirus* são arbovírus, como é o caso do vírus *Isfahan* que já foi isolado de flebotomíneos e de carrapatos da espécie *Hyalomma asiaticum* (em Turcomenistão); assim como o vírus Barur do grupo Kern Canyon vírus, isolado de *Haemaphysalis intermedia* (Índia, Quênia e Somália), e o vírus Sawgrass do grupo Sawgrass vírus, isolado de *Dermacentor variabilis* e *Haemaphysalis leporispalustris* (Flórida, U.S.A.). Até o momento, não há relato de doenças associadas a estes vírus (LABUDA; NUTTALL, 2004).

No Brasil, a maioria das arboviroses que causam doenças em humanos pertence às famílias Togaviridae (gênero *Alphavirus*), Flaviviridae e Bunyaviridae. A circulação ocorre com participação de culicídeos e de vertebrados, incluindo o homem. A transmissão por carrapatos não tem sido relatada, porém, há um relato de isolamento de um *Flavivirus* em carrapatos do Complexo *Amblyomma cajennense* coletados em capivara doente da região de Matão, estado de São Paulo (FIGUEIREDO et al., 1999).

É importante ressaltar que as espécies de argasídeos e de ixodídeos, mencionadas por Labuda; Nuttall (2004) como vetores de arbovírus em diferentes localidades do mundo estão presentes no Brasil. Considerando que no Brasil há as características ambientais favoráveis em grande parte do país e, diversidade de hospedeiros vertebrados disponíveis para os carrapatos, é de grande importância a realização de pesquisas que avaliem a circulação destes agentes patógenos.

O isolamento viral em camundongos recém-nascidos, culturas celulares ou em mosquitos é o método comumente usado no diagnóstico de arbovírus. Entretanto, os métodos moleculares, especificamente baseados em RT-PCR e *Nested*-PCR, para a detecção de genoma viral, têm assumido grande importância nos últimos anos (LA SCOLA et al., 1997).

## **EXTRAÇÃO DE ÁCIDOS NUCLEICOS DE AGENTES PATÓGENOS EM AMOSTRAS DE CARRAPATOS**

Os carrapatos coletados no campo devem ser previamente identificados e armazenados em álcool 70% em temperatura ambiente ou a -80°C no freezer, até o processamento.

Com auxílio de um pistilo, cada carrapato é macerado dentro de um microtubo de 1500 µL, parcialmente em gelo, contendo 100 µL de TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1mM, pH 7,4) e 1 µL de Proteinase K (20 unidades/mg).

### **Extração de DNA**

A extração do DNA inclui duas etapas:

1. A lise das células, liberando as moléculas em uma fase aquosa que é separada dos restos celulares por centrifugação.

2. A purificação do DNA, separando-o de outras macromoléculas, tais como proteínas e RNA, utilizando solventes orgânicos (fenol, clorofórmio). O DNA, que permanece na fase aquosa, é precipitado com etanol e, posteriormente, purificado e suspenso em um buffer adequado.

Na sequência, mencionaremos alguns dos procedimentos utilizados para extração de DNA em carrapatos:

#### A. Utilização de kits comerciais

A extração do DNA das riquétsias pode ser feita utilizando os kits comerciais disponíveis, como o *DNAzol* da Invitrogen ou o *DNA easy blood and Tissue* da Qiagen, entre outros, seguindo o protocolo do fabricante.

#### B. Utilizando protocolo de lise com isotiocianato de guanidina (GT) e fenol (SANGIONI et al., 2005)

- Preparar a solução de isotiocianato de guanidina (GT), misturando: 5 mL de Tris-HCl 1 M, 10 mL de EDTA 0,5 M, 60 mg de isotiocianato de guanidina, 100 mL de água miliQ.
- Misturar partes iguais da solução GT e de fenol, um dia antes de realizar o procedimento, e incubar a 4°C, *overnight*.
- Acrescentar um volume de 450 µL da solução GT+fenol gelada em cada amostra macerada e incubar em banho de gelo por 10 minutos, agitando em vortex por 10 segundos cada 2 minutos.
- Adicionar 100 µL de clorofórmio, homogeneizando a amostra em vortex por 10 minutos e incubando-a em gelo por mais 2 minutos.
- Colocar os tubos em centrifugação a 12.000 x g por 5 minutos a 4°C.
- Transferir a fase aquosa para outro microtubo e adicionar 600 µL de isopropanol, homogeneizando por inversão manual dos tubos, 10 vezes e, incubando a -20°C *overnight*.
- Centrifugar, após o período de incubação, a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C.
- Descartar o sobrenadante e adicionar 800 µL de etanol 70%, em seguida, centrifugar a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C.
- Secar o precipitado em termobloco a 37°C por 1 hora ou a 56°C por 15 minutos. Ressuspender o sedimento em 50 µL de água ultrapura estéril e reidratar o DNA obtido em termobloco a 56°C por 15 minutos.
- Quantificar as amostras por espectrofotometria (no comprimento de onda de 260 nm) e, finalmente armazenar em freezer a -20°C.

#### Extração de RNA em Trizol (Invitrogen, UK)

- Macerar as amostras de carrapatos com pistilo, utilizando a solução TE + Proteinase K, da mesma forma que foi descrito para a extração de DNA.
- Acrescentar, após o macerado da amostra, 600 µL de Trizol e incubar na temperatura ambiente por 5 min.
- Adicionar um volume de 200 µL de clorofórmio na homogeneização, e agitar com as mãos de forma vigorosa por 15 segundos. Em seguida, incubar por 2-3 minutos à temperatura ambiente.

- Centrifugar os tubos contendo as amostras a 12.000 x g por 15 minutos a 4°C. A mistura gera três fases: a basal vermelha fenol-clorofórmio, a interfase e a superior, aquosa. O RNA se encontrará na fase aquosa.
- Transferir a fase aquosa para outro microtubo, inclinando o microtubo 45° e pipetando cuidadosamente e evitando entrar em contato com a fase orgânica (basal/interfase).
- Adicionar 0,5 mL de isopropanol 100% à fase aquosa coletada, e incubar em temperatura ambiente por 10 minutos.
- Centrifugar novamente, a 12.000 x g por 10 minutos a 4°C, sendo possível observar um *pellet* gelatinoso.
- Remover o sobrenadante, e lavar o *pellet* com 1 mL de etanol 75%. Armazenar o tubo à -20°C *overnight*.
- Agitar no vortex brevemente e centrifugar a 7500 x g por 5 minutos a 4°C. Descartar o líquido e secar o *pellet* à temperatura ambiente por 5-10 minutos. Não secar totalmente a amostra porque o *pellet* pode perder a solubilidade.
- Ressuspender o RNA em água livre de RNase, ou solução de SDS 0,5%, ou DEPC, pipetando várias vezes até dissolver bem. Incubar em banho Maria ou termobloco a 55-60°C por 10-15 minutos, ou a 37°C por 30 minutos.
- Quantificar por espectrofotometria (no comprimento de onda de 260 nm) e armazenar a -80°C.

### **PROTOSCOLOS DE AMPLIFICAÇÃO E SEQUENCIAMENTO DE FRAGMENTOS DE GENES PARA DETECÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DE RIQUÉTSIAS E ARBOVÍRUS**

A PCR e a transcriptase reversa seguida da PCR (RT-PCR), são técnicas em biologia molecular que permitem amplificar poucas cópias de um fragmento de ácido nucleico (o DNA é o molde no caso da PCR e, o RNA no caso da RT-PCR) para obter numerosas (milhares) de cópias desses fragmentos.

A técnica de sequenciamento permite conhecer a ordem das bases nucleotídicas contidas nos produtos obtidos da PCR e da RT-PCR. Posteriormente, usando softwares especializados (BLAST, CLUSTAL, entre outros) é possível analisar tais sequências e compará-las com outras disponíveis nas bases de dados (GenBank, entre outras), para assim verificar a identidade da sequência alvo.

#### **Detecção de *Rickettsia* sp. utilizando a técnica da PCR**

- Testar as amostras de carrapatos homogeneizadas com os primers CS-78F (5'-GCAAGTATCGGTGAGGATGTAAT-3') e CS-323R (5'-GCTTCCTTAAAA-TTCAATAAATCAGGAT-3') que amplificam um fragmento de 401pb do gene que codifica a citrato sintase (*gltA*), sequência conservada em *Rickettsia* sp. (LABRUNA et al., 2004), e os primers 17KDF (5'-GGAACCAGGCGGTATGAATAA-3') e 17KDR (5'-ACTTGCCATAGTCCGTCAGG-3') que amplificam um fragmento de 407 pb do gene gênero específico *htrA*.
- Realizar a PCR, já padronizada, em um volume final de reação de 25 µL, contendo 2,5 µL de tampão de PCR (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4), 0,75 µL de MgCl<sub>2</sub> 50 mM (1,5 mM), 0,5 µL de dNTP 10 mM (0,2 mM), 0,5 µL de cada primer a

10  $\mu\text{M}$  (0,2  $\mu\text{M}$ ), 0,2  $\mu\text{L}$  de DNA polimerase 5 U  $\mu\text{L}^{-1}$  (1 U), 19,05  $\mu\text{L}$  de água e 1  $\mu\text{L}$  de DNA (aproximadamente 200 ng).

- As temperaturas recomendadas, para a amplificação de ambos os fragmentos (*gltA* e *htrA*) são as seguintes: aquecimento inicial por 5 minutos a 95°C para desnaturar o DNA molde e ativar a polimerase, 40 ciclos de 95°C por 20 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 7 minutos.
- Avaliar as amostras que resultem positivas com primers que amplificam fragmentos dos genes que codificam proteínas externas de membrana das riquetsias, *ompA* (fragmento de 631 pb) [Rr190.70p- 5'-ATGGCGAATATTTCTCCAAAA-3' e Rr190.602n- 5'-AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT-3'], e *ompB* (fragmento de 862 pb) (B3-190.59- 5'CCGCAGGGTTGGTAACTGC-3' e B4-190.807- 5'-CCTTTTATAGATTACCGCCTAA-3') (LABRUNA et al., 2004).
- No caso dos primers que amplificam a sequência do gene *ompA*, realizar a PCR em um volume final de 25  $\mu\text{L}$ , contendo 2,5  $\mu\text{L}$  de tampão de PCR (200 mM Tris-HCl, 500 mM KCl, pH 8,4), 0,75  $\mu\text{L}$  de  $\text{MgCl}_2$  50 mM, 0,5  $\mu\text{L}$  de dNTP 10 mM, 0,5  $\mu\text{L}$  de cada primer a 10  $\mu\text{M}$ , 0,2  $\mu\text{L}$  de DNA polimerase 5U  $\mu\text{L}^{-1}$ , 19,05  $\mu\text{L}$  de água e 1  $\mu\text{L}$  da amostra de DNA. As temperaturas recomendadas na termociclagem são: aquecimento inicial a 95°C por 3 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 55°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, e uma extensão final a 72°C por 7 minutos (LABRUNA et al., 2004).
- Preparar para a amplificação da sequência do gene *ompB* uma reação com volume final de 50  $\mu\text{L}$ , contendo 25 pmol de cada primer, 200  $\mu\text{M}$  de dNTP, 1U de Elongase (Gibco), 2  $\mu\text{L}$  do tampão A e 8  $\mu\text{L}$  do tampão B.
- As temperaturas recomendadas são: 95°C por 3 minutos, seguido por 40 ciclos de 95°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos e 68°C por 1 minuto. Extensão final a 68°C por 1 minuto 30 segundos (ROUX; RAOULT, 2000).
- Analisar, posteriormente, um volume de 15  $\mu\text{L}$  dos produtos das PCRs em eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio (0,5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e fotodocumentar em transluminador com luz ultra-violeta.

### Detecção de arbovírus utilizando a técnica da RT-PCR

Inicialmente, recomenda-se realizar as RT-PCRs utilizando primers específicos para gênero, para posteriormente realizar a identificação do agente etiológico usando os primers espécie-específicas. Os primers gênero-específicos são mencionados a seguir:

- *Alphavirus* (M2W-F 5'-YAG-AGC-DTT-TTC-GCA-YST-RGC-HW-3'; M3W-R 5'-ACA-TRA-ANK-GNG-TNG-TRT-CRA-ANC-CDA-YCC-3') que produzirá fragmentos de 434 pb da proteína não estrutural 1 (PFEFFER et al., 1997).
- *Flavivirus* (FUIRC- 5'-TAC-AAC-ATG-ATG-GGA-AAG-AGA-GAG-AA-3'; FG1 5'-TCA-AGG-AAC-TCC-ACA-CAT-GAG-ATG-TACT-3'; FG2 5'-TGT-ATG-CTG-ATG-ACA-CAG-CAG-GAT-GGG-ACA-C-3') que gerará fragmentos de 958 pb do gene NS5 (CHANG et al., 1994; KUNO et al., 1998; FULOP et al., 1993).
- *Bunyavirus* (BUN-S 5'-AGT-AGT-GTG-CTC-CAC-3'; BUN-C 5'-AGT-AGT-ATA-CTC-CAC-3'; BS-S 5'-GTG-GGG-TCC-AAT-TTG-C-3'; BS-C 5'-TGA-ACC-CTA-TGC-ATC-T-3') que gerará fragmentos com mais de 700 pb (MORELI et al., 2002).

### Detecção de *Alphavirus* utilizando a reação de seminested-RT-PCR (PFEFFER et al., 1997)

- Realizar a reação de RT-PCR em microtubo de 0,2 µL contendo: 1 µmol de cada primer M2W e cM3W, 5 µL de RNA molde, 10 mM de KCl, 10 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 20 mM de Tris-HCl pH 8,8, 2 mM de MgSO<sub>4</sub>, 0,1% (v/v) de Triton X-100, 1 µg de albumina de soro bovino, 200 µmol de dNTP, 20 U de inibidor de RNase, 50 mM ditiotretitol, 1,25 U de Taq polimerase, 2,5 U de Taq*Extender PCR additive* y 1,8 U de transcriptase reversa, em 100 µL de volume total.
- Executar a reação de RT a 50°C por 45 minutos seguidos por incubação a 94°C por 2 minutos, 50°C por 4 minutos e 72°C por 4 minutos.
- Realizar a PCR em 35 ciclos de incubação a 94°C por 20 segundos, 50°C por 30 segundos e 72°C por 60 segundos. A elongação final deve realizar-se por 10 minutos para garantir a completa extensão dos produtos amplificados.
- Analisar a amplificação realizando eletroforese em gel de agarose (2%) e visualizar as bandas em transiluminador UV.

### Detecção de *Bunyavirus* utilizando a reação de RT-Nested-PCR (MORELI et al., 2001)

- Preparar uma mistura de 45 µL para a realização da reação RT: 5 µL de RNA molde, 0,05 mM de dNTPs, 4,5 µL do tampão (10 mM de Tris, pH 8,9, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 80 mM KCl e 0,3 M do primer BUN-C).
- Cobrir a mistura com 2 gotas de óleo mineral e aquecer a 95°C por 3 minutos, para alinhar o RNA. Colocar no gelo por 5 minutos.
- Após redução da temperatura, adicionar 10 U de inibidor de RNase e incubar por 1 hora a 37°C.
- Para a reação de PCR, adicionar no microtubo 1 U de Taq polimerase, 0,3 µM dos primers (BUN-S e BUN-C) e, 0,5 µL do tampão mencionado previamente. Adicionar água tratada com DEPC até completar 50 µL.
- Para a reação de nested-PCR, adicionar 1 µL do produto obtido na RT-PCR, 1 U da Taq polimerase, 0,5 µL do tampão mencionado previamente, 0,3 µM dos primers BS. Adicionar água tratada com DEPC até completar 50 µL.
- Observar e analisar os produtos amplificados em transiluminador UV, após realizar eletroforese em gel de agarose 1,5%.

### RT-PCR para a detecção de *Flavivirus* (BALEOTTI et al., 2003)

- Realizar a reação de RT em volume total de 12 µL. Adicionar na mistura ~1,5 µg de RNA molde, 0,5 µL (100 U) de transcriptase reversa, 1 µL (36 U) de inibidor de RNase, 1 µL (100 mM) do primer reverso (FU1RC), 1 µL (0,1 mM) de cada dNTPs, 4 µL de 5X tampão (250 mM Tris pH 8,3, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 375 mM KCl, 50 mM DTT).
- Incubar a mistura a 37°C por 1 hora.
- Realizar a reação de PCR em volume de 50 µL, contendo: 3,5 µL da mistura RT, 1,25 µL (1 U) de Taq polimerase, 1 µL (0,1 mM) de cada dNTP, 1 µL (100 mM) do primer forward (FG1), 1 µL (100 mM) do primer reverso (FU1RC), 5 µL de 10X tampão

[(Tris-HCl 75 mM pH 9,0, MgCl<sub>2</sub> 2 mM, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 20 mM)] e 37,5 µL de água tratada com DEPC.

- Realizar a amplificação nas seguintes temperaturas: 25 ciclos de, 94°C por 1 minuto, 45°C por 3 minutos e 72°C por 1 minuto.

### Reação Duplex-RT-PCR para *Alphavirus* e *Flavivirus* (BRONZONI et al., 2005)

- A mistura para a reação RT deve conter: 8 µL de RNA molde, 4 µL do tampão (250 mM Tris-HCl [pH 8,3], 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>) 1,5 µL de ditiotreitól (0,1M), 1 µL de cada primer reverso cM3W e FG2 (100 e 15 µM, respectivamente), 1 µL de dNTPs (250 µM cada um), 20 U de inibidor de RNase, 200 U da transcriptase reverse, água até completar 20 µL.
- Incubar a mistura a 42°C por 50 min e a 95°C por 5 min para inativar a enzima transcriptase reverse.
- A mistura para a reação de PCR deve conter: 8 µL de cDNA, 5 µL de tampão 10 X PCR (200 mM Tris-HCl [pH 8,4], 500 mM KCl), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µL da mistura dNTP (200 pmol) 1 µL dos primers forward M2W e FG1 (50 e 15 µM, respectivamente), 1 U da Taq DNA Polimerase, água até completar 50 µL.
- Realizar a amplificação da seguinte forma: 94°C por 2 min, 30 ciclos de 94°C por 1 min, 53°C por 1 min e 72°C por 1 min, extensão final a 72°C por 5 min, manter a 4°C.
- Analisar os produtos da PCR por eletroforese em gel de agarose 2% e visualizar em transiluminador UV.
- Para a identificação específica de *Flavivirus* e *Alphavirus*, realizar a reação de Nested-PCR utilizando os primers internos para cada espécie (Tabelas 3.1 e 3.2).
- A mistura de nested-PCR deve conter: 1 µL do produto amplificado na primeira PCR, 5 µL de tampão 10X PCR (200 mM Tris-HCl [pH 8.4], 500 mM KCl), 2 µL de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µL da mistura dNTP (200 µM cada um), µL Taq polimerase.
- No caso da nested-PCR para *Alphavirus*, adicionar 1 µL de primer reverse gênero específico cM3W na concentração de 100 µM, 1 µL do primer forward espécie específico (nEEE, nVEE, nWEE, nMAY, nAURA, na concentração 50 µM).

**TABELA 3.1. Primers específicos para *Alphavirus* (PFEFFER et al., 1997)**

ALPHAVIRUS	PRIMER	TAMANHO DO FRAGMENTO
Encefalite equina venezuelana	nVEE (+) ACG-GAG-GTA-GAC-CCA-TCC-GA	400 pb
Encefalite equina do Leste	nEEE (+)CCA-CGG-TAC-CGT-TGC-C	124 pb
Encefalite equina do Oeste	nWEE (+) GGC-GGC-AGA-CCT-GCT-GGA-A	208 pb
Aura	nAURA (+) TCA-ATG-CAC-CTT-CGA-CCA	86 pb
Mayaro	nMAY (+) GGA-AGT-TGG-CCA-AGG-C	

**TABELA 3.2. Primers específicos para *Flavivirus* (BRONZONI et al., 2005)**

FLAVIVIRUS	PRIMER	TAMANHO DO FRAGMENTO
Febre Amarela	nYF (-) TCA-GAA-GAC-CAA-GAG-GTC-ATG-T	253 pb
Sant Louis	nSLE (-) ATT-CTT-CTC-TCA-ATC-TCC-GT	232 pb
Ilhéus	nILH (-) TCC-ACC-GCT-GAT-CTG-AGC-CCG-TGA	474 pb
Rocio	nROC (-) TCA-CTC-TTC-AGC-CTT-TCG	

- Na reação nested-PCR para *Flavivirus*, adicionar 1 µL do primer FG1 (15 µM) e 1 µL do primer reverse espécie específico (nYF, nSLE, nILH, nROC, na concentração 15 µM).
- Água até completar 50 µL.

#### Detecção de *Bunyavirus* usando RT-PCR segundo Zhang et al. (2011)

- A reação pode ser realizada usando o kit Quant OneStep RT-PCR (TiangenBiotech) e os primers Stest-F1, 5'-ATG-TCA-GAG-TGG-TCC-AGG-ATT-3' e Stest-R1, 5'-AAG-GAT-TC-CCT-TGG-CCT-TCA-3'. Os componentes da reação Mix são: 10 µL de tampão 5X OneStep RT-PCR, 4µL da enzima OneStep mix, 2 µL do primer Stest-F1 (10 µM), 2 µL do primer Stest-R1 (10 µM), 5 µL do molde de RNA, e água destilada livre de RNase para um volume total volume de 50 µl. A amplificação será realizada incubando os tubos a 50°C por 30 min, aquecendo a 95°C por 15 min e realizando 35 ciclos a 94°C por 30 seg, 54°C por 30 seg, 72°C por 40 seg, com extensão final a 72°C por 10 min. Analisar os produtos da RT-PCR por eletroforese em gel de agarose 2%.

#### Detecção de *Alphavirus* e *Flavivirus* usando o protocolo da Promega, Access RT-PCR System (<https://www.promega.com.br/resources/protocols/technical-bulletins/0/access-rt-pcr-system-protocol/>).

- Em um microtubo de 0,5 mL adicione os seguintes reagentes: 10 µL Tampão da reação AMV/Tfl 5X [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 250 mM KCl, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 2,5 mM espermidina e 50 mM DTT] na concentração final 1X, 1 µL da mistura de dNTPs, 10 mM cada dNTP, 2 µL de MgSO<sub>4</sub>, 25 mM (concentração final 1 mM), 50 pmol de cada primer, forward e reverse 50 pmol (concentração final 1 µM), 1 µL de Transcriptase Reversa AMV, 5U/µL (concentração final 0,1U/µL), 1 µL de Tfl DNA Polimerase, 5u/µL (concentração final 0,1 u/µL), amostra de RNA (concentração final 10<sup>3</sup>-10<sup>6</sup> cópias), água livre de nucleases, para volume final de 50 µL.
- As temperaturas da termociclagem recomendadas pelo kit são as seguintes: Para a RT, 1 ciclo de 45°C por 45 min (retrotranscrição), 1 ciclo de 94°C por 2 min (inativação da RT e RNA/cDNA/denaturação do primer. Para a PCR, 40 ciclos de: 94°C por 30 seg (denaturação), 60°C por 1 min (anelamento), 68°C por 2 min (extensão), 68°C por 7 min (extensão final).

### Sequenciamento dos produtos amplificados

- Purificar as amostras que resultem positivas na amplificação com os genes *ompA* e *ompB*, utilizando o kit Purelink™ (Invitrogen), seguindo as recomendações do fabricante.
- Inserir o produto de DNA amplificado e purificado no vetor pGEM-T Easy (Promega, Madison, EUA), conforme protocolo do fabricante: misturar 5 µL de 2X Rapid Ligation Buffer (Promega, Madison, EUA), T4 DNA ligase, 1 µL pGEM-T Easy (50 ng), 3 µL do produto purificado da PCR, 1 µL T4 DNA ligase, e incubar a reação *overnight* a 24,6°C.
- Transformar por choque térmico em *Escherichia coli* quimicamente competentes da linhagem TOP 10F'.
- Expandir as colônias positivas em meio LB líquido e extrair os plasmídeos recombinantes utilizando o QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen®), de acordo com o protocolo do fabricante.
- Para confirmação do tamanho do inserto das colônias recombinantes recomenda-se realizar uma PCR utilizando-se o par de primers que amplifica o fragmento de interesse.
- Realizar uma eletroforese em gel de agarose a 1,5% corados com brometo de etídeo com 10 µL dos produtos da PCR e examinar em luz UV.
- Utilizar os clones dos genes, obtidos a partir da clonagem das amostras, para sequenciamento.
- Submeter as sequências obtidas ao programa BLAST do GeneBank para determinar similaridades com outras espécies.

### PROTOCOLO RECOMENDADO PELA WORLD ORGANISATION FOR ANIMAL HEALTH (OIE) PARA A DETECÇÃO DO VÍRUS DA PESTE SUÍNA AFRICANA (AGÜERO et al., 2003)

- Preparar a amostra segundo usando o kit *High Pure PCR Template Preparation*, que permite avaliar vírus RNA e DNA.
- Preparar um homogeneizado 1/10 do material (carrapato) em PBS, centrifugar a 12.000 g X 5 minutos. Extrair o ácido nucléico do sobrenadante.
- Preparar as soluções da seguinte forma:
- Dissolver a proteinase k em 4,5 mL de água estéril e aliquotar em tubos de 500 µL. Armazenar a -20°C.
- Preparar o tampão de remoção de inibidores adicionando 20 mL de etanol absoluto ao tubo original.
- Preparar o tampão de lavado adicionando 80 mL de etanol absoluto ao tubo original.
- Pipetar 200 µL da amostra em tubo de 1,5 mL. Adicionar 200 µL do tampão de união e 40 µL da proteinase K. Misturar imediatamente. Incubar por 10 minutos à 72°C.
- Centrifugar rapidamente para retirar as gotas que ficaram na tampa do tubo.
- Adicionar 100 µL de isopropanol.
- Colocar o tubo de filtrado em um tubo coletor e pipetar a amostra no reservatório. Centrifugar por 1 minuto a 8.000 x g.

- Descartar o tubo coletor e colocar o tubo de filtrado em novo microtubo de 1,5 mL.
- Para eluir o ácido nucléico, adicionar 50 µL de água estéril pré-aquecida (70°C) no reservatório. Centrifugar por 1 minuto a 8000 x g e armazenar a -20°C até seu uso.
- Preparar a mistura para a PCR com: 2,5 µL de 10 X PCR tampão II (10 mM Tris-HCl, pH 8,3, 50 mM KCl), 2,0 µL de MgCl<sub>2</sub> (25 mM), 0,5 µL de dNTP (10 mM), 0,25 µL de cada primer (na concentração 20 pmol/µL) [forward PPA-1 (5'-AGT-TAT-GGG-AAA-CCC-GAC-CC-3'), 0,25 µL do primer reverso (5'-CCC-TGA-ATC-GGA-GCA-TCC-T-3')], 0,125 µL de Taq Gold DNA polimerase (5 U/µL).
- Adicionar 23 µL da reação de mistura de PCR e 2 µL da amostra em tubo de PCR de 0,2 mL.
- Correr no termociclador seguindo o seguinte programa: 1 ciclo a 95°C por 10 minutos, 40 ciclos a 95°C por 15 segundos, 62°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Finalizar com 1 ciclo a 72°C por 7 minutos.
- No final do programa, remover os tubos do termociclador e adicionar 2,5 µL do 10 x tampão de corrida em cada tubo (0,2% xileno cianol, 0,2% azul bromofenol, 30% glicerol).
- Analisar as amostras em gel de agarose 2%, voltagem 150-200 volts por 30 minutos (utilizar tampão TAE 50X).

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDREOTTI, R.; PÉREZ DE LEÓN, A. A.; DOWD, S. E.; GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G.; SCOLES, G. A. Assessment of bacterial diversity in the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **BMC Microbiology**, v.11, n. 1, p. 1-11, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso. 8. Ed. Brasília; Ministério da Saúde, 2010.
- BRITES-NETO, J.; NIERI-BASTOS, F. A.; BRASIL, J.; DUARTE, K. M. R.; MARTINS, T. F.; VERÍSSIMO, C. J.; BARBIERI, A. R.; LABRUNA, M. B. Environmental infestation and Rickettsial infection in ticks in a Brazilian spotted fever-endemic area. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 367-372, 2013.
- BRONZONI, R. V. M.; BALEOTTI, F. G.; NOGUEIRA, R. M. R.; NUNES, M.; FIGUEIREDO, L. T. M. Duplex reverse transcription-PCR followed by nested PCR assays for detection and identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 696-702, 2005.
- CHANG, G. J.; TRENT, D. W.; VORNDAM, A. V.; VERGNE, E.; KINNEY, R. M.; MITCHELL, C. J. An integrated target sequence and signal amplification assay, reverse transcriptase-PCR enzyme-linked immunosorbent assay to detect and characterize flaviviruses. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 477-483, 1994.
- CHOI, Y. J.; LEE, S. H.; PARK, K. H.; KOH, Y. S.; LEE, K. H.; BAIK, H. S.; CHOI, M. S.; KIM, I. S.; JANG, W. J. Evaluation of PCR-based assay for diagnosis of spotted fever group rickettsiosis in human serum samples. **Clinical and Diagnosis of Laboratory Immunology**, v. 12, n. 6, p. 756-763, 2005.
- DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; VENZAL, J. M.; KOCAN, K. M.; SONENSHINE, D. E. Overview: ticks as vectors of pathogens that cause disease in humans and animals. **Frontiers in Bioscience**, v. 13, n. 18, p. 6938-6946, 2008.
- DE LA FUENTE, J.; ESTRADA-PEÑA, A.; CABEZAS-CRUZ, A.; BREY, R. Flying ticks: anciently evolved associations that constitute a risk of infectious disease spread. **Parasites & Vectors**, *on line*, v. 8, p. 538 (11 páginas), 2015.
- DEL FIOLE, F. S.; JUNQUEIRA, F. M.; ROCHA, M. C. P.; TOLEDO, M. I.; BARBERATO FILHO, S. A febre maculosa no Brasil. **Revista Panamericana de Salud Publica**, v. 27, n. 6, 461-466, 2010.

- FIGUEIREDO, L. T. M. Emergent arboviruses in Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007.
- FIGUEIREDO, L. T. M.; BADRA, S. J.; PEREIRA, L. E.; SZABÓ, M. P. J. Report on ticks collected in the Southeast and Mid-West regions of Brazil: analyzing the potential transmission of tick-borne pathogens to man. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n. 6, p. 613-619, 1999.
- FULOP, L.; BARRET, A. D. T.; PHILLPOTTS, R.; MARTIN, K.; LESLIE, D.; TITBALL, R. W. Rapid identification of flaviviruses based on conserved NS5 gene sequences. *Journal of Virological Methods*, v. 44, n. 2-3, p. 179-188, 1993.
- KOSOY, O. I.; LAMBERT, A. J.; HAWKINSON, J.; PASTULA, D. M.; GOLDSMITH, C. S.; HUNT, D. C.; STAPLES, J. E. Novel Thogotovirus associated with febrile illness and death, United States, 2014. *Emerging Infectious Disease*, v. 21, n. 5, p. 760-764, 2015.
- LABRUNA, M. B.; WHITWORTH, T.; HORTA, M. C.; BOUYER, D. H.; MCBRIDE, J. W.; PINTER, A.; POPOV, V.; GENNARI, S. M.; WALKER, D. H. *Rickettsia* species infecting *Amblyomma cooperi* ticks from an area in the State of São Paulo, Brazil, where Brazilian spotted fever is endemic. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, n. 1, p. 90-98, 2004.
- LABUDA, M.; NUTTALL, P. A. Tick-borne viruses. *Parasitology*, v. 129, Supplement S1, p. 221-245, 2004.
- LANI, R.; MOGHADDAM, E.; HAGHANI, A.; CHANG, L. Y.; ABUBAKAR, S. Tick-borne viruses: A review from the perspective of therapeutic. *Ticks and Tick Borne Diseases*, v. 5, n. 5, p. 457-465, 2014.
- LA SCOLA, B. L.; RAOULT, D. Laboratory diagnosis of rickettsioses: current approaches to diagnosis of old and new rickettsial diseases. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 35, n. 11, p. 2715-2727, 1997.
- MASSARD, C. L.; FONSECA, A. H. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. *A Hora Veterinária*, v. 135, n. 1, p. 15-23, 2004.
- MELLES, H. H. B.; COLOMBO, S.; NEGRETE, Y.; COLOMBO, E. R. S. Isolation of *Rickettsia* in vero cell culture. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 32, n. 5, p. 469-473, 1999.
- MORELI, M. L.; AQUINO, V. H.; FIGUEIREDO, L. T. M. Identification of Simbu, Califórnia and Bunyamwera serogroup bunyaviruses by nested RT-PCR. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 95, n. 1, p. 108-113, 2001.
- PFEFFER, M.; PROEBSTER, B.; KINNEY, R. M.; KAADEN, O. R. Genus-specific detection of alphaviruses by a semi-nested reverse transcription-polymerase chain reaction. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 57, n. 6, p. 709-718, 1997.
- ROUX, V.; RAOULT, D. Phylogenetic analysis of members of the genus *Rickettsia* using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (*OmpB*). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, v. 50, Pt. 4, p. 1449-1455, 2000.
- RUST, R.S. Human arboviral encephalitis. *Seminars in Pediatric Neurology*, v. 19, n. 3, p. 130-151, 2012.
- SARAIVA, S. G.; SOARES, H. S.; SOARES, J. F.; LABRUNA, M. B. Feeding period required by *Amblyomma aureolatum* ticks for transmission of *Rickettsia rickettsii* to vertebrate hosts. *Emerging Infectious Disease*, v. 20, n. 9, p. 1504-1510, 2014.
- SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C. B.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; MÁRCIO, A. M.; GALVÃO, M. A. M.; SCHUMAKER, T. T. S.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian Spotted Fever endemicity. *Emerging Infectious Disease*, v. 11, n. 2, p. 265-270, 2005.
- SÜSS, J. Epidemiology and ecology of TBE relevant to the production of effective vaccines. *Vaccine*, v. 1, Supplement 1, p. 19-35, 2003.
- SZABÓ, M. P. J.; PINTER, A.; LABRUNA, M. B. Ecology, biology and distribution of spotted-fever tick vectors in Brazil. *Cellular and Infection Microbiology*, v. 3, n. 27, p. 1-9, 2013.
- TOKARNIA, C. H.; PEIXOTO, P. V.; DÖBEREINER, J.; DE BARROS, S. S.; RIET-CORREA, F. O surto de peste suína africana ocorrido em 1978 no município de Paracambi, Rio de Janeiro. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, v. 24, n. 4, p. 223-238, 2004.
- ZHANG, Y. Z.; ZHOU, D. J.; XIONG, Y.; CHEN, X. P.; HE, Y. W.; SUN, Q.; YU, B.; LI, J.; DAI, Y. A.; TIAN, J. H.; QIN, X. C.; JIN, D.; CUI, Z.; LUO, X. L.; LI, W.; LU, S.; WANG, W.; PENG, J. S.; GUO, W. P.; LI, M. H.; LI, Z. J.; ZHANG, S.; CHEN, C.; WANG, Y.; DE JONG, M. D.; XU, J. Hemorrhagic fever caused by a novel tick-borne Bunyavirus in Huaiyangshan, China. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi*, v. 32, n. 3, p. 209-220, 2011. (In Chinese with English summary).



CAPÍTULO

4



## Protocolos para diagnóstico de babesiose e anaplasmosse

*Lenita Ramires dos Santos  
Flávio Ribeiro Araújo  
Emanuelle Baldo Gaspar  
Cláudia Cristina Gulias Gomes  
Ana Maria Sastre Sacco  
Magda Vieira Benavides  
Carlos Alberto do Nascimento Ramos*



## INTRODUÇÃO

Tristeza Parasitária Bovina (TPB) é um complexo de doenças transmitidas pelo carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* que tem como agentes etiológicos os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, e a riquetsia *Anaplasma marginale*. A ocorrência destas enfermidades tem ampla distribuição, envolvendo áreas de clima tropical e subtropical as quais englobam praticamente todo o território brasileiro.

No Brasil, perdas econômicas consideráveis (estimada em torno de três bilhões de dólares anuais) estão associadas à infestação do rebanho bovino pelo carrapato *R. microplus* (GRISI et al., 2014). As doenças do complexo TPB contribuem para este cenário de prejuízo na pecuária de corte nacional, especialmente em áreas de instabilidade enzoótica.

É preciso considerar que, até o momento, não há um método de diagnóstico laboratorial comercialmente disponível para o diagnóstico de anaplasmosse e babesiose.

Neste capítulo são apresentados protocolos selecionados, de técnicas que permitem a detecção da infecção por *Anaplasma marginale* ou *Babesia* sp, quer seja pelo uso de métodos diretos ou indiretos. Algumas destas técnicas têm permitido estudos de prevalência e/ou incidência da doença por diversos grupos de pesquisa em nosso país.

Porém, na ausência de métodos diagnósticos laboratoriais comercialmente disponíveis, as únicas alternativas ao Médico Veterinário de campo são o diagnóstico clínico ou o diagnóstico *post-mortem*, o que pode comprometer a eficiência da determinação do agente etiológico e a escolha da melhor alternativa terapêutica.

## DIAGNÓSTICO DIRETO

O diagnóstico laboratorial direto para babesiose e anaplasmosse é usado na clínica veterinária para confirmação da suspeita clínica por observação direta do parasito em amostras colhidas do animal suspeito. Também pode ser usado na detecção do parasito em vetores. Diversas técnicas estão disponíveis para este fim e elas incluem detecção dos parasitos no interior de hemácias de sangue periférico a partir de esfregaço sanguíneo, citologia por decalque e, mais recentemente, pela amplificação de fragmentos de DNA (diagnóstico molecular) para os microrganismos em estudo pelo uso da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR).

## ESFREGAÇO SANGUÍNEO DE CAMADA DELGADA

### Introdução e princípio da técnica

Este exame consiste na observação de *B. bovis*, *B. bigemina* e/ou *A. marginale* em hemácias de sangue periférico de bovinos. Por ser de fácil execução, baixo custo e alta especificidade, ainda é, atualmente, o método de eleição para a comprovação do diagnóstico clínico no período patente da doença. Também pode ser usado no diagnóstico *post-mortem*.

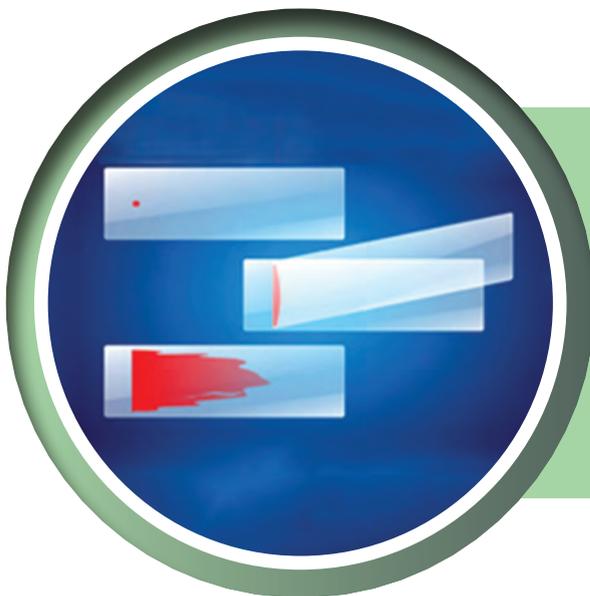
### Material e equipamentos

- Lâminas limpas e secas (lavar com detergente neutro, enxaguar com água destilada e manter em álcool; secar com pano limpo antes do uso);

- Agulha estéril;
- Lápis;
- Lamparina pequena com álcool (opcional);
- Caixa para lâminas;
- Suporte para lâminas;
- Cuba de coloração;
- Corantes (sugere-se coloração pelo método May-Grunwald-Giemsa);
- Metanol;
- Óleo de imersão;
- Microscópio óptico com objetiva de 100 x;
- Ventilador (opcional).

### Execução da técnica

1. Usar agulha estéril para fazer pequena punção em vaso sanguíneo da ponta da orelha ou ponta da cauda do bovino.
2. Depositar uma gota do sangue periférico em uma das extremidades da lâmina (Figura 4.1), evitando encostar a orelha ou a cauda na lâmina.
3. Tocar na gota com a borda de uma segunda lâmina, posicionada em ângulo de 45°, de forma que a gota de sangue se espalhe na borda da segunda lâmina (Figura 4.1).
4. Deslizar a segunda lâmina sobre a primeira em movimento homogêneo, de modo a formar uma franja no final da camada (Figura 4.1). Quanto menor o ângulo entre as duas lâminas, mais delgado será o esfregaço (recomendado). Quanto maior a gota de sangue, mais espesso será o esfregaço, característica esta indesejável (MATOS & MATOS, 1988).
5. Secar a lâmina ao ar ou ao calor (passando a lâmina cerca de 15 cm de distância da chama do fogo).



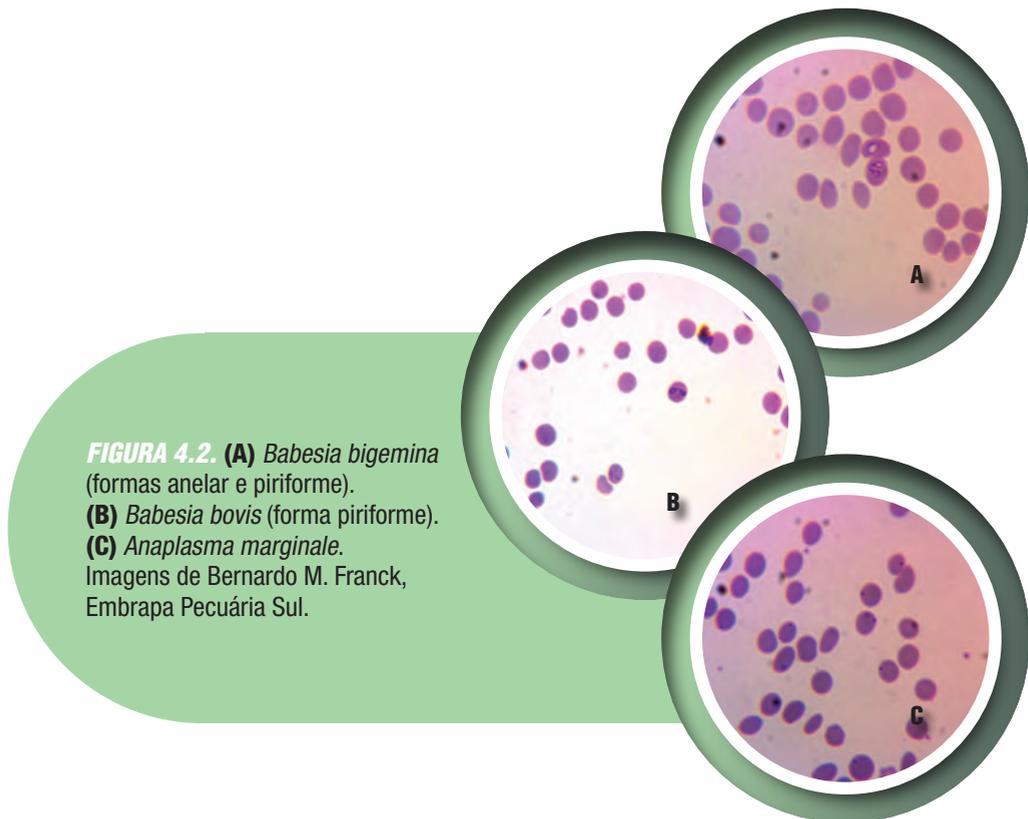
**FIGURA 4.1.** Esquema ilustrativo da técnica de esfregaço sanguíneo. Autoria imagem: Jefferson Christofoletti. Embrapa Pesca e Aquicultura.

6. A identificação da lâmina deve ser feita com lápis na extremidade espessa do esfregaço.
7. Fixar o esfregaço mergulhando a lâmina em metanol por 5 minutos.
8. Deixar secar ao ar ou em frente a ventilador.
9. Corar a lâmina pelo método de May-Grunwald-Giemsa ou com kit comercial de coloração equivalente.
10. Deixar secar ao ar ou em frente a ventilador.

### Análise e interpretação

A lâmina deverá ser examinada em microscópio óptico, em objetiva de 100x, com óleo de imersão. Percorrer a lâmina em sua porção final (área da franja), observando o interior das hemácias. *Babesia bovis* e *B. bigemina* se apresentam em forma de corpúsculos piriformes, geralmente aos pares, ou em forma anelar. Enquanto a *B. bovis* ocupa menos de  $\frac{1}{4}$  do eritrócito, a *B. bigemina* ocupa  $\frac{3}{4}$  ou mais (Figura 4.2 A e 4.2 B).

*Anaplasma marginale* é encontrado na forma de pequeno corpúsculo escuro, arredondado, refringente e periférico (Figura 4.2 C). Poderá ser confundido com artefatos de coloração ou com corpúsculos de Howell-Jolly (fragmentos nucleares). Porém, estes não são uniformes em tamanho e posição. Os artefatos de coloração, geralmente, não desaparecem juntamente com o eritrócito ao movimentar-se o micrômetro.



**FIGURA 4.2. (A) *Babesia bigemina*** (formas anelar e piriforme).  
**(B) *Babesia bovis*** (forma piriforme).  
**(C) *Anaplasma marginale***.  
 Imagens de Bernardo M. Franck, Embrapa Pecuária Sul.

## **Estimativa do percentual de parasitemia em esfregaço sanguíneo de camada delgada**

O esfregaço sanguíneo de camada delgada poderá ser usado para estimar o grau de parasitemia do bovino, ou seja, o percentual de eritrócitos infectados. A forma de cálculo é descrita a seguir (IICA, 1987):

- Selecionar uma região da lâmina com vários eritrócitos, porém sem sobreposição destes. Contar o número de eritrócitos total e parasitados.
- Usar leituras de três campos para calcular a média do número total de eritrócitos.
- Percorrer novos campos (para aumentar o número de eritrócitos contados) contabilizando o número de eritrócitos infectados. O número de campos percorridos deverá corresponder aproximadamente a 10.000 eritrócitos em infecções por *B. bovis* e de 1.000 a 5.000 eritrócitos em infecções por *B. bigemina* ou *A. marginale*.
- Usar regra de três para estimar o número de eritrócitos infectados a cada 100 eritrócitos contados.

## **CITOLOGIA POR DECALQUE (IMPRINT DE ÓRGÃOS)**

### **Introdução e princípio da técnica**

A citologia por decalque ou *imprint* no diagnóstico de babesiose e anaplasmoses é indicada em casos de exame post-mortem, quando há suspeita do parasitismo como causa do óbito. Como a velocidade de decomposição dos tecidos é diferenciada entre os órgãos, recomenda-se que nas primeiras oito horas post-mortem o *imprint* seja realizado considerando-se a seguinte ordem de prioridade: rins, coração, baço, fígado e cérebro. Após oito horas, é indicada a seguinte priorização: baço, cérebro, coração, rins e fígado (IICA, 1987).

### **Material e equipamentos**

- Lâminas limpas e secas (Lavar com detergente neutro, enxaguar com água destilada e manter em álcool. Secar com pano limpo antes do uso);
- Cabo e lâmina de bisturi ou tesoura cirúrgica;
- Caixa para lâminas;
- Suporte para lâminas;
- Cuba de coloração;
- Corantes (sugere-se coloração pelo método May-Grunwald-Giemsa);
- Óleo de imersão;
- Microscópio óptico com objetiva de 100 x.

### **Execução da técnica**

1. Seccionar pequeno fragmento do órgão.
2. Encostar a superfície do fragmento na lâmina, de preferência, que contenha capilares de sangue. Não pressionar.
3. Secar a lâmina ao ar.
4. Corar pelo método de May-Grunwald-Giemsa ou com kit de coloração equivalente (OBS: A fixação é parte do processo de coloração).

## Análise e Interpretação

Examinar a superfície da lâmina em microscópio óptico, objetiva de 100x, com óleo de imersão, à procura de hemácias parasitadas.

## DIAGNÓSTICO MOLECULAR DA TPB

Diversos métodos foram desenvolvidos ao longo dos anos para o diagnóstico molecular dos agentes da TPB. No entanto, a reação em cadeia da polimerase (PCR) e suas variações (nested-PCR, multiplex-PCR, qPCR, etc.) sobressaíram em relação às demais devido à praticidade, menor custo, e melhores sensibilidade e especificidade.

Inicialmente, devido aos altos níveis de sensibilidade e especificidade dos métodos de diagnóstico molecular, associados à característica dos agentes de causarem infecções crônicas subclínicas, o diagnóstico molecular da TPB tornou-se extremamente útil em estudos epidemiológicos e experimentos de avaliação vacinal e terapêutica. Porém, sua aplicabilidade clínica permanecia limitada. No entanto, com o desenvolvimento de técnicas de PCR quantitativa esse cenário está passando por importantes mudanças, e a utilização do diagnóstico molecular da TPB já pode ser considerada.

## PCR EM TEMPO REAL (QPCR)

### Introdução e princípio da técnica

A PCR em tempo real é um método de diagnóstico molecular baseado na amplificação de fragmentos específicos de DNA, delimitados por iniciadores (*primers*), cuja sinalização referente à amplificação de DNA ocorre por meio de moléculas fluorescentes, sendo a intensidade de fluorescência proporcional à quantidade de fragmentos de DNA gerados.

Basicamente, existem dois sistemas de detecção de amplificação utilizados em qPCR, um sistema baseado em fluoróforos intercalantes e outro baseado em sondas de hidrólise. Cada um dos sistemas apresenta vantagens e desvantagens que devem ser consideradas antes da escolha do método e também na interpretação dos resultados.

## PCR EM TEMPO REAL (QPCR) PARA *ANAPLASMA MARGINALE*, *BABESIA BOVIS*

### Material e equipamentos

- DNA de *Anaplasma marginale* (controle positivo), DNA de *Babesia bovis* (controle positivo);
- Sybr Green PCR master mix;
- Oligonucleotídeos iniciadores (*primers*);  
*Anaplasma marginale* (gene *msp5*) apresentados em BACANELLI et al. (2014) (produto de amplificação de 104 pares de bases):

AMTR F: 5' AAGGCGAGGAGCTGTTTAAG 3'

AMTR R: 5' CTAAGCCTCACAAGGACGA 3'

*Babesia bovis* (gene *msa2c*) apresentados em RAMOS et al. (2011) (produto de amplificação de 97 pares de bases):

*msa2c* 2F 5' GGACAAATTAAGCAACCTATACAAA3'

*msa2c* 2R 5' AGCTTTCCTTGTTTCGAATTTTATAA3'

- Água livre de nuclease;
- Microtubos para qPCR (de acordo com o termociclador utilizado);
- Ponteiras com filtro;
- Luvas de látex para procedimento, sem talco;
- Micropipetas;
- Estante para microtubos;
- Gelo ou termobloco;
- Mapa de identificação para o posicionamento dos tubos no termociclador (elaborado pelo usuário);
- Lápis para identificação;
- Termociclador;
- Cabine para PCR;
- DNA das amostras.

### Execução da técnica

1. Descongelar todos os reagentes em gelo.
2. Calcular os volumes a serem pipetados de acordo com o número de reações a serem feitas (incluir uma amostra como controle negativo e uma amostra como controle positivo) e na dependência das concentrações dos reagentes. Utilizar os volumes e quantidades abaixo descritas como referência para uma análise:

qPCR para *msp-5*

*SYBR Green/ROX PCR master mix* – 6,25 µL (ou de acordo com as recomendações do fabricante).

Primer *forward* (AMTR *msp-5* F) e primer *reverse* (AMTR *msp-5* R) – 50 ng de cada um (referência mencionada anteriormente).

DNA molde – 100 ng (deverá estar concentrado em 1 µL).

Água livre de nuclease (q.s.p.) – 12,5 µL.

qPCR para *msa2c*

*SYBR Green/ROX PCR master mix* – 6,25 µL (ou de acordo com as recomendações do fabricante).

MgCl<sub>2</sub> – 3 mM.

Primer *forward* (*msa2c* 2F) e primer *reverse* (*msa2c* 2R) – 3 pmol cada um deles (referência mencionada anteriormente).

DNA molde – 50 ng (deverá estar concentrado em 1 µL).

Água livre de nuclease (q.s.p.) – 12,5 µL.

3. Dispor os microtubos para qPCR de acordo com o planejamento registrado no mapa de identificação.
4. Adicionar todos os componentes da reação, exceto o DNA, em um microtubo de 1,5 mL, compondo o *mix* de PCR.
5. Distribuir 11,5 µL do *mix* para PCR em cada microtubo.

6. Adicionar a cada microtubo o seu respectivo DNA, seguindo o mapa de identificação, em volume de 1  $\mu$ L.
7. Incluir um microtubo contendo 1  $\mu$ L de água livre de nuclease em substituição ao DNA molde, como controle negativo c.
8. Programar no termociclador em tempo real as condições para cada ensaio, como descrito:
  - qPCR para *msp-5 A. marginale*:
    - 50°C – 2 minutos
    - 95°C – 2 minutos
    - 40 ciclos de 95°C – 30 segundos
    - 54°C – 15 segundos
  - qPCR para *msa2c B. bovis*:
    - 50°C – 2 minutos
    - 95°C – 2 minutos
    - 40 ciclos de 95°C – 30 segundos
    - 54°C – 15 segundos
9. Ao término da reação de qPCR, proceder à análise com os dados apresentados pelo sistema (considerando a linha limite ou *threshold line*, entre outros parâmetros).

### Interpretação dos resultados

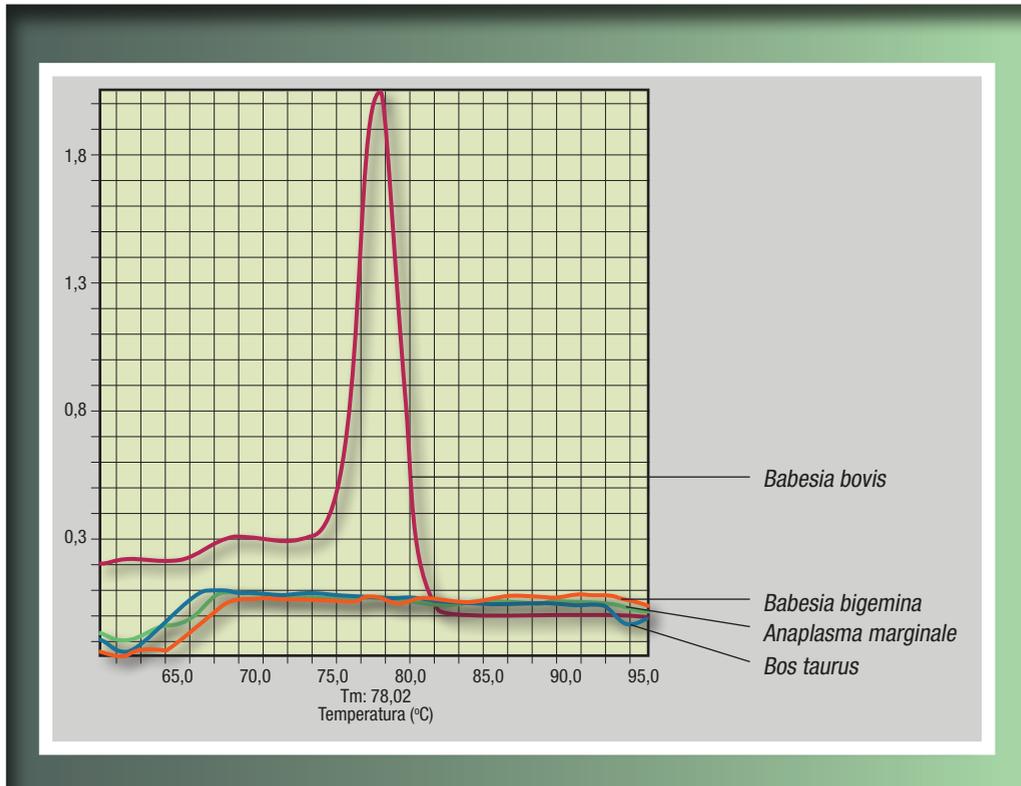
Durante a amplificação, o termociclador calcula a linha limite ou *threshold line*, a partir da qual as amostras são positivas. Após o término da amplificação, há o cálculo da temperatura de dissociação dos produtos. Os corantes intercalantes utilizados em qPCR fluorescem apenas quando eles são ligados à cadeia dupla de DNA (dsDNA). Eles não apresentam fluorescência na presença de DNA de cadeia simples (ssDNA), ou quando os corantes são livres em solução.

Tipicamente, o termociclador é programado para produzir a curva de dissociação depois que os ciclos de amplificação tiverem sido concluídos. Ao final da corrida, o termociclador começa a uma temperatura pré-ajustada (geralmente acima da temperatura de dissociação- $T_m$  dos iniciadores) e mede a quantidade de fluorescência. A temperatura da amostra é então aumentada progressivamente e o equipamento continua a medir a fluorescência. Como a temperatura aumenta, ocorre a desnaturação do dsDNA em cadeia simples, e o corante dissocia-se, resultando em diminuição de fluorescência. A alteração no declive desta curva é então traçada como uma função de temperatura para obter a curva de dissociação.

No caso de *B. bovis*, deve-se observar amplificação de um produto (RAMOS et al., 2011) com temperatura de dissociação de 77,41°C ( $\pm 0,25^\circ\text{C}$ ) (Figura 4.3) No caso de *A. marginale* observa-se amplificação de um produto com temperatura de dissociação de 81,19°C ( $\pm 0,26^\circ\text{C}$ ) (BACANELLI et al., 2014).

### Considerações

Para interpretação/confirmação dos resultados, deve-se incluir análise da integridade das amostras e capacidade de amplificação da reação (ausência de inibidores) pelo uso de oligonucleotídeos iniciadores para genes constitutivos. Na padronização dos tes-



**FIGURA 4.3.** Curva de dissociação em PCR em tempo real com amostras de DNA de *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *A. marginale* e *Bos taurus* em qPCR para detecção de *B. bovis* (apresentado em Ramos et al., 2011).

tes para qPCR de *A. marginale* e qPCR para *B. bovis* foram utilizados oligonucleotídeos para gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) e  $\beta$ -actina, respectivamente.

### DIAGNÓSTICO INDIRETO

O diagnóstico indireto para babesiose e anaplasmoze é feito por meio da demonstração de alterações específicas no hospedeiro, as quais ocorrem a partir da interação com o patógeno (produção de anticorpos ou redução de hemácias circulantes), diferentemente do que ocorre no diagnóstico direto, o qual é possível a partir do resultado do isolamento ou observação do agente patogênico. Em muitos casos, a sensibilidade e a especificidade dos testes indiretos, aliados ao baixo custo da técnica, são fatores chave para a escolha do diagnóstico por estes métodos.

## MICROHEMATÓCRITO PARA DETERMINAÇÃO DO VOLUME GLOBULAR (VG)

### Introdução e princípio da técnica

O volume globular é um parâmetro de estimativa do número e tamanho de glóbulos vermelhos presentes na circulação sanguínea. Em caso de infecções pelos agentes da TPB, há redução do número de glóbulos vermelhos circulantes, em consequência à destruição destas células pelo parasito e/ou pelo organismo. A técnica de microhematócrito consiste na separação dos constituintes do sangue em três partes (eritrócitos, leucócitos + plaquetas e plasma) por meio da centrifugação e é comumente usada para determinação do volume globular.

### Material e equipamentos

- Seringas e agulhas para coleta de sangue;
- Tubos para coleta de sangue com anticoagulante;
- Rack para tubos;
- Tubo capilar;
- Massa de modelar;
- Centrifuga com rotor para tubo capilar de micro hematócrito;
- Cartão para análise do volume globular.

### Execução da técnica

1. Coletar cerca de 3 mL de sangue em tubo com anticoagulante.
2. Inverter lentamente o tubo para promover a mistura do sangue com o anticoagulante. Manter a amostra a 8°C até a execução da análise.
3. Inverter lentamente o tubo para homogeneização da amostra de sangue.
4. Preencher o tubo capilar até, aproximadamente, dois terços do comprimento do tubo.
5. Vedar o lado com sangue usando massa de modelar ou em chama azul com o auxílio de bico de Bunsen.
6. Dispor os microcapilares na centrífuga com a extremidade fechada apoiada na base externa do círculo, distribuindo os microcapilares de forma balancear o peso na centrífuga.
7. Centrifugar por 5 minutos a 10.000 rotações por minuto (RPM).

### Análise e interpretação

A leitura pode ser feita em cartão para microhematócrito que acompanha a centrífuga ou em aparelho apropriado. A relação entre o volume total de sangue e o volume de eritrócitos será expressa em porcentagem no cartão, correspondente à faixa de eritrócitos (porção vermelha). O valor encontrado deve ser comparado aos valores de referência normais de volume globular para bovinos.

### SOROLOGIA (OU IMUNODIAGNÓSTICO)

A palavra sorologia originalmente refere-se à identificação da presença de antígenos ou anticorpos no soro (parte que permanece líquida após a coagulação de um fluido

orgânico, especialmente o sangue), ainda que, atualmente este conceito tenha sido ampliado para uma definição mais abrangente que engloba qualquer método que envolva a detecção e/ou quantificação de interações antígeno-anticorpo, mesmo que esta não seja realizada em fluidos animais. Neste sentido, pode-se considerar sorologia um significado para imunodiagnóstico.

As técnicas sorológicas podem ser divididas em diferentes categorias. Esta categorização das técnicas varia um pouco conforme o autor. Uma maneira simples de se agrupar as técnicas sorológicas leva em consideração a forma de observação da interação antígeno-anticorpo. Neste sentido macrotécnicas são as quais a detecção da interação é visível a olho nu, tais como aglutinação, hemoaglutinação, precipitação, imunodifusão. Já nas microtécnicas para a detecção da interação antígeno-anticorpo é necessário algum tipo de equipamento. Estas técnicas incluem o radioimunoensaio (RIA), a imunofluorescência (RI ou RIFI) e o ensaio imunoadsorvente ligado à enzima (ELISA). Neste item estão descritos como protocolos de microtécnicas ELISA e RIFI, e como protocolo de macrotécnica a aglutinação em látex.

Os soros controles utilizados em sorologia e diagnóstico de babesiose e anaplasnose devem ser obtidos considerando-se alguns critérios, a saber: o soro negativo deverá ser obtido de bovino sem contato prévio com *B. bovis*, *B. bigemina* ou *A. marginale*, preferencialmente, proveniente de área livre destes parasitos/riquétsia. O soro controle positivo forte deverá ser obtido de bovino com parasitemia patente para o patógeno para o qual servirá de controle (avaliado previamente por meio de técnicas diretas de diagnóstico). Não devem ser usados soros de animais com infecção mista. Já o soro controle positivo fraco poderá ser obtido com diluições do soro positivo forte.

## **IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA**

### **Introdução e princípio da técnica**

No ensaio de imunofluorescência indireta (IFI), a detecção da reação se dá pelo uso de anticorpos marcados com fluorocromos. Estas substâncias têm a capacidade de absorver energia luminosa, tornando-as excitadas por um espaço de tempo extremamente curto ( $10^{-9}$  a  $10^{-7}$  segundos), para em seguida emití-la em um comprimento de onda maior, na forma de fluorescência, ao retornarem ao seu estado normal.

Os fluorocromos mais usualmente empregados são os derivados da rodamina e o isotiocianato de fluoresceína (FITC), os quais emitem fluorescência vermelha e verde, respectivamente. A imunofluorescência indireta para babesiose e anaplasnose é baseada na reação de anticorpos específicos presentes no soro bovino com os parasitas (*B. bovis*, *B. bigemina* ou *A. marginale*) presentes em lâmina de microscopia. Para a revelação, utiliza-se conjugado (normalmente anti-IgG bovina) marcado com fluorocromos para evidenciar a reação em microscópio de epifluorescência.

Em uma reação positiva o soro teste contendo anticorpos contra os parasitas interage com o antígeno na lâmina e a fluorescência é observada quando o conjugado é adicionado. Já a reação negativa há ausência de fluorescência.

A descrição abaixo apresenta um protocolo de imunofluorescência indireto padronizado para detecção de anticorpos anti *B. bovis*, *B. bigemina* ou *A. marginale*, baseado nas publicações de Madruga et al., 1986, Sacco, 1996 e Madruga et al., 2001.

## Material e equipamentos

### Para preparo do antígeno

- Sangue de animal doador com parasitemia patente para cada um dos agentes patogênicos;
- Citrato de sódio 3,8%;
- Tubos de centrifugação;
- Tampão salina tamponada (PBS) pH7,2 (7,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 145 mM NaCl) ou solução salina;
- Centrifuga refrigerada;
- Lâminas de vidro;
- Papel macio (absorvente);
- Papel alumínio.

### Para imunofluorescência

- Antígeno de *B. bovis*, *B. bigemina* ou *A. marginale*, previamente distendido em lâmina de vidro lisa e armazenada a -20°C ou -80°C;
- Soro controle negativo e soro controle positivo específico;
- Soros testes;
- Anti-IgG bovina marcada com isotiocianato de fluoresceína (FITC);
- Tampão salino-fosfatado (PBS) pH 7.2 (7,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 2,3 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 145 mM NaCl);
- Solução de lavagem final pH 7,0 (44,3 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; 27,8mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>);
- Microscópio de epifluorescência;
- Câmara úmida;
- Microtubos e/ou placa de ELISA de 96 orifícios;
- Estufa;
- Cubas para lavagens de lâminas;
- Micropipetas;
- Esmalte escuro;
- Seringa de 1 mL;
- Freezer -80°C (ou botijão de nitrogênio líquido) e -20°C;
- Balança de precisão;
- Agitador orbital;
- Ponteiras descartáveis;
- Ventilador (opcional).

### Diluição dos soros

	TESTE	CONTROLE +	CONTROLE -
<i>Babesia</i>	1:160 e 1:320	1:160	1:160
<i>Anaplasma</i>	1:320 e 1:640	1:320	1:320

As diluições indicadas para os soros testes e controles foram determinadas por ensaios prévios de padronização da técnica, na qual os soros foram diluídos de forma seriada em base dois.

### Definição da diluição de uso do conjugado anti-IgG bovina/FITC

Definição do título: Preparar diluições crescentes do conjugado em PBS em base 2 (Ex.: 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 ou mais, se necessário) e analisar a fluorescência de cada diluição com soros controle positivo (C+) e negativo (C-), em triplicatas. A diluição de uso será a anterior a partir da qual a fluorescência começa a perder a intensidade.

Recomenda-se manter alíquotas pequenas para evitar descongelamentos frequentes de todo o conjugado na retirada de amostras. Além disso, a repetitividade de um novo conjugado poderá ser aferida comparando-se o resultado de soros conhecidos avaliados concomitantemente ao conjugado de partida anterior.

### Preparação de antígeno para imunofluorescência

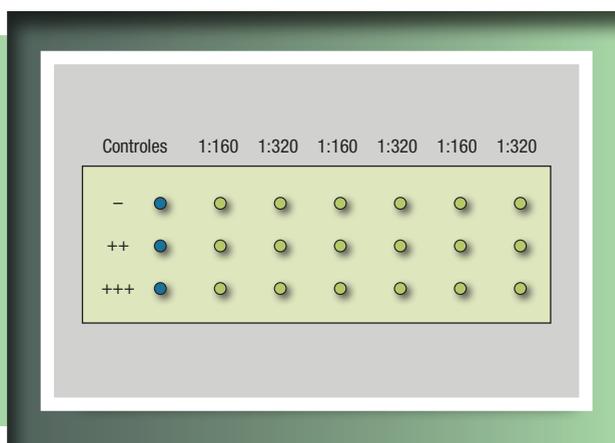
1. Coletar sangue de animal com infecção única (*B. bovis* ou *B. bigemina* ou *A. marginale*) e parasitemia patente utilizando citrato de sódio (3,8%) na proporção de 1:10 (1 parte de citrato + 9 partes de sangue).
2. Distribuir em tubos e centrifugar a 1.600 x g por 15 minutos sob refrigeração (4°C).
3. Retirar o plasma e a camada de leucócitos. Retirar o máximo que for possível da camada de leucócitos.
4. Suspender as hemácias em solução tampão fosfato (pH 7,2) ou salina.
5. Centrifugar por 15 minutos 1.600 x g sob refrigeração.
6. Retirar o sobrenadante e leucócitos (pequena camada branca logo acima da grande camada vermelha composta por hemácias).
7. Suspender as hemácias com as mesmas soluções. Centrifugar em condições idênticas às anteriores. Este processo deve ser repetido três vezes.
8. Após a última centrifugação, o volume final de hemácias deve ser ajustado com tampão salina fosfatada pH 7,2 para 50% a 60% do volume final. Fazer hematócrito para conferir. Se não estiver neste valor, concentrar por centrifugação ou diluir.
9. Utilizar lâminas novas para confecção dos esfregaços. O esfregaço deve ser delgado, porém não muito fino – homogêneo e sem cauda.
10. Secar as lâminas ao ar ou com auxílio de um ventilador.
11. Após a completa secagem, embalar cada lâmina em papel macio e cobrir grupos de cinco lâminas com papel alumínio.
12. Armazenar à temperatura de -80°C em embalagem que não permita ficar úmido. O armazenamento de lâminas a -20 °C pode ser feito para uso imediato (duração até 6 meses).

### Execução da técnica – Imunofluorescência Indireta

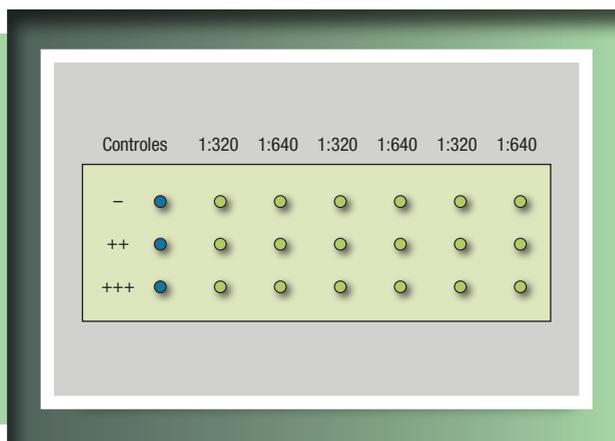
1. Transferir as lâminas de antígeno do freezer para estufa a 37°C por 10 minutos.
2. Fazer círculos de 4 mm com esmalte sobre a distensão (sugestão de 21 círculos por lâmina) com o auxílio de uma agulha em seringa de 1 mL contendo o esmalte.

3. Diluir os soros teste para *Babesia* spp. 1:160 e 1:320 e *A. marginale* 1:320 e 1:640 em PBS 1x.
4. Distribuir uma gota dos soros teste (aproximadamente 10 µL) de acordo com o modelo de lâmina das Figuras 4.4 e 4.5.
5. Em cada lâmina, adicionar 10 µL dos soros controles positivo forte, positivo fraco e negativo.
6. Incubar por 30 minutos a 37°C em câmara úmida.
7. Lavar as lâminas 3 vezes em PBS pH 7,2, sob fraca agitação, por 10 minutos.
8. Aguardar secagem (pode ser usado ventilador).
9. Adicionar 10 µL de anticorpo anti-IgG bovina conjugado com FITC, diluído conforme definido em ensaio anterior, em cada área de reação em local escuro.
10. Incubar as lâminas por 30 minutos a 37°C, em câmara úmida.
11. Lavar duas vezes em PBS durante 10 minutos e uma vez em solução de lavagem final (pH 7,0) por 5 minutos.
12. Colocar para secar em local escuro.
13. Visualizar em microscópio de epifluorescência em objetiva de 40x.

**FIGURA 4.4.** Esquema da distribuição dos soros controle (em negrito) e dos soros teste para *Babesia*. Adaptado de Madruga et al. (2001).



**FIGURA 4.5.** Esquema da distribuição dos soros controle (em negrito) e dos soros teste para *Anaplasma marginale*. Adaptado de Madruga et al. (2001).



## **Análise das lâminas e interpretação**

Examinar cada campo em microscópio de epifluorescência. Iniciar leitura pelos campos controle para confirmar a qualidade das reações. Proceder leitura dos demais campos classificando-os como positivo fraco (++) , positivo forte (+++) ou negativo (-). Indicar como resultado positivo do soro teste a maior diluição positiva forte para cada amostra.

## **Considerações**

É possível visualizar a reação da IFI até mesmo no dia posterior à execução da técnica, desde que a lâmina fique sob refrigeração, no escuro. Como se trata de um processo longo, a interrupção da técnica após a lavagem do soro é perfeitamente aceitável, não apresentando interferência no resultado final desde que a lâmina esteja seca e seja guardada em recipiente protegido, sob refrigeração. Ao aplicar os soros testes e controles não arranhar ou raspar a superfície da lâmina, especialmente com a ponta da ponteira, para evitar a retirada do antígeno, assim como não se deve misturar o conteúdo dos círculos/poços.

## **ENSAIO IMUNOADSORVENTE LIGADO À ENZIMA (ELISA – ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY)**

### **Introdução e princípio da técnica**

O ensaio imunoadsorvente ligado à enzima, ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) é um ensaio imunoenzimático, pois faz uso de anticorpos e antígenos e depende de enzimas ligadas a um destes reagentes para a detecção da reação. É um teste muito utilizado para o diagnóstico de doenças, tanto na medicina humana, quanto na veterinária.

Para este teste, um dos componentes é imobilizado fisicamente em uma fase sólida (poço da placa, usualmente de poliestireno). Na sequência são adicionados vários reagentes em solução aquosa, que são incubados em diferentes passos, com lavagens entre cada um dos passos. Na etapa final do teste a reação da enzima ligada ao antígeno ou anticorpo, com seu substrato e cromógeno específico, promove uma mudança de cor no líquido final, que permite a mensuração da quantidade de analito (antígeno ou anticorpo, dependendo do tipo de teste). A leitura quantitativa é baseada na intensidade de luz absorvida por espectrofotometria. A sensibilidade do teste depende da amplificação de sinais durante a reação.

Existem, na literatura, diversos testes de ELISA padronizados para a pesquisa de IgG para o diagnóstico de babesiose e anaplasnose. A grande maioria destes é de ELISA indireto, mas também já foram padronizados diversos testes de ELISA competitivo. Neste livro serão abordados estes dois tipos de teste. Além destes, já foram padronizados ELISA de captura para pesquisa de antígeno de *A. marginale* (TRUEBLOOD et al., 1991), e testes indiretos para a pesquisa de IgM produzida em resposta à infecção por *Babesia* (RUIZ et al., 2001; GONÇALVES et al., 1999).

### **ELISA INDIRETO**

O ELISA indireto para diagnóstico de babesiose e anaplasnose é um teste no qual o componente imobilizado na fase sólida (placa) é um antígeno de *B. bovis* ou *B. bigemina*

ou *A. marginale*, respectivamente, e os analitos pesquisados são anticorpos produzidos contra estes parasitas (normalmente IgG).

O antígeno imobilizado na placa pode ser tanto antígeno bruto de *Babesia* ssp. ou *A. marginale*, quanto proteínas recombinantes específicas obtidas por meio da tecnologia do DNA recombinante. Neste capítulo será apresentado protocolo de ensaio indireto de detecção de anticorpos anti-*A. marginale* por ELISA o qual se utiliza uma proteína recombinante como antígeno para adsorção nos poços.

## ELISA INDIRETO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-A. MARGINALE

### Material e equipamentos

- Proteína recombinante MSP-5 (rMSP-5) truncada (ARAÚJO et al., 2006);
- Placas de 96 poços (Costar 3590 – Corning);
- Tampão salino-fosfatado (PBS) pH 7.2;
- Polisorbato 20 (Tween 20®);
- Leite em pó desnatado;
- Estufa 37°C;
- Anti IgG bovina/peroxidase;
- Ortofenilenodiamina (OPD) – 5 mg/pastilha;
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>;
- H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 N;
- Espectrofotômetro de placas que permita leitura em 490 nm.

### Execução da técnica

1. Sensibilizar a placa de 96 poços com rMSP-5 truncada (13 ng/poço – em volume de 100 µL) diluída em PBS-Tween® 0,1% (PBS-T) por incubação a 4°C por 12 horas. Descartar todo o volume.
2. Realizar o bloqueio de sítios inespecíficos com 100 µL de PBS-T 0,1% contendo 5% de leite em pó desnatado, por uma hora a 37°C.
3. Após descartar a solução de bloqueio, lavar a placa por 5 vezes com PBS-T.
4. Diluir a 1:600 os soros testes, controles positivos e negativos, em PBS-T e aplicar 100 µL/poço.
5. Incubar por uma hora a 37°C.
6. Descartar as amostras teste e controles dos poços e lavar a placa por 5 vezes com PBS-T.
7. Adicionar o conjugado anti-IgG bovina/peroxidase (Sigma), diluído 1:10.000 em PBS-T e aplicar 100 µL/poço.
8. Incubar por 30 minutos a 37°C.
9. Repetir procedimento de lavagem com PBS-T, 5 vezes.
10. Dissolver a pastilha de cromógeno/substrato ortofenilenodiamina (OPD/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), conforme instruções do fabricante, e aplicar a solução em volume de 50 µL/poço. Parar a reação após cinco minutos pela adição de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2,5 N em volume de 100 µL/poço.
11. Proceder a leitura em espectrofotômetro para microplacas em comprimento de onda de 490 nm.

## Interpretação do resultado

A absorbância dos soros controle negativo deve ser usada para a determinação do ponto de corte (*cut off*). Primeiramente calcula-se a média da densidade ótica (DO) da duplicata de cada controle negativo. Depois, calcula-se a média e o desvio padrão (DP) das DOs dos controles negativos. Comumente, para o cálculo do ponto de corte soma-se a média das DOs dos controles negativos com dois ou três desvios padrão (*cut off* =  $DO \bar{X} + 2xDP$  ou *cut off* =  $DO \bar{X} + 3x DP$ ).

Sugere-se, no entanto, utilizar o método de determinação de *cut off* apresentado por Frey et al. (1998). Estes autores desenvolveram um cálculo de *cut off* estatisticamente definido e apresentaram uma tabela com valores multiplicadores de desvio padrão para cálculo do *cut-off* ( $\bar{X} + DPf$ , em que *f* é o fator multiplicador).

De acordo com a publicação mencionada pode-se apresentar os seguintes exemplos: se forem utilizados 10 soros controle negativo, com um intervalo de confiança de 95%, deve-se multiplicar 1,923 ao DP dos controles negativos e somar o valor encontrado à média da DO dos controles negativos (*cut off* =  $DO \bar{X} + DP \times 1,923$ ). Se, desejando-se o mesmo intervalo de confiança, forem utilizados 12 soros controle negativo, deve-se multiplicar 1,869 ao DP dos controles negativos e somar o valor encontrado à média da DO dos controles negativos (*cut off* =  $DO \bar{X} + DP \times 1,869$ ). Quanto maior o número de amostras e menor o intervalo de confiança desejado, menor o fator de multiplicação dos DPs que se somarão à média das DOs para o cálculo do *cut off*. A tabela completa com os valores que podem ser utilizados para este cálculo está disponível na publicação citada. Para a padronização do teste ELISA indireto com MSP-5 truncada, conforme aqui descrito, foram utilizados 12 controles negativos e estabelecido o nível de confiança como de 99%.

Após o cálculo do *cut off*, todas as amostras com DO superior a este são consideradas positivas, e as com DO inferior, negativas.

Além disso, como a absorbância das amostras é proporcional à quantidade de anticorpos no soro, um controle positivo pode ser usado para o cálculo de porcentagem de positividade, que oferece uma medida relativa (em relação ao controle positivo utilizado) da concentração de antígenos ou anticorpos na amostra [ $PP = (\bar{X} DO \text{ amostra teste} / \bar{X} DO \text{ controle positivo}) \times 100$ , em que PP = porcentagem de positividade].

## ELISA COMPETITIVO

### Princípio da técnica

Nesta técnica de ELISA existe competição entre amostras teste e reagentes conjugados com enzima e, ao contrário do ELISA indireto, quanto mais positiva a reação, menor a intensidade de cor produzida durante a revelação, sendo o resultado expresso como porcentagem de inibição em relação a um controle negativo (poços nos quais não havia o competidor, ou seja, não havia nem amostra teste nem amostra controle).

Existem na literatura diversos testes de ELISA competitivo padronizados para babesiose e anaplasose. O antígeno utilizado para a adsorção das placas pode ser tanto extrato (antígeno bruto), quanto proteínas recombinantes, tais como RAPIa de *B. bigemina* (GOFF et al., 2008), RAPI de *B. bovis* (GOFF et al., 2006), MSA-2c de

*B. bovis* (DOMINGUEZ et al., 2004) ou MSP-5 de *A. marginale* (VIDOTTO et al., 1998; KNOWLES et al., 1996; TORIONI de ECHAIDE et al., 1998). Vale a pena mencionar que, para o teste competitivo faz-se necessário a obtenção de anticorpo monoclonal específico contra *B. bovis*, *B. bigemina* ou *A. marginale* conjugado com peroxidase, no entanto estes anticorpos não são disponibilizados comercialmente no Brasil.

Para fins didáticos será descrito abaixo o protocolo de ELISA competitivo para *B. bovis*, conforme Goff et al., (2003) e Goff et al., (2006).

## ELISA COMPETITIVO PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS ANTI *B. BOVIS*

### Material e equipamentos

- Proteína recombinante rRCT (porção C-terminal de RAP-1 *Rhoptry associated protein*);
- Placas para ELISA tipo “*medium binding*”;
- Tampão salino-fosfatado (PBS) pH 7,2 com 20 mM MgCl<sub>2</sub>;
- Tampão salino-fosfatado pH 7,2 com 0,2% de polisorbato 20 (PBS-T);
- Tampão salino-fosfatado (PBS) pH 7,2 com 0,2% de polisorbato 20 e 20 % de leite desnatado (PBS-T leite);
- Plataforma agitadora rotativa;
- Anticorpo monoclonal BABB-75A4;
- Anti IgG de camundongo conjugada com peroxidase;
- Ortofenilenodiamina (OPD) – 5 mg/pastilha H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2N;
- Espectrofotômetro de placas que permita leitura em 492 nm.

### Execução da técnica

1. Diluir o antígeno [proteína recombinante rRCT (porção C-terminal de RAP-1 *Rhoptry associated protein*) de *B. bovis*] de modo a colocar 5 ng de proteína por poço (50 ng/mL) em PBS contendo MgCl<sub>2</sub> 20 mM.
2. Colocar 100 µL de antígeno diluído/poço em placa de 96 poços de poliestireno com tratamento do tipo “*medium binding*”.
3. Incubar por uma noite a 4°C, em câmara úmida.
4. Descartar todo o volume dos poços e bloquear os sítios inespecíficos da placa pela adição de 200 µL/poço de solução de bloqueio (PBS-T leite).
5. Incubar por 1 hora a temperatura ambiente em plataforma rotativa.
6. Descartar a preparação de antígeno e lavar as placas com PBS-T por três vezes.
7. Colocar 100 µL de soros teste, controles positivos ou negativos em cada poço, sem diluir.
8. Incubar por 30 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida.
9. Descartar todo o volume de soros/controles que estava na placa e lavar as os poços com PBS-T por três vezes.
10. Adicionar 100 µL/poço de anticorpo monoclonal BABB-75A4 de modo a colocar 50 ng/poço (500 ng/ml).
11. Incubar por 15 minutos a temperatura ambiente em câmara úmida.
12. Lavar com PBS-T por três vezes.

13. Adicionar 100 µL/poço de anticorpo anti IgG de camundongo conjugada com peroxidase diluído em PBS-T (cada novo lote deve ser titulado para definir a concentração de uso, ou pode-se usar a concentração de uso indicada pelo fabricante).
14. Lavar três vezes em PBS-T, deixar 30 a 60 segundos descansando com este tampão de lavagem e lavar mais três vezes.
15. Adicionar 50 µL/poço de solução de revelação. A solução de revelação pode ser preparada com 0,5 mg/mL de orto fenilenodiamina (OPD) diluída em tampão citrato-fosfato, acrescido de 1 µL/mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ou, preferencialmente, pela adição de pastilhas pré-preparadas que contenham OPD, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e sais tamponantes em água, conforme recomendado pelo fabricante. A solução de revelação deve ser preparada no escuro (frascos âmbar ou envoltos em papel alumínio) poucos minutos antes de serem usadas, para evitar a oxidação. Caso no momento do uso uma coloração amarelada for percebida na solução esta deverá ser descartada.
16. Incubar por cerca de 10 minutos, no escuro.
17. Parar a reação com solução parada 2N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (25 µL/poço) após 10 minutos.
18. Efetuar a leitura a 492nm para testes revelados com OPD ou 450 nm para testes revelados com tetrametilbenzidina (TMB).

### **Interpretação dos resultados**

A porcentagem de inibição das amostras pode ser calculada da seguinte maneira: % inibição = [1- (DO da amostra – DO branco)/(DO controle sem amostra – DO branco) x 100]. Para este teste específico, de acordo com Goff et al., 2006, o *cut off* é de 21%, ou seja, para porcentagem de inibição superior a 21% a amostra é considerada positiva, e sendo inferior a este ponto de corte é considerada negativa.

### **AGLUTINAÇÃO EM LÁTEX**

#### **Introdução e princípio da técnica**

Complexos insolúveis, visíveis a olho nu, podem ser formados pela capacidade que anticorpos específicos têm de formarem ligações cruzadas entre antígenos. Esta propriedade caracteriza o que é visto nas reações de aglutinação utilizadas como diagnóstico sorológico. Tais reações podem ser diretas (quando os anticorpos se ligam diretamente ao antígeno particulado) ou indireta, quando o teste de aglutinação emprega a adsorção de anticorpos ou antígenos solúveis na superfície de micropartículas inertes (suportes).

Um suporte muito empregado são micropartículas de poliestireno (látex), que não interferem na reação antígeno-anticorpo e são homogêneas quanto ao tamanho. É possível também utilizar métodos automatizados quantitativos como a absorção da luz (turbidimetria) ou a dispersão da luz (nefelometria), melhorando a sensibilidade do teste. Aqui está descrito um método de aglutinação indireta (com látex) para detecção de anticorpos específicos contra *A. marginale* em amostras de soro de bovinos (como descrito em Ramos et al., 2014) na qual é utilizada como antígeno uma proteína recombinante denominada MSP-5 (SILVA et al., 2006).

## Material

### Para preparo da suspensão de látex/rMSP-5

- Partículas de látex com 0,8 µm de diâmetro;
- Tampão salino-fosfatado (PBS) pH 7,2;
- Proteína recombinante MSP-5 (rMSP-5) solubilizada em 2% de SDS (conforme descrito por Lechtzier et al. 2002);
- Tampão salino-fosfatado (PBS) contendo 0,01% de azida sódica, 0,05 mg/mL de BSA e 5% de glicerol.

### Para o teste de aglutinação

- Suspensão látex/rMSP-5;
- Cartões de aglutinação de fundo escuro;
- Soros teste e controles positivo e negativo;
- Bastão de vidro.

## Execução da técnica

### Preparação da suspensão de látex/rMSP-5

1. Diluir a suspensão de partículas de látex (0,8 µm de diâmetro) a 1% em PBS.
2. Centrifugar a suspensão a 3.500 x g por 45 minutos.
3. Remover o sobrenadante e ressuspender as partículas novamente a 1%, mas agora em uma preparação de proteína recombinante (rMSP-5) solubilizada em 2% de SDS e diluída para concentração de 0,5 mg/mL em PBS).
4. Incubar a mistura (látex/rMSP-5) por 24 horas em temperatura ambiente com agitação constante.
5. Após este período de incubação, as partículas de látex sensibilizadas com rMSP-5 devem ser recuperadas por centrifugação a 3.500 x g durante 45 minutos e ressuspensas em PBS com 0,5 mg/mL de BSA (como uma solução de bloqueio de sítios livres).
6. Incubar em temperatura ambiente novamente, sob agitação constante.
7. Em seguida, lavar com PBS e centrifugar a 3.500 x g por 45 minutos.
8. Repetir o item 7 para uma segunda lavagem.
9. Diluir as partículas de látex sensibilizadas com rMSP-5 a 1% com PBS contendo 0,01% de azida sódica, 0,05 mg/mL de BSA e 5% de glicerol.
10. Manter o teste de aglutinação preparado (rMSP-5/LAT) armazenado a 4°C até o momento do uso.

### Teste de aglutinação com suspensão de látex/rMSP-5 de *A. marginale*

1. Realizar os testes em cartões de aglutinação escuros, utilizando a suspensão de látex/rMSP5 e amostras de soro testes em temperatura ambiente.
2. Colocar um volume de 10 µL de soro teste e 30 µL de suspensão de látex/rMSP5 previamente homogeneizado em uma das áreas do cartão de aglutinação.
3. Misturar os dois volumes com auxílio de um bastão de vidro.

4. Agitar o cartão de aglutinação onde está sendo realizada a reação de aglutinação com dois ou três movimentos basculantes.
5. Deixar em repouso por 3 minutos e proceder à leitura.

### Interpretação do teste

A partir da observação a olho nu de aglutinação ou ausência de aglutinação, as amostras são classificadas apenas como positivas (+) ou negativas (-).

### Considerações

Também existem padronizados testes imunocromatográficos para diagnóstico tanto de *B. bovis* quanto de *B. bigemina* (KIM et al., 2007; 2008). Testes imunocromatográficos são métodos simples baseados na migração de líquido através de uma membrana de nitrocelulose (semelhante a um papel). A grande vantagem deste tipo de teste é ser um teste rápido, de fácil execução e que dispensa aparelhos para leitura, tendo, portanto, perspectivas para realização a campo. Porém, até o momento este teste não está disponível no Brasil.

---

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ARAÚJO, F. R.; MELO, E. S. P.; RAMOS, C. A. N.; SOARES, C. O.; ROSINHA, G. M. S.; ELISEI, C. **ELISA com MSP5 recombinante truncada para detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* em bovinos**. Embrapa Gado de Corte: Campo Grande, 2006, 25 p. (Documentos, 163).
- BACANELLI, G. M.; RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R. Molecular diagnosis of *Anaplasma marginale* in cattle: quantitative evaluation of a real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) based on msp5 gene1. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 1, p. 29-33, 2014.
- DOMINGUEZ, M.; ZABAL, O.; WILKOWSKY, S.; ECHAIDE, J.; TORIONI DE ECHAIDE, S.; ASENZO, G.; RODRÍGUEZ, A.; ZAMORANO, P.; FARBER, M.; SUAREZ, C.; FLORIN-CHRISTENSEN, M. Use of a monoclonal antibody against *Babesia bovis* merozoite surface antigen-2c for the development of a competitive elisa test. **Annals of the New York Academy of Sciences**. v. 1026, p. 165-170, 2004.
- FREY A.; CANZIO, J.; ZURAKOWSKI, D. A statistically defined endpoint titer determination method for immunoassays. **Journal of Immunological Methods**, v. 221, n. 1-2, p. 35-41, 1998.
- GONÇALVES, P. M.; PASSOS, L. M. F.; RIBEIRO, M. F. B. Detection of IgM antibodies against *Babesia bovis* in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 82, n. 1, p. 11-17, 1999.
- GOFF, W. L.; MCELWAIN, T. F.; SUAREZ, C. E.; JOHNSON, W. C.; BROWN, W. C.; NORIMINE, J.; KNOWLES, D. P. Competitive enzyme-linked immunosorbent assay based on a rhoptry-associated protein 1 epitope specifically identifies *Babesia bovis*-infected cattle. **Clinical Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, n. 1, p. 38-43, 2003.
- GOFF, W. L.; MOLLOY, J. B.; JOHNSON, W. C.; SUAREZ, C. E.; PINO, I.; RHALEM, A.; SAHIBI, H.; CECI, L.; CARELLI, G.; ADAMS, D. S.; MCGUIRE, T. C.; KNOWLES, D. P.; MCELWAIN, T. F. Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of antibodies against *Babesia bovis*. **Clinical Vaccine Immunology**, v. 13, n. 11, p. 1212-1216, 2006.
- GOFF, W.L.; JOHNSON, W.C.; MOLLOY, J.B.; JORGENSEN, W.K.; WALDRON, S.J.; FIGUEROA, J.V.; MATTHEE, O.; ADAMS, D.S.; MCGUIRE, T.C.; PINO, I.; MOSQUEDA, J.; PALMER, G.H.; SUAREZ, C.E.; KNOWLES, D.P.; MCELWAIN, T.F. Validation of a competitive enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Babesia bigemina* antibodies in cattle. **Clinical and Vaccine Immunology**. v. 15, n. 9, p. 1316-1321, 2008.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANCADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. L. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

- IICA – Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. **Técnicas para el diagnóstico de babesiosis y anaplasmosis bovina**. 2ª edição. San José, Costa Rica: IICA, 1987. 79 p.
- KIM, C.M.; BLANCO, L.B.; ALHASSAN, A.; ISEKI, H.; YOKOYAMA, N.; XUAN, X.; IGARASHI, I. Development of a rapid immunochromatographic test for simultaneous serodiagnosis of bovine babesioses caused by *Babesia bovis* and *Babesia bigemina*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 78, n. 1, p. 117-121, 2008.
- KIM C, ALHASSAN A, VERDIDA RA, YOKOYAMA N, XUAN X, FUJISAKI K, KAWAZU S, IGARASHI I. Development of two immunochromatographic tests for the serodiagnosis of bovine babesiosis. **Veterinary Parasitology**, v. 148, n. 2, p. 137-143, 2007.
- KNOWLES D, TORIONI DE ECHAIDE S, PALMER G, MCGUIRE T, STILLER D, MCELWAIN T. Antibody against an *Anaplasma marginale* MSP5 epitope common to tick and erythrocyte stages identifies persistently infected cattle. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 34, n. 9, p. 2225-2230, 1996.
- LECHTZIER, V.; HUTORAN, M.; LEVY, T.; KOTLER, M.; BRENNER, T.; STEINITZ, M. Sodium dodecyl sulfate treated proteins as ligands in ELISA. **Journal of immunological methods**, v. 270, n. 1, p. 19-26, 2002.
- MADRUGA, C. R., KESSLER, R. H., SACCO, A. M. S., JESUS, E. F., MIGUITA, C. T. Produção de antígeno e análise preliminar do teste de imunofluorescência indireta para o diagnóstico de anticorpos contra *Anaplasma marginale*. Campo Grande: Pesquisa em andamento. No.931,p.1-4, 1986.
- MADRUGA, C. R., ARAÚJO, F. R., SOARES, C. O. **Imunodiagnóstico em medicina veterinária**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. 360p.
- MATOS, M. S.; MATOS, P. F. **Laboratório clínico médico-veterinário**. 2ª. Ed. Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Atheneu, 1988. 238 p. (Série medicina veterinária).
- RAMOS, C. A. N.; ARAÚJO, F. R.; SOUZA, I. I. F.; BACANELLI, G.; HERA, L. L.; RUSSI, L. S.; OLIVEIRA, R. H. M.; SOARES, C. O.; ROSINHA, G. M. S.; ALVES, L. C. Real-time polymerase chain reaction based on msa2c gene for detection of *Babesia bovis*. **Veterinary Parasitology**, v. 176, n. 1, p. 79-83, 2011.
- RAMOS, C. A.; ARAÚJO, F. R.; SANTOS, R. C.; MELO, E. S.; SOUSA L. C.; VIDAL, C. E.; GUERRA, N. R.; RAMOS, R. A. Development and assessment of a látex agglutination test based on recombinant MSP5 to detect antibodies against *Anaplasma marginale* in cattle. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 199-204, 2014.
- RUIZ, P. M. G.; PASSOS, L. M. F. P.; MACHADO, R. Z.; LIMA, J. D.; RIBEIRO, M. F. B. Development of an Enzyme-linked Immunosorbent Assay for detection of IgM antibodies to *Babesia bigemina* in cattle. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 96, n. 2, p. 237-240, 2001.
- SACCO, A. M. S. Babesiose bovina: avaliação de diferentes imunógenos no processo de imunização de bovinos e da resposta humoral produzida, através da RIFI e ELISA. **Tese de Doutorado**. Universidade Federal de Minas Gerais, ICB, 236 p. (Registro: 053:96),1996.
- SILVA, V. M. G.; ARAÚJO, F. R.; MADRUGA, C. R. M.; SOARES, C. O.; KESSLER, R. H.; ALMEIDA, M. A. O.; FRAGOSO, S. P.; SANTOS, L. R.; RAMOS, C. A. N.; BACANELLI, G.; TORRES JÚNIOR, R. A. A. Comparison between indirect enzyme-linked immunosorbent assays for *Anaplasma marginale* antibodies with recombinant major surface protein 5 and initial body antigens. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 511-516, 2006.
- TORIONI DE ECHAIDE, S.; KNOWLES, D.P.; MCGUIRE, T.C.; PALMER, G.H.; SUAREZ, C.E.; MCELWAIN, T.F. Detection of cattle naturally infected with *Anaplasma marginale* in a region of endemicity by nested PCR and a competitive enzyme-linked immunosorbent assay using recombinant major surface protein 5. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 36, n. 3, p. 777-782, 1998.
- TRUEBLOOD, E. S.; MCGUIRE, T. C.; PALMER, G. H. Detection of *Anaplasma marginale* rickettsemia prior to onset of clinical signs by using an antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay. **Journal of Clinical Microbiology**, v.29, n.7, p.1542-1544, 1991.
- VIDOTTO, M.C.; VIDOTTO, O.; ANDRADE, G.M.; PALMER, G.; MCELWAIN, T.; KNOWLES, D.P. Seroprevalence of *Anaplasma marginale* in cattle in Parana state, Brazil, by MSP-5 competitive ELISA. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 849, p. 424-426, 1998.



CAPÍTULO



**Uso de técnicas de biologia molecular em estudos de avaliação da resistência genética de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus microplus***



*Fabiane Siqueira  
Isabella Maiumi Zaidan Blecha  
Marco Antônio Machado  
Luiz Lehmann Coutinho*





## INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem aumentado o interesse de produtores na produção de bovinos que sejam mais adaptados a ambientes desafiadores, interesse este que, em grande parte, está sendo impulsionado pelos avanços no desenvolvimento de métodos de análises de dados genômicos e transcriptômicos. O interesse pela resistência bovina ao carrapato-do-boi, *Rhipicephalus microplus*, é compreensível por interferir diretamente no bem-estar animal e devido às implicações econômicas relacionadas à infestação por carrapatos em zonas tropicais e subtropicais (PORTO NETO et al., 2011a).

As perdas provocadas pelo carrapato *R. microplus* provocam reduções drásticas nas produções de carne e leite, e o País deixa de produzir 26 milhões de arrobas de carne/ano e quatro bilhões de litros de leite/ano. A estimativa dos danos atribuídos a este ectoparasita aponta prejuízos anuais da ordem de USD\$ 3,24 bilhões (GRISI et al., 2014). Os prejuízos causados por este parasita são decorrentes tanto de sua ação direta sobre o hospedeiro, tais como: perda de peso, baixa conversão alimentar, diminuição na produção de carne e leite, desvalorização do couro pela ocorrência de lesões e miíases, toxicoses, lesões da pele, anemia, bem como de perdas indiretas relacionadas à transmissão de patógenos, responsáveis pela babesiose (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e anaplasmose (*Anaplasma marginale*). Contribuem também para compor o quadro de agravantes deste parasitismo os altos custos com tratamentos químicos, equipamentos, instalações e mão de obra (GOMES, 1998).

Historicamente, o método de controle para o carrapato que mais tem sido empregado desde o final do século XIX baseia-se na utilização de produtos químicos (acaricidas), que atuam na fase parasitária de vida do parasita. Porém, a experiência de algumas décadas de uso contínuo desses fármacos demonstra que as expectativas do controle parasitário não podem ser depositadas somente no tratamento químico, pois a alta capacidade de adaptação destes ácaros conduz, invariavelmente, a seleção de indivíduos resistentes, tornando este tipo de controle cada vez menos viável economicamente (FRISCH, 1999). Os custos crescentes para o desenvolvimento de novas drogas e o curto período de vida útil que elas apresentam têm desestimulado a procura de bases químicas com mecanismos de ação diferenciados.

Técnicas de manejo dos animais e das pastagens baseadas na epidemiologia e ecologia de *R. microplus*, como o cultivo de espécies forrageiras com ação repelente ou acaricida sobre as larvas; a alternância de pastoreio entre ovinos lanados e bovinos; e a rotação ou o descanso de pastagens dificultam a sobrevivência das fases de vida livre do parasita, podendo, assim, reduzir a frequência do tratamento químico. No entanto, poucas propriedades rurais adotam estas práticas, por falta de acesso ao conhecimento ou por dificuldades logísticas e orçamentárias para a sua implantação.

Nesse contexto, diversos métodos de controle estão sendo pesquisados como formas alternativas ou complementares ao controle químico. Entre estes se destacam o uso de micro-organismos patogênicos aos carrapatos, como fungos, bactérias e nematoides; a utilização de compostos naturais com efeito acaricida ou repelente (fitoterápicos; nutracêuticos e semioquímicos); o desenvolvimento de vacinas multiantigênicas; a identificação de genes e/ou marcadores moleculares associados com a resistência bovina ao *R. microplus*; e a seleção genômica.

Até o momento, os únicos produtos alternativos ao controle químico disponíveis no mercado são as vacinas TickGard, desenvolvidas na Austrália pela Divisão de Ciências Animais Tropicais do CSIRO, e a Gavac, desenvolvida no Centro de Engenharia Genética e Biotecnologia de Cuba, sendo que esta última encontra-se à venda no Brasil. Embora essas vacinas estejam disponíveis comercialmente, elas não asseguram o grau necessário de proteção para suprimir de imediato o uso de acaricidas, sugerindo a necessidade de identificação de outros antígenos protetores.

As limitações apresentadas pelos métodos de controle existentes indicam a necessidade de disponibilizar aos criadores medidas alternativas para complementar os procedimentos de controle tradicionais, mas que ao mesmo tempo não resultem em maiores gastos no processo de obtenção do produto final. A seleção de animais resistentes em programas de melhoramento genético foi indicada por Frisch (1999) como uma das formas mais promissoras de controle parasitário, uma vez que tem como premissa a prevenção, com efeito permanente durante a vida do animal e acumulativo no rebanho ao longo do tempo. Diferentes níveis de resistência dos bovinos ao carrapato foram observados por diversos autores, tanto dentro de raças como entre raças. Estas diferenças podem ser utilizadas para adequar genótipo e ambiente, visando aumentar a eficiência produtiva dos sistemas de produção de carne e leite do País.

O mecanismo de resistência dos bovinos ao carrapato é um fenômeno complexo e ainda pouco compreendido, sendo que a resistência à infestação ou a capacidade de desenvolver uma resposta imunológica eficaz é geneticamente determinada. De acordo com Frisch; O'Neill (1998), os bovinos *Bos taurus indicus* (Zebu africano e indiano) podem ser classificados como de elevada resistência ao carrapato; bovinos *Bos taurus taurus* do grupo Sanga como de resistência um pouco mais baixa, e os *Bos taurus taurus* britânicos e continentais como de baixa resistência. No Brasil, cerca de 80% do rebanho é composto por animais de raças zebuínas, no qual se destaca a raça Nelore, que são animais rústicos e adaptados ao ambiente brasileiro.

A maior tolerância de animais *B. taurus indicus* quando comparados a *B. taurus taurus* tem sido amplamente reportada na literatura e estudos envolvendo cruzamentos entre animais destes grupos apontam, inclusive, uma proporcionalidade entre a frequência de genes zebuínos e o grau de resistência dos hospedeiros. Quanto maior a proporção de genética zebuína no mestiço, maior é a sua resistência ao carrapato (LEMOS et al., 1985; MORAES et al., 1986; OLIVEIRA; ALENCAR, 1990; WAMBURA et al., 1998; CARDOSO, 2000; SANTOS JR. et al., 2000; SILVA et al., 2006).

Neste capítulo serão abordadas algumas técnicas que contribuem para o estudo da resposta de uma célula ou organismo a eventos biológicos particulares ou a alterações ambientais. Esses métodos são utilizados para auxiliar na identificação de genes e/ou de suas funções em qualquer genoma acerca do qual pouco ou nada se conhece. Assim, genes expressos em uma célula sob determinadas condições constituem o seu transcriptoma.

Estudos do transcriptoma podem ajudar a revelar novos processos celulares, bem como identificar os genes e produtos gênicos envolvidos em processos conhecidos. Estas ferramentas possibilitarão o mapeamento de genes que possam ser usados na seleção de indivíduos resistentes ao carrapato em programas de melhoramento genético e para

descoberta de novos antígenos com capacidade imunoprotetora, permitindo o desenvolvimento de diagnósticos, produtos e/ou tecnologias para combater este ectoparasita.

### **MANUTENÇÃO DE COLÔNIA DE CARRAPATOS *R. microplus***

Para o estabelecimento e a manutenção de colônias de carrapatos, bovinos de aproximadamente seis meses de idade sensíveis ao carrapato devem ser mantidos isoladamente em baias sendo artificialmente infestados com *R. microplus* livres de *Babesia* e *Anaplasma*. Na Embrapa Gado de Corte, os bovinos são alojados em baias individuais de alvenaria que possuem como assoalho uma grade de madeira posicionada a 30 cm do chão para que as fêmeas de carrapato adultas ingurgitadas (teleóginas), que se desprendem dos animais vacinados, caiam pela grade e não sejam pisoteadas. Os animais são alimentados duas vezes ao dia com ração balanceada, silagem e feno, e com água à vontade.

Geralmente, um ou dois bovinos são infestados com a inoculação de 20.000 larvas no dorso de cada um deles a cada cinco semanas. Fêmeas ingurgitadas são coletadas por lavagem do assoalho das baias com jato de água, sendo, em seguida, recuperadas em uma tela e separadas manualmente dos dejetos. Estas fêmeas são mantidas a 28°C em ambiente com 85% de umidade.

Após a postura, os ovos são transferidos para tubos de ensaio, os quais são, em seguida, tampados com algodão para permitir a troca de gases (aeração). Ovos de vários dias são utilizados nos experimentos e, para a manutenção do ciclo são utilizadas larvas com 10 a 15 dias após a eclosão, que são transferidas para os animais.

### **INFESTAÇÃO ARTIFICIAL DE BOVINOS COM LARVAS DE CARRAPATOS *R. microplus***

Inicialmente, animais experimentais são mantidos no campo por um período de aproximadamente três meses livres de carrapatos para adaptação e perda da memória imunológica. Após este período, os animais são levados para baias individuais para a implantação de câmaras, conforme abaixo detalhadas, e a realização das infestações.

Quatro câmaras com 15 cm de diâmetro são fixadas após tricotomia com cola de contato atóxica nas regiões da tábua do pescoço e dorso. Geralmente, três infestações com 300 larvas são realizadas com intervalo de 21 dias e nos locais das infestações são retiradas, de cada animal experimental, amostras de pele de oito milímetros de diâmetro para a realização de biópsias, as quais representem cada infestação cumulativamente.

As coletas das biópsias de pele podem ser realizadas em momentos distintos, sendo a primeira coleta antes da infestação por carrapatos (usada como controle) e as demais no 21º dia após cada infestação (que é o dia modal de desprendimento natural das teleóginas de *R. microplus*).

Para a conservação intacta do RNA, as biópsias de pele podem ser imediatamente imergidas em *RNA later* (Ambion, Inc), acondicionadas por no mínimo 24 horas à temperatura de 4°C a 8°C e, em seguida, congeladas a -20°C até o momento de extração de RNA. Alternativamente, as biópsias podem ser congeladas imediatamente e armazenadas em nitrogênio líquido até o momento da extração.

## Protocolo de extração de RNA de pele

Para a amostra de tecido de pele, acondicionada em *RNA later*, primeiramente deve ser removida a amostra da solução e o excesso de líquido deve ser drenado. Dessa amostra é retirado e descartado o couro, sendo o RNA extraído a partir do restante da amostra. Para tanto, é utilizada a trituração e homogeneização das amostras em TRIzol® (Invitrogen™), com o auxílio do equipamento *Tissue Ruptor* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), e purificação do RNA com o *RNeasy Mini Kit* (Qiagen, Valencia, CA, EUA), seguindo-se as recomendações do fabricante.

Para homogeneização das amostras também pode ser utilizado o equipamento *Tissue Lyser* (Qiagen, Valencia, CA, EUA). Colocar a amostra em tubos tipo eppendorf de 2 mL com fundo redondo com duas esferas de aço de 7 mm e com o tampão denominado “Buffer RLT” da Qiagen. Utilizar amostras de pele pesando entre 100 e 150 mg (equivalente a um terço ou metade de uma biópsia de 8 mm) por extração. Utilizar dois pulsos de 2 minutos e mais um ou dois pulsos de um minuto a 16000 xg. O volume do tampão RLT deve ser aumentado de 300 µL para 600 µL por extração. Apesar deste aumento de volume, utilizar apenas uma coluna por extração, adicionando o volume quantas vezes forem necessárias para passar todo o material pela coluna, via centrifugação. Ao final do protocolo lavar a coluna duas vezes com 32 µL de água para eluir/recuperar o RNA.

Em seguida, o RNA pode ser armazenado à temperatura de -80°C como descrito a seguir: 1) metade na própria água da extração e 2) metade com adição de 10% do volume final com Acetato de Sódio 3M (pH 5,2) e 2,5 volumes de etanol absoluto. O RNA armazenado em água se mostra de boa qualidade por alguns meses ao ser analisado no equipamento *Bioanalyser* (Agilent Technologies), dispensando a necessidade de usar as alíquotas armazenadas em álcool.

Outro método utilizado para homogeneização das amostras de pele pode ser a maceração das amostras congeladas em cadinhos de porcelana utilizando nitrogênio líquido. Neste caso, as amostras devem ser maceradas até que se tornem um pó. Importante destacar, que independentemente do processo de homogeneização utilizado, é necessário evitar que a amostra se descongele. Assim, todos os procedimentos devem ser conduzidos de forma rápida e precisa.

Após a homogeneização das amostras, o RNA total também pode ser extraído por meio de protocolos a base de Trizol. Neste caso, para cada 50 a 100 mg de tecido macerado adicionar 1 mL de Trizol gelado (em tubo de polipropileno de 1,5 mL livre de RNases). Homogeneizar em vórtex e incubar por cinco minutos à temperatura ambiente. Acrescentar 200 µL de clorofórmio gelado e agitar vigorosamente o tubo por 15 segundos. Incubar durante cinco minutos à temperatura ambiente e, em seguida, centrifugar a 16.000 xg à temperatura de 4°C durante 15 minutos. Remover a fase aquosa para um tubo limpo e adicionar 500 µL de isopropanol gelado. Agitar o tubo manualmente e incubar por dez minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugar a 13.000 xg/4 °C por dez minutos e descartar o sobrenadante. Lavar o sedimento com um mL de etanol 75% (preparado com água DEPC - *Diethyl Pyrocarbonato* 0,01%). Centrifugar a 10.500 xg na temperatura de 4°C por cinco minutos e deixar o sedimento (*pellet*) secar durante aproximadamente 15 minutos à temperatura ambiente, tomando o cuidado de não deixar restos de etanol na amostra. Por fim, ressuspender o sedimento

em um volume de 20 uL a 50 uL de água DEPC, sendo que o volume final irá depender do tamanho do sedimento obtido.

### Análise e quantificação de RNA em gel de agarose desnaturante

A pureza e a qualidade de RNA total podem ser avaliadas por meio de eletroforese em gel de agarose desnaturante corado com *Sybr Gold* e determinada por espectrofotometria a 260 nm utilizando um espectrofotômetro Nanodrop 1000 (Thermo Scientific). O gel deve ser preparado de acordo com o protocolo abaixo:

#### 1. Gel médio de agarose para RNA:

1,04 g de Agarose.

10,4 mL de tampão MOPS 10X.

88 mL de Água DEPC.

Levar a um equipamento de micro-ondas para homogeneizar (até ferver) e, após esfriar, adicionar 5,6 mL de formaldeído.

#### 2. Gel pequeno de agarose para RNA:

0,31 g de Agarose.

3,12 mL de MOPS 10X.

26,4 mL de Água DEPC.

Levar a um equipamento de micro-ondas para homogeneizar (até ferver) e, após esfriar, adicionar 1,68 mL de formaldeído.

#### Mistura (mix) para corrida eletroforética em gel desnaturante:

	PARA UMA AMOSTRA	"X" NÚMERO DE AMOSTRAS
RNA total	2,75 µL	
Tampão MOPS 10X	0,5 µL	
Formaldeído	1,75 µL	
Formamida	5 µL	
Volume final	10 µL	

Colocar no mínimo 1 µg de RNA total em tubos de 0,2 mL e adicionar o mix (volume final 10 µL). Agitar gentilmente o tubo, incubar por dez minutos à 60°C e, em seguida, colocá-lo no gelo por cinco minutos.

Para cada amostra adicionar 1 µL de SybrGold, 2 µL de tampão de carregamento e 2 µL de Sacarose (40%). Realizar a corrida eletroforética à 100 V com tampão MOPS 1X por, aproximadamente, 60 minutos.

A qualidade e a integridade do RNA total também podem ser analisadas utilizando o equipamento *Bioanalyzer* (Agilent Technologies). Apenas amostras com RNA total apresentando *RNA Integrity Number* (RIN) maior ou igual a 8,0 devem ser utilizadas para as análises de sequenciamento em larga escala (RNA-Seq).

## Preparo das soluções utilizadas no gel desnaturante

### 1. Água DEPC (Diethyl Pyrocarbonato)

DEPC 0,01% em H<sub>2</sub>O milliQ

Para cada 1.000 mL de água adicionar 100 µL de DEPC. Misturar a solução no agitador magnético com auxílio de uma barra magnética por no mínimo 12 horas a 37°C (ou *overnight*). Autoclavar, fazer alíquotas e guardar na geladeira até o momento do uso.

### 2. MOPS 10X

Para preparar 1 litro pesar:

41,2 g MOPS.

10,88 g Acetato de sódio (CH<sub>3</sub>COONa).

1.000 mL H<sub>2</sub>O DEPC.

Em um béquer, misturar os reagentes com 800 mL de H<sub>2</sub>O DEPC e agitar com uma bailarina. Ajustar o pH para 7,0 com NaOH. Adicionar 10 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0 e completar o volume para 1.000 mL. Filtrar a solução em filtro millipore 0,2 µm e armazená-la em um frasco âmbar. Guardar o tampão na geladeira até o momento do uso.

### 3. Etanol 75% (Álcool etílico)

Observar sempre qual é a porcentagem que consta no frasco. No álcool etílico a dosagem por volume é 95%, portanto:

**Ci.Vi = Cf.Vf** (volume final 100 mL a 75%).

95%.Vi = 75%. 100 mL

95%. Vi = 7.500

Vi = 7.500/95

Vi = 78,9 mL

Colocar em uma proveta 78,9 mL de álcool etílico a 95% e completar o volume para 100 mL com água auto clavada ou água milliQ.

## TÉCNICAS PARA ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA EM LARGA ESCALA

A análise de transcriptoma em larga escala tornou-se possível, pela primeira vez, com o advento das tecnologias de micro arranjos. Essas técnicas podem revelar os genes que são induzidos ou reprimidos quando uma célula é sujeita a determinadas condições biológicas ou ambientais. O crescente uso da análise de transcriptoma baseada em micro arranjos levou ao desenvolvimento de banco de dados *on line* e estes dados estão disponibilizados para toda a comunidade científica, principalmente no caso de estudos na área da genética humana. À medida que a qualidade dos dados de transcriptomas melhora, os próprios transcriptomas passam a ser mais do que uma lista de genes diferencialmente expressos. São também uma forma de impressão digital que caracteriza uma classe de células de determinado organismo sob condições específicas (COX et al., 2012).

A técnica de sequenciamento de alto desempenho ou *Whole Transcriptome Shotgun Sequencing* (RNA-seq) refere-se ao sequenciamento em massa do RNA e representa uma importante ferramenta em estudos de genômica funcional. Com o advento desta tecnologia, tornou-se possível a análise de todo o transcriptoma sem o conhecimento prévio

das sequências e a identificação de genes que participam dos processos celulares e fisiológicos envolvidos em características de interesse econômico e, ao mesmo tempo, como esses genes interagem entre si dentro das redes biológicas que controlam esses fenótipos.

### **Preparo de mRNA, bibliotecas de cDNA e sequenciamento em larga escala**

No caso do sequenciamento de RNA em larga escala utilizando a tecnologia da Illumina, cada amostra, contendo de 1 a 4 µg de RNA total deve ser purificada de acordo com o protocolo descrito por esta empresa, utilizando microesferas magnéticas ligadas a oligos dT para separação do RNA ribossômico. O mRNA purificado tem que ser fragmentado em tampão específico (Illumina). A síntese da primeira fita de cDNA deve ser realizada com a enzima Superscript II (Invitrogen). Para a síntese da segunda fita de cDNA, devem ser utilizadas as enzimas RNaseH e DNA Pol I fornecidas no kit de preparo da biblioteca (Illumina).

As extremidades das moléculas são tratadas com as enzimas *T4 DNA Polymerase* e *Klenow DNA Polymerase* (Illumina), para geração de extremidades abruptas. A extremidade 3' é fosforilada com a enzima T4 PNK (Illumina) e a adenilação na extremidade 3' é realizada com a enzima *Klenow exo* (Illumina). As moléculas são então ligadas aos adaptadores com uso da enzima *T4 DNA Ligase* (Illumina). As bibliotecas são purificadas e amplificadas (200pb ±30 pb) por meio de PCR com *primers* específicos para os adaptadores (Illumina).

Após o término da *SamplePrep*, a qualidade das bibliotecas deve ser validada em um equipamento *Bioanalyser* (Agilent Technologies) usando o *chip DNA 1000*, com intuito de verificar se o procedimento foi bem sucedido e se as amostras apresentam a maior parte dos fragmentos próximos do tamanho de 260 pares de bases (pb).

A seguir, as bibliotecas são quantificadas individualmente via PCR em Tempo Real (RT-qPCR), com o uso do Kit *KAPA Library Quantification* (KAPA Biosystems), o qual possui seis amostras padrões de concentrações (entre 20 a 0,0002 pM) e tamanho de fragmento conhecido (452 pb) presentes no *kit*. A partir dos valores de Ct (*threshold cycle*) dos padrões são determinadas as concentrações das amostras por meio de uma regressão linear. Depois de calculadas essas concentrações, elas são diluídas novamente para uma concentração padronizada, combinadas e então inseridas na lâmina de sequenciamento para a clusterização.

Neste caso, o sequenciamento do mRNA é realizado com a tecnologia de sequenciamento de nova geração por meio do equipamento *HiSeq2500* (Illumina – San Diego, EUA), de acordo com as instruções do fabricante e é utilizado o protocolo de *pair-end reads*. Com uso do *kit TruSeq PE Cluster Kit v3-cBot-HS* (Illumina – San Diego, EUA), as amostras são ligadas a oligos complementares posicionados na superfície das canaletas da lâmina, e posteriormente amplificadas, resultando em *clusters* (agrupamentos) de fragmentos iguais. A sequência dos agrupamentos deve ser determinada com uso do *kit TruSeq SBS kit v3-HS* (Illumina – San Diego, EUA), (200 ciclos), conforme recomendações do fabricante. Cada canaleta contém seis amostras e cada amostra é sequenciada até gerar cerca de 10 milhões de *reads* por biblioteca.

## Validação dos resultados das análises de expressão gênica obtidos por RNAseq

Os níveis de expressão diferencial de transcritos específicos, identificados pelo sequenciamento de mRNA, podem ser validados por PCR quantitativo em tempo real (RT-qPCR).

### Síntese do DNA complementar (cDNA)

A fim de eliminar qualquer contaminação com DNA genômico, as amostras de RNA total são submetidas ao tratamento com o kit DNase I (*Fermentas*), seguindo as recomendações do fabricante. Posteriormente, o RNA total é transcrito reversamente em cDNA com o uso do kit *SuperScript III First-Strand Syntesis SuperMix* (*Invitrogen*), de acordo com as especificações do fabricante.

### Desenho e otimização dos primers

Os *primers* para amplificação dos transcritos previamente encontrados na análise de RNA-Seq, podem ser desenhados com base na sequência completa do mRNA dos genes depositados no *GenBank* (HYPERLINK “<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>” [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)), utilizando o programa *Primer3Plus* (<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plu.cgi>). A qualidade das sequências dos primers pode ser avaliada utilizando o programa *NetPrimer* (<http://www.premierbiosoft.com/netprimer/netprimer.html>). A especificidade das sequências pode ser analisada com o uso da ferramenta BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Por meio da reação em cadeia de polimerase (PCR) é realizada a otimização dos *primers* e são estabelecidas as condições ideais de temperatura de ligação para cada par de *primers*, por meio de gradientes de temperaturas. Em seguida, o produto de PCR é submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5 % para análise do produto amplificado.

### Cálculo da eficiência de amplificação (E) dos primers

Para calcular a eficiência de amplificação dos *primers*, são construídas curvas padrão de diluição em série de cDNA, utilizando amostras selecionadas aleatoriamente. A eficiência é obtida utilizando a equação determinada por Rasmussen (2001):

$$E = [10^{(-1/\text{slope})}]$$

Onde:

E: Eficiência da amplificação do *primer*;

Slope: Valor dado para a inclinação da curva.

### PCR quantitativa em tempo real

A metodologia da transcrição reversa, seguida da qPCR, permite a quantificação relativa dos níveis de expressão gênica entre os diferentes indivíduos ou tratamentos. Baseia-se na detecção e quantificação de um marcador fluorescente, que será o SYBER® *Green* (*Roche*), cujo sinal está em proporção direta com a quantidade de produto amplificado em uma reação. O SYBR® *Green* (*Roche*) se liga à fita dupla de cDNA e, ao sofrer excitação luminosa, emite fluorescência. Dessa maneira, com o acúmulo de produto de PCR, a fluorescência aumenta, indicando o número de moléculas inicialmente presente na amostra.

Para as reações de RT-PCR quantitativa em tempo real pode ser utilizado o *Kit LightCycler® 480 SYBER Green I Master* (Roche) e o equipamento *LightCycler® 480 Real-Time PCR System* (Roche) na validação dos genes diferencialmente expressos nas análises de RNA-Seq. O volume final da reação de PCR é de 10 µL e as reações são preparadas adicionando-se 2 µL de cDNA (na diluição calculada), 5 µL de SYBER Green I Master 2X (Roche) (composto por Taq DNA polymerase; tampão; dNTPs; fluorescência SYBER Green I e cloreto de magnésio); 0,4 µL de cada *primer* direto e reverso (10 µM/µL) e 2,2 µL de água livre de nucleases.

Todas as reações são realizadas em duplicata com um controle negativo (sem cDNA) e um calibrador (gene conhecido). Ao término da reação de PCR, a curva de *melting* é analisada para os genes estudados a fim de confirmar a especificidade dos *primers*. Os resultados da expressão gênica são registrados como valores de Ct (*Cycle threshold*).

### Quantificação relativa da expressão gênica

Para a normalização dos dados gerados na RT-qPCR podem ser testados os genes referência *EEF1A1* (*eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1*), *RPL5* (*ribosomal protein L5*) *GAPDH* (*glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*), *MRPS27* (*mitochondrial ribosomal protein S27*) e *ACTB* (*actin beta*) para a quantificação da expressão dos genes de interesse. A expressão relativa pode ser calculada pelo método comparativo descrito por Pfaffl (2001), na qual essa expressão é determinada pela razão:

$$\text{Expressão relativa} = R = \frac{E(\text{gene alvo})^{(Ct \text{ gene referência} - \text{amostra})}}{E(\text{gene controle})^{(Ct \text{ gene referência} - \text{amostra})}}$$

Onde:

E: Eficiência de amplificação do *primer*

Ct (*threshold cycle*): O ciclo de PCR no qual foi detectado o aumento na fluorescência reportada acima do sinal basal.

Os dados são submetidos ao Teste F ( $p < 0,05$ ) e as análises são realizadas utilizando-se o programa SAS (2004).

### MARCADORES MOLECULARES, IDENTIFICAÇÃO DE QTLS E SELEÇÃO GENÔMICA

A maioria das características de interesse econômico na pecuária é controlada por muitos genes de pequeno efeito individual, que estão sujeitos a influências ambientais. No entanto, alguns estudos já sugeriram a ocorrência de genes de efeitos maior para resistência ao carrapato, que poderiam ser explorados no processo de seleção de animais resistentes. Um destes genes foi identificado em bovinos da raça sintética Adaptur, produto do cruzamento entre Hereford e Shorthorn. De acordo com Frisch (1994), vários anos de seleção demonstraram que o número médio de parasitas em animais com 0, 1 ou 2 cópias do gene foi de 128, 36 e 7, respectivamente, demonstrando a potencialidade da utilização de genes de efeito maior.

As regiões cromossômicas responsáveis por controlar as características quantitativas, geralmente de interesse econômico, como a resistência a ectoparasitas, são denominados *Quantitative Trait Loci* (QTLs). Dessa forma, diversas pesquisas estão sendo

direcionadas para buscar resultados de QTLs e polimorfismos em genes relacionados a essas características. (BIEGELMEYER et al., 2012).

Diversos estudos (GASPARIN et al., 2007; REGITANO et al., 2006; MACHADO et al., 2010; PORTO NETO et al., 2010; PORTO NETO et al., 2011b) buscaram identificar QTLs para resistência ao carrapato em bovinos por meio de varredura do genoma com marcadores microssatélites. Nesses trabalhos, foram detectados QTLs nos cromossomos 2, 3, 5, 7, 10, 11, 14, 23 e 27.

Essas características quantitativas podem ser identificadas por meio da construção de mapas genéticos, sendo que essa é uma das aplicações imediatas dos resultados obtidos em projetos de sequenciamento. Com a finalidade de identificar os genes responsáveis pelas diferenças nas características fenotípicas em bovinos, polimorfismos de base única (*Single Nucleotide Polymorphisms* - SNP) estão sendo direcionados para saturar os mapas de locos de características quantitativas existentes. Dessa forma, com o grande número de marcadores moleculares utilizados, é possível rastrear os animais portadores de alelos ou combinação de alelos favoráveis que aumentam a produção. (SONSTEGARD; Van TASSEL, 2004; FURLAN et al., 2007).

Diversos estudos de associação genômica utilizando SNPs vem sendo conduzidos. Um grande número de polimorfismos de base única relacionados à característica de resistência ao *R. microplus* foi observado em diversos segmentos cromossômicos por Barendse (2007). Turner et al. (2010) demonstraram a ocorrência de uma baixa correlação entre os efeitos dos alelos envolvidos com a característica de produção leiteira e a contagem de carrapatos, indicando que uma seleção por animais resistentes não prejudicaria a produção de leite do rebanho.

Outro gene de interesse é o IFN- $\gamma$ , um dos genes mais relatados para a imunidade inata e adaptativa contra infecções virais e intracelulares. Maryan et al. (2012) para identificar o papel desse gene na resistência ao carrapato, utilizaram animais resistentes e suscetíveis. Nove polimorfismos do tipo SNP foram identificados, três deles foram encontrados na região exônica. Uma das nove variantes já havia sido relatada anteriormente (ss82716193) e confirmada em população de gado paquistanês Sahiwal.

O mapeamento genético objetiva polimorfismos relacionados a regiões genéticas de interesse, mesmo que o gene responsável pela característica desejável não seja conhecido. Um dos tipos de marcadores moleculares mais polimórficos utilizados são os microssatélites, formados por uma sequência de até seis nucleotídeos repetidos em tandem.

Os genes do complexo maior de histocompatibilidade (*bovine lymphocyte antigen* - BoLA), localizados no cromossomo 23, são associados à resistência dos hospedeiros. Estes genes são codificadores de glicoproteínas receptoras das células apresentadoras de antígenos, onde se acoplam e apresentam peptídeos antigênicos para os linfócitos T, iniciando a resposta imune. Por esse motivo, são os mais estudados do sistema imunológico (TIZARD, 2008). Desta forma, variações nos genes de diferentes classes deste complexo influenciam, provavelmente, a capacidade imune dos animais. Entretanto, para que os mecanismos de resistência e desenvolvimento da resposta imunológica sejam completamente elucidados é necessário maior compreensão da expressão destes genes (TAKESHIMA; AIDA, 2006).

Acosta Rodríguez et al. (2005), identificaram associações entre a resistência ao carrapato em bovinos e os microssatélites DRB1 e DRBP1 que estão localizados no MHC. Outras associações significativas com a carga de carrapatos foram encontradas com marcadores microssatélites ou alelos de PCR-RFLP do gene BoLA-DRB3.2 (Martinez et al., 2006), DRB1 e DRB3 (Untalan et al., 2007). Infelizmente comparações válidas entre esses estudos são complicadas por diferenças na identificação dos alelos dos marcadores microssatélites utilizados, bem como nas diferenças das bases genéticas das raças bovinas utilizadas e das cepas de carrapato estudadas.

Cardoso et al. (2015) com o objetivo de identificar indivíduos Hereford e Bradford com características genéticas que os tornam menos suscetíveis ao carrapato, utilizaram milhares de marcadores moleculares para identificar os bovinos mais resistentes ao ectoparasita. Foi elaborada uma previsão de transmissão de genes associados ao mecanismo de resistência a partir de uma equação, que pode ser aplicada na seleção de animais das mesmas raças. Segundo os autores, com essa equação de predição de valores genéticos é possível a identificação de animais geneticamente mais resistentes sem a necessidade de coletar informações sobre contagem de carrapato.

No melhoramento animal, as características econômicas de baixa herdabilidade são amparadas pela utilização da genômica. As vantagens dessa ferramenta são a maior rapidez no processo de melhoramento genético e também mais precisão na escolha de reprodutores que vão transmitir a genética desejada. As técnicas tradicionais de seleção geralmente precisam de duas ou três gerações de animais para surtirem efeito, enquanto que essas novas tecnologias podem apresentar resultados bem mais rápidos, encurtando o intervalo entre o número de gerações e tendo maiores avanços em cada uma delas.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-RODRÍGUEZ, R.; ALONSO-MORALES, R.; BALLADARES, S.; FLORES-AGUILAR, H.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; GORODEZKY, C. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. **Veterinary Parasitology**, v. 127, p. 313-321, 2005.
- BARENDSE, W. Assessing tick resistance in a bovine animal for selecting cattle for tick resistance by providing a nucleic acid from the bovine animal and assaying for the occurrence of a single nucleotide polymorphism (SNP). **Patent application** WO2007051248-A1, p. 1-146, 2007.
- BIEGELMEYER, P.; NIZOLI, L. Q.; CARDOSO, F. F.; DIONELLO, N. J. L. Aspectos da resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Archivos de Zootecnia**, v. 61, n. 1, p. 1-11, 2012.
- CARDOSO, V. **Avaliação de diferentes métodos de determinação da resistência genética ao carrapato *Boophilus microplus* em bovinos de corte**. 2000. 108 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia). Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP Jaboticabal, 2000.
- CARDOSO, F. F.; GOMES, C. C. G.; SOLLERO, B. P.; OLIVEIRA, M. M.; ROSO, V. V.; PICCOLI, M. L.; HIGA, R. H.; YOKOO, M. J.; CAETANO, A. R.; AGUILLAR, I. Genomic prediction for tick resistance in Braford and Hereford cattle. **Journal of Animal Science**, v. 93, n. 6, p. 2693-2705, 2015.
- COX, M. M.; DOUDNA, J. A.; O'DONNELL, M. **Biologia Molecular: Princípios e Técnicas**. Porto Alegre: Editora Artmed, 2012. 944p.
- FRISCH J. E. Identification of a major gene for resistance to cattle ticks. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 5., 1994. Guelph, Ontario, Canadá. **Proceedings...** Guelph, Ontario, Canadá, p. 93-295, 1994.
- FRISCH, J. E.; Towards a permanent solution for controlling cattle ticks. **Internacional Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 57-71, 1999.

- FRISCH, J. E.; O'NEILL, C. J. Comparative evaluation of beef cattle breeds of African, European and Indian origins. Resistance to cattle ticks and gastrointestinal nematodes. **Animal Science**, v. 67, n. 1, p. 39-48, 1998.
- FURLAN, L. R.; FERRAZ, A. L. J.; BORTOLOSSI, J. C. A genômica funcional no âmbito da produção animal: estado da arte e perspectivas. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, supl., p. 331-341, 2007.
- GASPARIN, G.; MIYATA, M.; COUTINHO, L. L.; MARTINEZ, M. L.; TEODORO, R. L.; FURLONG, J.; MACHADO, M. A.; SILVA, M. V. G. B.; SONSTEGARD, T. S.; REGITANO, L. C. A. Mapping of quantitative trait loci controlling tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistance on bovine chromosomes 5, 7 and 14. **Animal Genetics**, v. 38, n. 5, p. 453-459, 2007.
- GOMES, A. **O carrapato-do-boi *Boophilus microplus*: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle**, p. 9-44. In: KESSLER, R H; SCHENK, M A M eds. Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Campo Grande: EMBRAPA-CNPGC, 1998. 157p.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H.; LEÓN, A. A.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Brazilian Journal of Veterinary Parasitology**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- LEMOS, A. M.; TEODORO, R. L.; OLIVEIRA, G. P.; MADALENA, F. E. Comparative performance of six Holstein-Friesian x Guzera grades in Brazil. Burdens of *Boophilus microplus* under field conditions. Comparative performance of six Holstein-Friesian x Guzerá grades in Brasil. **Animal Production**, v. 41, p. 187-191, 1985.
- MACHADO, M. A.; AZEVEDO, A. L. S.; TEODORO, R. L.; PIRES, M. A.; PEIXOTO, M. G. C. D.; FREITAS, C.; PRATA, M. C. A.; FURLONG, J.; SILVA, M. V. G. B.; GUIMARÃES, S. E. F.; REGITANO, L. C. A.; COUTINHO, L. L.; GASPARIN, G.; VERNEQUE, R. S. Genome wide scan for quantitative trait loci affecting tick resistance in cattle (*Bos taurus* x *Bos indicus*). **BMC Genomics**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2010.
- MARTINEZ, M. L.; MACHADO, M. A.; NASCIMENTO, C. S.; SILVA, M. V.; TEODORO, R. L.; FURLONG, J.; PRATA, M. C.; CAMPOS, A. L.; GUIMARAES, M. F.; AZEVEDO, A. L. S.; PIRES, M. F.; VERNEQUE, R. S. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. **Genetics Molecular Research**, v. 5, n. 3, p. 513-524, 2006.
- MARYAM, J.; BABAR, M. E.; NADEEM A.; HUSSAIN, T. Genetic variants in interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) gene are associated with resistance against ticks in *Bos taurus* and *Bos indicus*. **Molecular Biology Reports**, v. 39, n. 4, p. 4565-4570, 2012.
- MORAES, F. R.; COSTA, A. J.; WOELZ, C. R.; MORAES, J. R. E.; ROCHA, U. F. Ecologia de carrapatos. XV: Susceptibilidade natural comparativa entre taurinos e zebuínos a *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari, Ixodidae). **Arquivo Veterinária**, v. 2, n. 1, p. 45-52, 1986.
- OLIVEIRA, G. P.; ALENCAR, M. M. Resistência de bovinos de seis graus de sangue Holandês-Guzerá ao carrapato (*Boophilus microplus*) e ao berne (*Dermatobia hominis*). **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 42, n. 2, p. 127-135, 1990.
- PFÄFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT PCR. **Nucleic Acids Research**, v. 29, n. 9, p. 2002-2007, 2001.
- PORTO NETO, L. R.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E.; PRAYAGA, K. C.; BARENDSE, W. Haplotypes that include the integrin alpha 11 gene are associated with tick burden in cattle. **BMC Genetics**, v. 11, p. 55, 2010.
- PORTO NETO, L. R.; JONSSON, N. N.; D'OCCHIO, M. J.; BARENDSE, W. Molecular genetic approaches for identifying the basis of variation in resistance to tick infestation in cattle. **Veterinary Parasitology**, v. 180, n. 3-4, p. 165-172, 2011a.
- PORTO NETO, L. R.; BUNCH, R. J.; HARRISON, B. E.; BARENDSE, W. DNA variation in the gene ELTD1 is associated with tick burden in cattle. **Animal Genetics**, v. 42, n. 1, p. 50-55, 2011b.
- RASMUSSEN, R. **Quantification on the LightCycler**. In MEUER, S.; WITTEWER, C.; NAKAGAWARA, K. (eds.). Rapid Cycle Real-time PCR, Methods and Applications. Springer Press, Heidelberg, p. 21-34, 2001.
- REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S.; ALENCAR, M. M.; CARVALHO, M. E.; ANDRÉO, R.; MOREIRA, I. C.; NÉO, T. A.; BARIONI JUNIOR, W. **Avaliação da resistência de bovinos de diferentes grupos genéticos ao carrapato e à babesiose**. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, n.9, São Carlos: Embrapa Pecuária Sudeste, 2006. 48p.
- SANTOS JR., J. C. B.; FURLONG, J.; DAEMON, E. Controle do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) em sistemas de produção de leite da microrregião fisiográfica fluminense do grande Rio. **Ciência Rural**, v. 30, n. 2, p. 305-311, 2000.

- SAS INSTITUTE. SAS/STAT: user's guide. Version 9.1. Cary: **SAS Institute**, 2004.
- SILVA, A. M.; ALENCAR, M. M.; REGITANO, L. C. A.; OLIVEIRA, M. C. S.; BARIONI JR., W. Natural infestations of beef cattle females by external parasites in southern Brazil. In: WORLD CONGRESS ON GENETICS APPLIED TO LIVESTOCK PRODUCTION, 8, 2006, Belo Horizonte, MG. **Anais...** Belo Horizonte, MG, 2006.
- SONSTEGARD, T. S.; VAN TASSELL, C. P. Bovine genomics update: making a cow jump over the moon. **Genetics Research**, v. 84, n. 1, p. 3-9, 2004.
- TAKESHIMA, S.; AIDA, Y. Structure, function and disease susceptibility of the bovine major histocompatibility complex. **Animal Science**, v.77, n. 2, p. 138-150, 2006.
- TIZARD, I. R. **Imunologia Veterinária: Uma Introdução**. 8ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 587p.
- TURNER, L. B.; HARRISON, B. E.; BUNCH, R. J.; PORTO NETO, L. R.; LI, Y. T.; BARENDSE, W. A genome wide association study of tick burden and milk composition in cattle. **Animal Production Science**, v. 50, n. 4, p. 235-245, 2010.
- UNTALAN, P. M.; PRUETT, J. H.; STEELMAN, C. D. Association of the bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3\*4401 allele with host resistance to the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. **Veterinary Parasitology**, v. 145, n. 1-2, p. 190-195, 2007.
- WAMBURA, P. N.; GWAKISA, P. S.; SILAYO, R. S.; RUGAIMUKAMU, E. A. Breed associated resistance to tick infestation in *Bos indicus* and their crosses with *Bos taurus*. **Veterinary Parasitology**, v. 77, n. 1, p. 63-70, 1998.



CAPÍTULO



## **Protocolos para o desenvolvimento de antígenos para vacinas contra o carrapato-do-boi**

*Rodrigo Casquero Cunha  
André de Abreu Rangel Aguirre  
Fabio Pereira Leivas Leite  
Renato Andreotti*





## INTRODUÇÃO

O combate ao carrapato-do-boi, *Rhipicephalus microplus*, possui como ferramenta principal o controle com base em produtos químicos. Porém, a eficácia dos acaricidas existentes vem diminuindo gradativamente devido à seleção de populações de carrapatos resistentes às diversas gerações destes produtos. As consequências diretas disso decorrem da utilização mais frequente e do uso de produtos cada vez mais concentrada, agravando a contaminação do ambiente e dos produtos de origem animal; elevando os custos do controle e, conseqüentemente, causando impactos negativos na cadeia produtiva de bovinos.

Formas de controle do carrapato, alternativos ao controle químico, vêm sendo estimuladas apesar de sua resposta ainda pouco expressiva. Os métodos alternativos ao químico são os mais variados. Entre estes, destacam-se a seleção de bovinos resistentes aos carrapatos (TEODORO et al., 2004); a rotação de pastagens (ELDER et al., 1980); o cultivo de pastagens que dificultam a sobrevivência das larvas (SUTHERST et al., 1982); o manejo de predadores naturais, como *Egretta ibis* – ou garça-vaqueira (ALVES-BRANCO et al., 1983) e formigas (GONZALES, 1995); a utilização de patógenos, como o fungo *Beauveria bassiana* (CORDOVÉS, 1997) e a bactéria *Cedecea lapagei* (BRUM, 1988); além de fitoterápicos (ANDREOTTI et al., 2013).

O desenvolvimento de vacinas contra o carrapato vem sendo considerado como uma alternativa aos problemas de resistência a carrapaticidas e à contaminação ambiental. Existem no mercado vacinas de efeito parcial baseadas no antígeno Bm86 denominada Gavac<sup>TM</sup> (HeberBiotec S.A., P.O. Box 6162, Havana, Cuba) (DE LA FUENTE et al., 1998) e TickGard<sup>PLUS</sup> (IntervetAustraliaPty. Ltda., 91-105 Harpin Street Bendigo, EastVic.) (WILLADSEN, 1997).

Bm86 é uma proteína presente na superfície apical de células do intestino do *R. microplus* (GOUGH; KEMP, 1993) e por estar presente no tubo digestivo do carrapato, não entrando em contato com o sistema imunológico do hospedeiro, é classificada como antígeno “oculto” (WILLADSEN; KEMP, 1988).

Testes realizados na Embrapa Gado de Corte mostraram que estas vacinas apresentaram eficácia de proteção de 49,2% e 46,4% para Gavac<sup>TM</sup> e GTickGard<sup>PLUS</sup>, respectivamente (ANDREOTTI, 2006). Tais resultados levam a crer que as vacinas representam um caminho possível, mas ainda com necessidades de desenvolvimento de um produto mais eficiente.

Um gene homólogo ao Bm86 foi isolado de *R. microplus* isolado em Campo Grande, MS (Bm86-CG), revelando diferenças na sequência aminoacídica predita para esta proteína em comparação com as sequências das proteínas Bm86 e Bm95 (ANDREOTTI et al., 2008).

Na Embrapa Gado de Corte são estudadas as propriedades de proteínas inibidoras de tripsina (BmTIs) provenientes de larvas de *R. microplus* (RmLTI). A imunização de bovinos com uma associação de BmTIs nativas, purificadas em coluna de tripsina sefarose, apresentou 72,8% de eficiência na proteção contra o carrapato-do-boi (ANDREOTTI et al., 2002).

Apesar da alta eficiência encontrada, o processo de produção destes antígenos é caro e dispendioso, tornando a comercialização economicamente inviável. Desta maneira,

estudos foram desenvolvidos com peptídeo sintético (ANDREOTTI et al., 2007) e produção de proteína recombinante a partir de sequência de gene sintético e expressão em *Pichia pastoris* (TANAKA et al., 1999; ANDREOTTI et al., 2012).

*Pichia pastoris* é uma levedura metilotrófica que tem sido muito utilizada para expressão de proteínas heterólogas devido às suas grandes vantagens em relação aos outros sistemas de expressão. As técnicas requeridas para sua manipulação são semelhantes às descritas para *Saccharomyces cerevisiae*, que é um dos sistemas mais bem caracterizados geneticamente (CREGG; CEREGUINO, 2000).

As suas características mais vantajosas são: ter *status* GRAS, ser de fácil manipulação genética, expressar proteínas heterólogas em altos níveis, ser um sistema eucariótico capaz de promover O- e N-glicosilação além de ser capaz de processar sequências sinais (HOHENBLUM et al., 2004). Além disso, comparado com outros sistemas baseados em eucariotos superiores, como as culturas de células de mamíferos, este sistema é considerado de uso rápido, fácil e mais econômico (GELLISSEN, 2000).

Dentro da perspectiva de procurar novas estratégias para o controle do carrapato, no Laboratório de Biologia Molecular do Carrapato, da Embrapa Gado de Corte, têm sido avaliados antígenos recombinantes de um isolado regional de *R. microplus*, em busca de uma ferramenta alternativa que possa ser utilizada em associação com o controle químico. Dentro desse contexto pretende-se aqui mostrar os protocolos gerais para o desenvolvimento de proteínas recombinantes para os estudos, como também, os desenhos de peptídeos com ênfase em vacinologia reversa.

## **PROTOS COLOS UTILIZADOS PARA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DA PROTEÍNA RECOMBINANTE rBm86-CG**

### **Carrapatos**

Para o ensaio com desafio é necessário a manutenção de uma colônia de *R. microplus*. No desenvolvimento do antígeno r-Bm86-CG, estes foram obtidos a partir de uma colônia de laboratório mantida na Embrapa Gado de Corte. Os carrapatos foram coletados, originalmente, de bovinos infestados em Campo Grande, MS, Brasil. Bovinos sensíveis são infestados com larvas deste carrapato e, após o ingurgitamento, teleóginas são colhidas, incubadas em câmaras de umidade, a 28 °C e 95% de umidade relativa, para oviposição e incubação. As larvas são, então, utilizadas para infestação 18 dias após a eclosão.

### **Clonagem**

Para a clonagem da sequência parcial do gene da Bm86-CG (número de acesso do GenBank: EU352677.1) (ANDREOTTI et al., 2008), um fragmento de DNA de 1.825 pb foi amplificado por PCR utilizando os iniciadores EcoRI-BmCG-F1 (CGGAATTCTCATCCATTTGCTC) e BmCG-KpnI-R2 (TGGAAAGTCAAGTGGGTACCCC), em termociclador MastercyclerPersonal (Eppendorf, Alemanha) utilizando Platinum®Taq DNA polimerase de alta fidelidade, e clonado no vetor pPICZαA (Invitrogen), em grelha com o His-Tag do plasmídeo. A inserção foi confirmada submetendo o plasmídeo à PCR com os iniciadores 5'AOX1 e 3'AOX1 que flanqueiam o local de múltipla clonagem neste plasmídeo. O plasmídeo resultante foi denominado pPICZαA-BmCG. *Pichia pastoris* foi transformado por eletro-

poração. Para tal, uma alíquota de 80  $\mu$ L da estirpe X33 de *P. pastoris* eletrocompetentes foi transformada utilizando 10  $\mu$ g de pPICZ $\alpha$ A-BmCG linearizado com SacI, aplicando um pulso de 20 kV durante 5 ms. As células recombinantes foram selecionadas em placas de YPDS contendo Zeocin<sup>TM</sup> (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, 2% de dextrose, 1 M de sorbitol, 2% de agar, 100  $\mu$ g / mL de zeocina).

DNAs dos clones foram extraídos utilizando o método de ruptura por esferas de vidro. Um mL de sedimento da cultura foi ressuscitado com 150 mL de STES (2,42% de Tris base; 2,92% de cloreto de sódio; 0,1% de SDS; 0,372% de EDTA; pH 7,6) em microtubo de 1,5 mL. Cinquenta microlitros de pérolas de vidro (0,425-0,600 mm) e 150  $\mu$ L de fenol:clorofórmio:álcoolisoamílico (12:12:1 v/v) foram adicionados à mistura, que foi agitada em vórtex durante 1 minutos e centrifugada a 13.000 x g durante 5 minutos. O sobrenadante foi precipitado com 300 mM de acetato de potássio; o sedimento recuperado e lavado com etanol 70%. O DNA foi seco ao ar e ressuscitado em água ultrapura esterilizada. O DNA foi quantificado utilizando um Espectrofotômetro NanoDrop 2000c (ThermoScientific, EUA) 260 nm e armazenado à -20 °C.

### Produção de anticorpos policlonais

Soros policlonais contra Gavac<sup>TM</sup>, TickGard<sup>PLUS</sup>, extrato de larvas de *R. microplus* e rBm86-CG podem ser produzidos utilizando camundongos BALB/c. Para se obter o extrato de larva, 8 g de larvas são congelados à -20 ° C, macerados utilizando almofariz e pistilo em 150 mM de Tris-HCl, pH 7,4 adicionado a um volume final de 8 mL. O extrato fluido deve ser sonificado com dois pulsos de 200 w 10 s a 60% de amplitude e outros 4 pulsos de 10 s a 20%. O conteúdo final deverá ser filtrado em filtro de seringa (0,22  $\mu$ m) e armazenado à -20°C. A proteína total do extrato de larvas deve ser quantificada e diluído 3 mg em 15 mL de 150 mM Tris-HCl, pH 7,4, e emulsionado em 15 mL de adjuvante completo de Freund, proporcionando 30 mL de emulsão de extrato das larvas para a imunização.

A vacina rBm86-CG é preparada com 500  $\mu$ g de proteína rBm86-CG ressuspenso em 5 mL de 150 mM de Tris-HCl, pH 7,4 e emulsionada com 5 mL de adjuvante completo de Freund. Vinte e quatro camundongos BALB/c fêmeas são divididos em quatro grupos de 6 animais. Cada grupo recebe uma das quatro vacinas, a uma concentração de 50  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (Gavac<sup>TM</sup>, TickGard<sup>PLUS</sup> ou rBm86-CG), ou 1.000  $\mu$ g mL<sup>-1</sup> (extrato de larvas), para cada dose de 100  $\mu$ L inoculada. Três doses intramusculares devem ser aplicadas em intervalos de 21 dias. As amostras de soro são colhidas 21 dias após os camundongos receberem a última imunização.

### Dot blotting para triagem de *P. pastoris* transformantes

Cada clone é inoculado em 5 mL de meio BMGY (1% de extrato de levedura, 2% de peptona, fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0, 1,34% de YNB, 4 x 10<sup>-5</sup>% de biotina, 1% de glicerol) e incubado em agitador orbital a 220 rpm, 30°C, juntamente com os controles: um clone transformado com o mesmo plasmídeo e expressando albumina sérica humana (GS115/Albumin) e X33 não transformada. Após 24 h de incubação, as culturas são centrifugadas a 1.500 x g durante 5 minutos, o sobrenadante é desprezado e as células ressuscitadas em 5 mL de BMMY (1% de extrato de levedura, 2% de pep-

tona, fosfato de potássio 100 mM, pH 6,0, 1,34% de YNB,  $4 \times 10^{-5}$ % de biotina, 0,5% de metanol). As culturas são incubadas em agitador por mais 4 dias. Cada cultura é suplementada com 0,5% de metanol (v/v) a cada 24 h. As culturas são centrifugadas e os sobrenadantes colhidos em microtubos de 2 mL, tratados com PMSF 1 mM e armazenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Uma membrana de PVDF deve ser lavada por 10 s em metanol e, em seguida, 5 minutos em água ultrapura esterilizada. Uma alíquota de 5  $\mu\text{L}$  de sobrenadante de cada clone selecionado é aplicada à membrana de PVDF pré-tratada e seca. Alíquotas de 5 mL de Gavac<sup>TM</sup> e TickGard<sup>PLUS</sup> são utilizadas como controles positivos. A membrana é bloqueada utilizando tampão fosfato salina (PBS) contendo 5% de leite em pó desnatado, com agitação durante 1 h a  $30^{\circ}\text{C}$  e, subsequentemente, lavadas duas vezes (5 minutos de cada vez) com PBS-T (PBS mais 0,1% de Tween 80, pH 7,4).

Cada membrana é então incubada com os anticorpos policlonais dos camundongos vacinados com Gavac<sup>TM</sup> ou TickGard<sup>PLUS</sup>, diluídos 1:150 em PBS, em agitação durante 1 hora a  $30^{\circ}\text{C}$ . As membranas são submetidas a três lavagens adicionais com PBS-T, seguidas por incubação com anticorpo secundário de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA), diluído 1:1.000 em PBS-T. O processo é completado por três lavagens adicionais com PBS-T e a incubação das membranas em 5 mL de solução de revelação (0,5% de diaminobenzidina, 0,075% de ureia) até se observar a coloração, a qual é seguida por lavagem em água ultrapura esterilizada. As membranas processadas são fotodocumentadas.

### **Triagem de fenótipo e genótipo *Mut* em *P. pastoris* transformadas**

Fenotipicamente, os clones recombinantes podem ser *Mut*<sup>+</sup> ou *Mut*<sup>S</sup>. O fenótipo *Mut*<sup>S</sup> (utilização lenta de metanol) resulta da perda parcial da atividade de oxidação de álcool causada por uma mutação no gene *AOX1* (álcool oxidase 1). Apesar desta mutação, o gene *AOX2* ainda é funcional. O resultado é o crescimento lento em metanol em comparação com as taxas de crescimento observadas nas estirpes *Mut*<sup>+</sup>, pois estas últimas mantêm ambos os genes. A transformação de X33, recomendada neste protocolo, pode resultar em transformantes de ambos os fenótipos. Dessa maneira, se torna imprescindível a determinação do fenótipo em função da determinação das concentrações de metanol a serem utilizadas nas induções dos diferentes clones.

Para a análise genotípica, o DNA extraído de cada clone e o DNA de GS115 (*Mut*<sup>+</sup>) e GS115/albumin (*Mut*<sup>S</sup>) são submetidos a PCR utilizando dois pares de iniciadores (3'AOX1 com 5'AOX1 e 3'AOX1 com  $\alpha$ -Factor), seguido de caracterização molecular de acordo com as condições estabelecidas pelo fabricante. Os produtos de PCR a partir de DNA genômico de cada clone (*Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>) são sequenciados com os iniciadores para o promotor *P*<sub>AOX1</sub>. Estas sequências e a sequência do gene *Bm86-CG* devem ser comparadas utilizando *software* ClustalW, para alinhamento de sequências.

### **Produção de rBm86-CG**

Para expressar rBm86-CG, uma colônia isolada de cada clone *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>, assim como de cada controle, é inoculada, separadamente, em frascos Erlenmeyer de 500 mL contendo 25 mL de meio BMGY. As mesmas são incubadas durante a noite em agitador

orbital a 220 rpm, 30 °C, até atingir  $DO_{600\text{ nm}} = 4,0$  (aproximadamente 16 – 18 h). As culturas são posteriormente centrifugadas a 1.500 x g durante 5 minutos à temperatura ambiente e os sobrenadantes descartados. Os sedimentos do clone *Mut<sup>+</sup>* e da X33 negativa são ressuspensos em aproximadamente 200 mL de meio BMMY, a uma  $OD_{600\text{ nm}} = 1,0$ . Cada cultura é suplementada com 1% de metanol (v/v) a cada 24 h, por um período total de 96 horas de indução. Os sedimentos do clone *Mut<sup>S</sup>* e da GS115/Albumin são ressuspensos em 250 mL de meio BMGY e incubados durante a noite. Estas culturas são novamente centrifugadas, ressuspensas em 200 mL de meio BMMY e incubadas. A indução é mantida pela suplementação com 0,5% de metanol a cada 24 horas, durante 96 horas. Após este período de indução, as culturas são centrifugadas a 3.300 x g a 4 °C, durante 5 minutos, e os sobrenadantes separados, tratados com PMSF 1 mM e congelados a -20 °C.

### Purificação e quantificação de rBm86-CG

Os sobrenadantes do material expresso pelos clones *Mut<sup>+</sup>* e *Mut<sup>S</sup>* são quantificados pelo método de curva padrão de albumina sérica bovina (BSA) em SDS-PAGE. Aliquotas de 50 µL de uma solução de BSA (0,5 µg mL<sup>-1</sup>) são utilizadas como padrões de quantificação em um gel de poliacrilamida a 7,5%. As bandas formadas no gel são quantificadas por meio de inspeção visual e pela utilização do *software* 2.0 TotalLab (Amersham / Biosciences, Reino Unido), o qual também serve para estimar a massa molecular aparente das bandas. Desta maneira, as intensidades de pixels das bandas referentes as proteínas recombinantes são comparadas as intensidades de pixels das bandas de BSA, com concentrações conhecidas (0,5 µg, 1 µg e 2 µg) sendo estimado um valor em µg para cada proteína recombinante proporcional as suas respectivas intensidades de pixels.

Vinte e cinco mL de sobrenadante do clone *Mut<sup>+</sup>* são incubados a 4 °C, durante 1 h, com metanol 1:1 (v / v) e as proteínas são precipitadas por centrifugação a 5.000 x g durante 30 minutos a 4 °C. Os precipitados de proteínas são eluídos por adição de tampão de ligação desnaturante (ureia 8 M, Na<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20 mM, pH 7,8, NaCl 500 mM). Esta solução é carregada em coluna de cromatografia de afinidade de íons Ni<sup>2+</sup> (Ni-NTA, Qiagen, Hilden, Alemanha), previamente equilibrada com tampão de ligação desnaturante. A coluna é primeiramente lavada com tampão de ligação desnaturante seguido de cinco lavagens com tampão de lavagem desnaturante (mesmo tampão de ligação desnaturante, porém com pH 6,0). A proteína rBm86-CG é eluída em tampão de eluição desnaturante (mesmo tampão de ligação desnaturante, porém com pH 4,0). O processo de purificação é monitorado em SDS-PAGE 10%. As frações eluídas de elevadas purezas são reunidas e dialisadas contra 1L de PBS a 4 °C, em suave agitação, por 24 h, sendo trocado o PBS em intervalos de 8 h.

### Eletroforese e Western blotting de r-Bm86-CG

Cinquenta µL de sobrenadante de cada um dos dois clones selecionados são misturados com 10 µL de tampão de SDS-PAGE (NuPAGE, Invitrogen) em separado. Estas amostras são incubadas durante 6 minutos a 95°C, deixadas esfriar e aplicadas (20 µL) em gel de poliacrilamida 7,5%. A eletroforese é executada por 1,5 h a 30 mA em um sis-

tema de eletroforese 1D. Outra eletroforese 1D é executada com 10 µL de sobrenadante *Mut<sup>+</sup>* por poço para a realização do *Western blotting*. As proteínas são transferidas para membrana de PVDF pré-tratada com metanol durante 10 s e água ultrapura esterilizada durante 5 minutos.

A transferência é realizada com um sistema imerso em tampão de transferência (0,3% de base Tris, 1,44% glicina, 15% metanol, pH 8,4) a 100 mA durante 2 h, em câmara fria a 4°C. A membrana é lavada com PBS, deixada secar em estufa a 25°C durante 1 h, corada com solução de Ponceau S (0,5% de Ponceau S, 1% de ácido acético glacial) e cortada em tiras. Estas tiras são bloqueadas com PBS contendo 5% de leite em pó desnatado em agitação a 30°C, durante 1 h, lavadas duas vezes com PBS-T, durante 5 minutos, e incubadas com soro primário diluídos 1:150 em PBS a 30°C, durante 1 h.

Uma tira é incubada com cada soro: anti-Gavac, anti-TickGard, anti-extrato de larva e anti-rBm86-CG. Cada tira é lavada duas vezes durante 5 minutos com PBS-T e incubada com anticorpo secundário de coelho anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase diluído 1:1000 em PBS-T a 30°C, durante 1 h. Segue-se três lavagens adicionais, enxague em água ultrapura e incubação em solução de revelação (5 mL de água Milli-Q®, 5 mg de diaminobenzidina, 0,75 mg de NH<sub>4</sub>) até que bandas bem definidas apareçam sobre a membrana de PVDF.

### **Imunoproteção em bovinos**

A proteína rBm86-CG expressa por *P. pastoris Mut<sup>+</sup>* é emulsificada com Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris), seguindo recomendações do fabricante, para produzir doses de 2 mL com 100 µg de antígeno. Um ensaio controlado é realizado para avaliar a capacidade imunogênica e protetora do antígeno rBm86-CG. Bovinos de um ano de idade da raça Holandesa são ambientados antes da experimentação e recebem cuidados veterinários adequados durante o estudo. Os bovinos são distribuídos aleatoriamente em dois grupos de seis animais cada.

Um grupo é imunizado com o antígeno rBm86-CG, seguindo o protocolo descrito abaixo. Os outros seis animais servem de grupo controle e são tratados conforme o protocolo, exceto que recebem injeções de 2 mL de adjuvante sem antígeno. Cada animal é injetado por via intramuscular nas semanas 0, 2 e 4. Amostras de soro de cada animal são colhidas semanalmente antes e após a imunização. Vinte e um dias após a última dose, os animais são desafiados com 15.000 larvas de *R. microplus*, liberadas ao longo do dorso do animal em três aplicações, durante uma semana.

A coleta de carrapatos é realizada diariamente, logo que as fêmeas ingurgitadas começaram a se desprender espontaneamente dos animais controle. Os carrapatos são levados para o laboratório, pesados e incubados a 29°C em 85% de umidade relativa até concluírem a postura. As massas de ovos são pesadas e incubadas para determinar a taxa de eclosão, ou seja, a fertilidade.

### **Colheita e análise do soro dos bovinos**

Amostras de sangue são obtidas dos animais imediatamente antes da imunização e, após, semanalmente, por punção jugular. O sangue é incubado à temperatura ambiente por 4 – 6 h e centrifugado a 3.000 x g por 10 minutos, separando-se o soro, que fica no

sobrenadante, das células sanguíneas. O soro obtido é congelado a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior análise por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*). As amostras de soro são agrupadas por grupo de tratamento e data de colheita antes do teste. Placas de microtitulação são revestidas com uma solução de  $1\text{ mg mL}^{-1}$  de rBm86-CG em tampão carbonato bicarbonato ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$  1,59% p/v,  $\text{NaHCO}_3$  2,39% p/v, pH 9,6) durante a noite a  $4^{\circ}\text{C}$ . As placas são bloqueadas com 2% de BSA em PBS-T (200  $\mu\text{L}$  por poço) e depois lavadas cinco vezes com 200  $\mu\text{L}$  de PBS-T. As placas são incubadas com soro bovino diluído a 1:100 em PBST (100  $\mu\text{L}$  por poço) durante 45 minutos a  $37^{\circ}\text{C}$  e lavadas novamente três vezes. Em seguida, 50  $\mu\text{L}$  de anticorpo secundário de coelho anti-IgG de bovino conjugado com peroxidase (Sigma, St. Louis, MO) diluído 1:20.000 em PBS são adicionados e a placa é, então, incubada durante 30 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se mais três lavagens com PBST. Ao final, são adicionados 50  $\mu\text{L}$  do substrato cromógeno com o-fenilenodiamina (1,0 mM em tampão citrato) e peróxido de hidrogênio (1:1.000 v/v). A reação é interrompida após 15 minutos com 100  $\mu\text{L}$  de NaOH (0,2 M). Um leitor de microplacas é utilizado para fazer a leitura da absorbância a 490 nm.

### **Análise estatística e de eficácia**

Os efeitos de vacinação sobre a biologia do carrapato e sua porcentagem de eficácia são determinados como descrito por Garcia-Garcia et al. (1999) e Andreotti (2006). Resumidamente, são calculadas as taxas de redução associadas à imunização com Bm86-CG em relação ao grupo não vacinado de fêmeas adultas (% DT), e de capacidade de postura (% OD) e de fertilidade (% DF). A eficácia da vacina é calculada como  $100 \times [1 - (\text{CRT} \times \text{CRO} \times \text{CRF})]$ , em que CRT, CRO e CRF são, respectivamente, a redução do número de fêmeas adultas, a redução na capacidade de postura e a redução na fertilidade.

O teste não paramétrico de Mann-Whitney é utilizado para comparar os dados biológicos e avaliar a eficácia da vacina. Os níveis médios de absorbâncias são determinados para cada grupo e comparados utilizando ANOVA, como descrito anteriormente (ANDREOTTI, 2006).

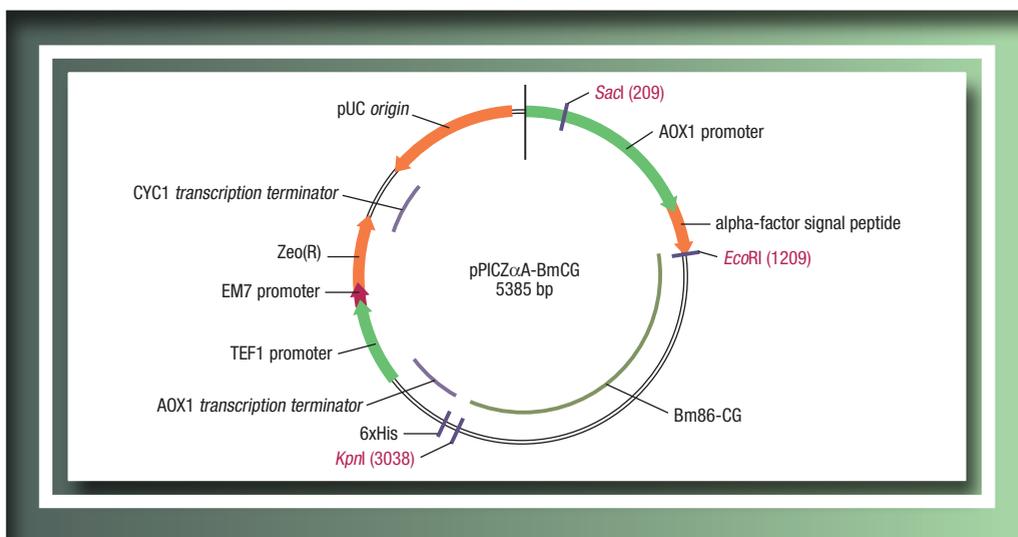
## **RESULTADOS OBTIDOS EM EXPERIMENTOS JÁ REALIZADOS COM rBm86-CG**

### **Produção e caracterização de rBm86-CG expressa em *P. pastoris***

A partir desta metodologia, um plasmídeo recombinante é construído com a inserção da sequência do gene da proteína Bm86-CG no local de múltipla clonagem do plasmídeo pPICZ $\alpha$ A, entre os locais de restrição EcoRI e KpnI (Figura 6.1). A sequência da inserção é confirmada por sequenciamento e alinhamento com o gene Bm86-CG (número de acesso do GenBank: EU352677.1) com 100% de identidade. Esta sequência é clonada considerando o cassete de expressão controlada pelo promotor do gene AOX1. O local de múltipla clonagem é mantido antes da sequência do gene Bm86-CG, o que permite uma futura clonagem de outras sequências de interesse.

### **Expressão da proteína rBm86-CG em *P. pastoris***

Os clones *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>s</sup> são selecionados e induzidos para a expressão. Espera-se que o rendimento total de proteína no sobrenadante, incluindo rBm86-CG expressa pelos



**FIGURA 6.1.** Mapa do plasmídeo pPICZ $\alpha$ A-BmCG utilizado para transformar *Pichia pastoris*. O mapa foi criado no *software* Vector NTI 8; AOX1 *promoter*: promotor fortemente induzido por metanol; SacI: enzima utilizada para linearizar o plasmídeo antes da transformação em *P. pastoris*; alpha-factor: sequência correspondente do peptídeo secretor de rBm86-CG; EcoRI: sítio de restrição utilizado para a clonagem na região 5'; Bm86-CG: gene parcial da Bm86-GC inserido no plasmídeo; KpnI: sítio de restrição utilizado para a clonagem na região 3'; AOX1 *transcription terminator*: sequência que determina o fim da transcrição; Zeo(R): gene de resistência à zeocina<sup>TM</sup>, permitindo a seleção de *P. pastoris* transformantes; pUC *origin*: origem de replicação de *Escherichia coli*. Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.

clones *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>, seja em torno de 870 mg L<sup>-1</sup>. A análise do sobrenadante da expressão da proteína em SDS-PAGE 7,5% revela uma banda de aproximadamente 80 kDa. O peso molecular esperado para a proteína rBm86-CG expressa neste sistema é de 79,1 kDa, correspondendo à banda de SDS-PAGE observada (Figura 6.2).

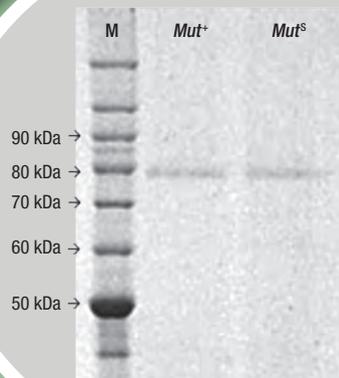
### Recuperação e purificação da proteína rBm86-CG

Na análise da eletroforese dos sobrenadantes das culturas, os níveis recuperados de rBm86-CG são em torno de 62,5 e 32 mg L<sup>-1</sup> para *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>, respectivamente. A purificação em coluna de níquel seguida por SDS-PAGE revela uma proteína com um peso molecular de aproximadamente 80 kDa (Figura 6.3).

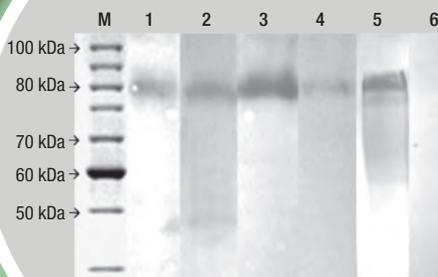
### Caracterização da proteína rBm86-CG

Camundongos são utilizados para avaliar a reação imunológica cruzada entre rBm86-GC e as formas recombinantes comerciais e nativa da proteína. A análise por *Western blotting* da proteína rBm86-CG realizada com amostras de soros de camun-

**FIGURA 6.2.** Expressão de rBm86-CG por *Pichia pastoris*. SDS-PAGE 7,5% da fração obtida pelo processo de cromatografia em coluna de níquel do sobrenadante da cultura dos clones *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>. M: Marcador BenchMark™ LoaderProtein que varia em peso molecular de 10 a 220 kDa. *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>: 10 µg por poço de rBm86-CG expressa pelos clones *Mut*<sup>+</sup> e *Mut*<sup>S</sup>, respectivamente. Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.



**FIGURA 6.3.** Western blotting da proteína rBm86-CG expressa pelo clone *Mut*<sup>+</sup>. 1: soro anti-Gavac™; 2: soro anti-TickGard<sup>PLUS</sup>; 3: soro anti-extrato de larvas; 4: soro anti-rBm86-CG; 5: extrato de larva como antígeno reconhecido pelo soro de bovino imunizado com rBm86-CG; 6: controle negativo; M: Marcador de proteína BenchMark™ para eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida que varia de peso molecular de 10 a 220 kDa. Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.



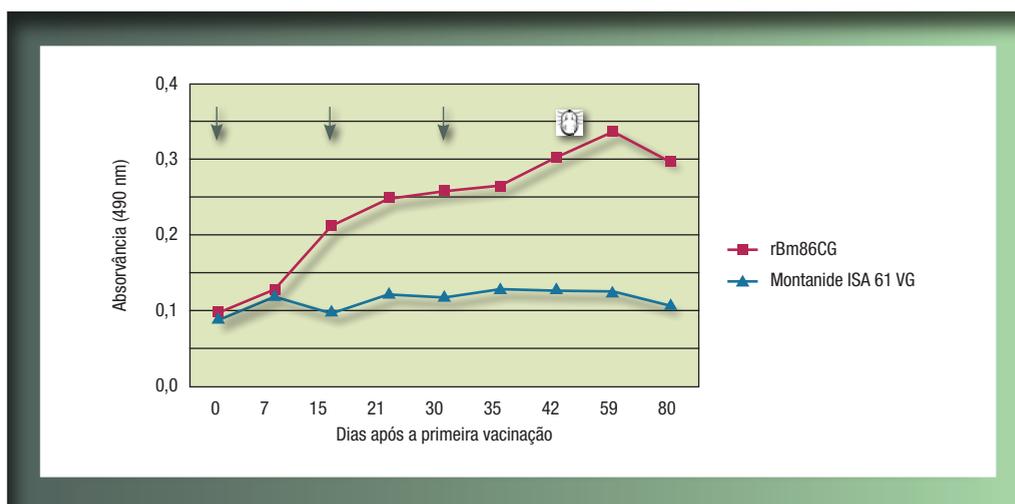
dongos imunizados com Gavac™, TickGard<sup>PLUS</sup>, extrato das larvas de *R. microplus* e rBm86-CG revela afinidade para uma proteína de aproximadamente 80 kDa. Estes resultados indicaram que a proteína rBm86-CG contém epítomos com o potencial para proteger os animais contra infestação por *R. microplus*.

## Soroconversão dos bovinos vacinados com rBm86-CG

Ao contrário dos animais controle, os bovinos vacinados desenvolvem uma resposta imune humoral significativa contra rBm86-CG (Figura 6.4) ( $p < 0,05$ ). Os níveis de IgG atingem um pico 21 dias após a terceira imunização. A resposta imune humoral de bovinos para o antígeno rBm86-CG mostra uma correlação negativa em relação ao número de teleóginas. Uma diminuição no nível de anticorpos contra rBm86-CG nos animais vacinados é observada uma semana após a infestação, igualando-se ao nível observado na semana anterior a que os carrapatos são colocados nos mesmos animais (Figura 6.4). A cinética da resposta de anticorpos entre bovinos vacinados com rBm86-CG é semelhante a dos animais imunizados com Gavac<sup>TM</sup> (RODRÍGUEZ et al., 1994) e TickGard<sup>PLUS</sup> (WILLADSEN et al., 1989).

## Imunoproteção

A coleta diária das teleóginas é encerrada 15 dias após o início do desprendimento. As dinâmicas de desprendimento e de produção de ovos mostram que um pico significativo no número de teleóginas e no peso de massa de ovos ocorreu no quarto dia ( $p < 0,05$  – dados não apresentados). A imunização de bovinos com rBm86-CG deve reduzir o número de fêmeas adultas sobre eles em 28%. Não é observada diminuição



**FIGURA 6.4.** Perfil de resposta de anticorpos de bovinos vacinados com o antígeno rBm86-CG. Os animais controle foram injetados somente com adjuvante Montanide ISA 61 VG. As absorbâncias de anticorpos de bovinos imunizados estão representadas pelo valor da  $DO_{490\text{ nm}}$ . As amostras de soro foram diluídas 1:100 e agrupadas por dia de teste. As setas indicam os dias das vacinações. O ícone carrapato indica o dia 51 após a primeira vacinação, que é quando os bovinos foram infestados. *Fonte:* Rodrigo Casquero Cunha.

**TABELA 6.1. Efeitos sobre fêmeas e sua descendência e eficácia da vacinação com o antígeno rBm86-CG contra a infestação de bovinos com *R. (B.) microplus* isolado CG.**

% REDUÇÃO <sup>A</sup> (VACINADOS/CONTROLES)				
Antígeno	DT	DO	DF	Eficácia (%) <sup>b</sup>
rBm86-CG	28	-5	8	31
	(3,305/4,594)	(0.138/0.145)	(88.66/96.63)	

<sup>A</sup>A porcentagem de redução foi calculada em relação ao grupo controle não vacinado: DT, fêmeas adultas; DO, capacidade de oviposição; DF, fertilidade.

<sup>B</sup>Eficácia (%) = 100 [1 - (CRT x CRO x CRF)]; onde CRT: redução do número de fêmeas adultas; CRO: redução da capacidade de postura; CRF: redução da fertilidade.

na capacidade de postura. A fertilidade é reduzida em torno de 8% (Tabela 6.1). A vacinação do gado com o antígeno rBm86-CG proporciona 31% de eficácia contra a infestação por *R. microplus*.

## PROCOLOS UTILIZADOS PARA EXPRESSÃO E PURIFICAÇÃO DE RRMLTI

### Síntese, clonagem e análise das sequências

Para a construção do plasmídeo, o EST (expressed sequence tag) que codifica para RmLTI (GenBank ID: CK186726 [21,24]) foi otimizado para códons usuais de *P. pastoris* e sintetizado pela EpochBiolabs, Inc. A otimização de códons foi feita utilizando software proprietário EpochBiolabs, Inc., fixado em 15% de *cut off* para a eficiência de códons. O fragmento de DNA de RmLTI sintético foi clonado no pPICZ $\alpha$ A, dando origem ao plasmídeo pPICZ $\alpha$ RmLTI. O plasmídeo recombinante codifica uma cauda de seis histidinas que é adicionada à porção N-terminal da proteína produto.

Comparações do alinhamento, similaridade e discordância com base em técnicas de bioinformática foram conduzidos entre as sequências de aminoácidos preditas para: rRmLTI, EST CK186726, BMTI-6 de cDNA de ovário (GenBank ID: P83606.2) e as sequências de aminoácidos N-terminais das BMTI-A (GenBank ID: P83609), BMTI-D (GenBank ID: P83607), BMTI-2 (GenBank ID: P83603) e BMTI-3 (GenBank ID: P83604). A ferramenta ClustalW do BioEdit e o software Vector NTI<sup>®</sup> (Invitrogen) foram utilizados para a realização das análises de bioinformática. A sequência de aminoácidos da rRmLTI foi submetida as análises *in silico* de função e de superfamília de proteínas utilizando o software InterProScan, que identifica domínios de proteínas.

### Expressão, quantificação e purificação de rRmLTI e produção de anticorpos murinos

A expressão e quantificação de proteínas no sobrenadante de cultura de *P. pastoris* são realizadas como descrito para rBm86-CG (Itens 1.6 e 1.7). As proteínas são precipitadas com metanol e ressuspensas em tampão de ligação desnaturante (Ureia 8 M, fosfato de sódio 20 mM, pH 7,8, NaCl 500 mM). A rRmLTI é purificada por cromatografia de afinidade em coluna de Ni<sup>2+</sup> (Ni-NTA; Qiagen, Hilden, Alemanha) com tampão de eluição desnaturante (ureia 8 M, fosfato de sódio 20 mM, pH 4,0, NaCl 500

mM). O processo de purificação é monitorado por SDS-PAGE 7,5%. As frações eluídas de elevadas purezas devem ser reunidas e dialisadas contra PBS, pH 7,4.

A utilização e os cuidados com os animais devem ser realizados de acordo com diretrizes institucionais e deverá ser aprovado pelo respectivo órgão de regulamentação de utilização de animais em pesquisa sendo aprovados pelo comitê de ética da referida instituição.

Soros policlonais contra extrato de larvas de *R. microplus* ou rRmLTI são produzidos utilizando camundongos BALB/c como descrito no item 1.3, sendo que a vacina é preparada com 500 µg de rRmLTI ressuspensos em 4 mL de Tris-HCl 150 mM, pH 7,4 e emulsificados com 6 mL de Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris).

### **Eletroforese e Western blotting da rRmLTI**

A eletroforese do material é realizada em gel de poliacrilamida 10% com 10 µL de sobrenadante de cultura por poço contendo 0,55 µg mL<sup>-1</sup> de proteína. O *Western blotting* é realizado como descrito anteriormente, no item 1.8.

### **Ensaio de vacinação de bovinos, análise do soro e avaliação da eficácia**

O antígeno rRmLTI expresso em *P. pastoris* é emulsificado com adjuvante Montanide ISA 61 VG (Seppic, Paris) e são preparadas doses de 2 mL contendo 100 µg da proteína recombinante. Bovinos de um ano de idade da raça Holandesa são distribuídos aleatoriamente em dois grupos de seis animais cada. Um grupo é imunizado com o antígeno rRmLTI purificado e formulado como descrito acima. O segundo grupo (controle negativo) é injetado com adjuvante/salina apenas. Amostras de soro são colhidas e processadas. Todos os procedimentos que envolvem o *stalltest* são realizados de acordo com métodos descritos para produção de rBm86-CG (itens 1.9, 1.10 e 1.11). Os soros obtidos de cada um dos seis animais, antes da primeira vacinação e após, periodicamente, dos grupos vacinados e controle são reunidos e armazenados em ultra-freezer até a realização do ELISA.

Para a realização do ELISA, placas de microtitulação são revestidas com uma solução de 1 µg mL<sup>-1</sup> de rRmLTI em tampão carbonato-bicarbonato (pH 9,6), 50 µL por poço, e incubadas durante a noite a 4°C. São testadas duplicatas das amostras de soros agrupadas por grupo e data de coleta. Os procedimentos subsequentes são realizados como descrito no item 1.10.

### **Alimentação ex vivo de carrapatos com IgGanti-rRmLTI e avaliação da taxa de eclosão**

As amostras de soro de bovinos imunizados com rRmLTI são colhidas imediatamente antes da infestação por carrapatos e submetidas a cromatografia em proteína A sepharose para purificar IgG, seguindo recomendações do fabricante. A IgG eluída da coluna tem um rendimento esperado de 5 mg mL<sup>-1</sup>. Quatro grupos, cada um constituído por dez fêmeas adultas de carrapatos, são utilizados para o tratamento. Cada carrapato, do respectivo grupo, é alimentado com a mistura de anticorpos contendo 0, 25, 50 ou 100 µg de IgG purificada em 20 µL por meio da colocação de um tubo capilar

no seu hipostômio. Depois disso as teleóginas são incubadas a 28°C, 80% de humidade até a postura. O efeito sobre a eclosão é avaliado como descrito no item 1.11.

## RESULTADOS JÁ OBTIDOS PARA PRODUÇÃO DE RRMLTI

### Produção de rRmLTI em sistema de expressão baseado em *P. pastoris*

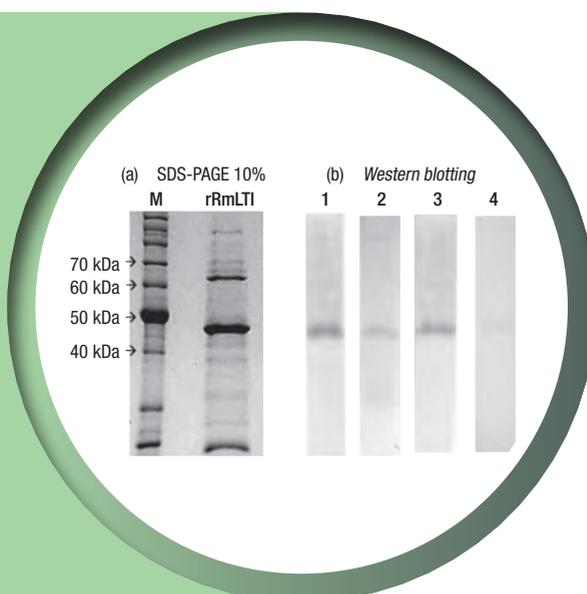
A identidade da inserção de DNA no pPICZ $\alpha$  RmLTI é confirmada por sequenciamento e alinhamento com a sequência de nucleotídeos do EST da RmLTI. Um clone *Mut*<sup>+</sup> é selecionado e a análise da expressão da proteína recombinante revelará uma banda de aproximadamente 46 kDa. O peso molecular calculado para rRmLTI é de 37,9 kDa. Resta ainda ser validado se a modificação pós-traducional por meio de glicosilação, potencialmente adicionando 8-9 manoses e duas moléculas de N-acetil-glucosamina, pode ter causado a discrepância entre os pesos moleculares calculados e observados do produto da expressão por *P. pastoris*.

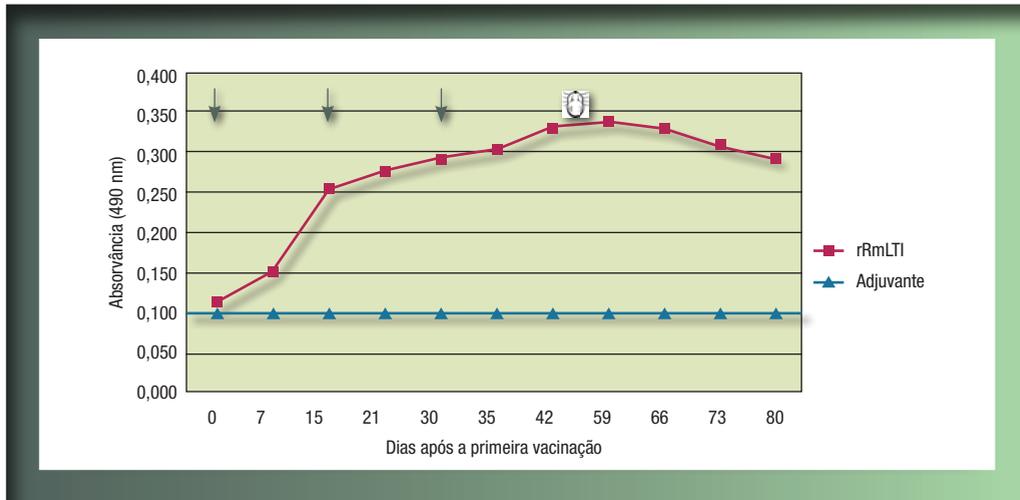
Quantificações diretas de rRmLTI a partir de sobrenadantes de culturas revelam níveis de produção de 550 mg L<sup>-1</sup>. A análise do produto da purificação em coluna de níquel mostra uma proteína de 46 kDa e, após a purificação, o rendimento será de aproximadamente 870 mg L<sup>-1</sup>. *Western blotting* da proteína rRmLTI realizado com soros de camundongos (primário anti-extrato de larvas de *R. microplus* e anti-rRmLTI) e com anticorpo monoclonal anti-Histidina, revela uma proteína de aproximadamente 46 kDa (Figura 6.5).

### Imunoproteção de bovinos contra a infestação de *R. microplus*

O perfil da resposta de anticorpos dos bovinos imunizados com a formulação vacinal contendo RmLTI é apresentado na Figura 6.6. Os níveis de anticorpos contra

**FIGURA 6.5.** Identificação do inibidor de tripsina presente em larvas de *R. microplus* expresso por *Pichia pastoris* por eletroforese e *immunoblotting*. O sobrenadante da cultura de *P. pastoris* transformada com pPICZ $\alpha$ RmLTI foi processado para realização de: (a) eletroforese (SDS-PAGE 10%), onde o gel foi carregado com M (marcador de peso molecular [BenchMarkTMPProteinLadder, Invitrogen]) e rRmLTI (sobrenadante da expressão de rRmLTI por *P. pastoris*); (b) *Western blotting* da rRmLTI detectado com: (1) anticorpo monoclonal anti-His; (2) soro de camundongos vacinados com rRmLTI; (3) soro de camundongos vacinados com extrato das larvas; (4) e soro de camundongos não vacinados.  
*Fonte:* Rodrigo Casquero Cunha.



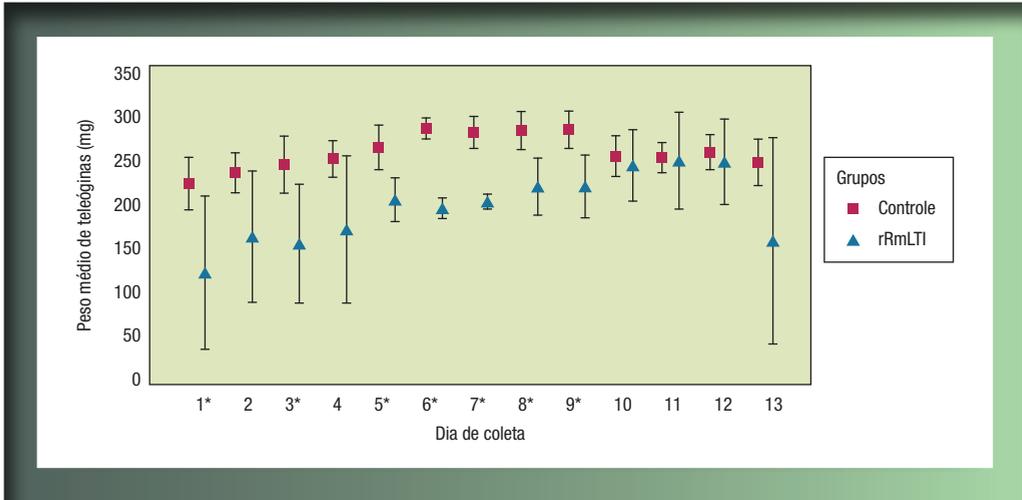


**FIGURA 6.6.** Perfil de resposta imune humoral em bovinos vacinados com rRmLTI. As leituras de absorvância são do ELISA das amostras de soros semanais coletadas dos dois grupos de seis bovinos imunizados nos dias 0, 15 e 30 (setas) com rRmLTI (linha quadriculada) ou adjuvante/salina (linha triangular). O ícone carrapato indica o dia 51 após a primeira vacinação, que é quando os bovinos foram infestados. As absorvâncias de anticorpos de bovinos imunizados estão representadas como o valor da  $DO_{490\text{ nm}}$  da diluição 1:100 do soro. As amostras individuais foram reunidas por grupo e dia de coleta para testes de ELISA. *Fonte:* Rodrigo Casquero Cunha.

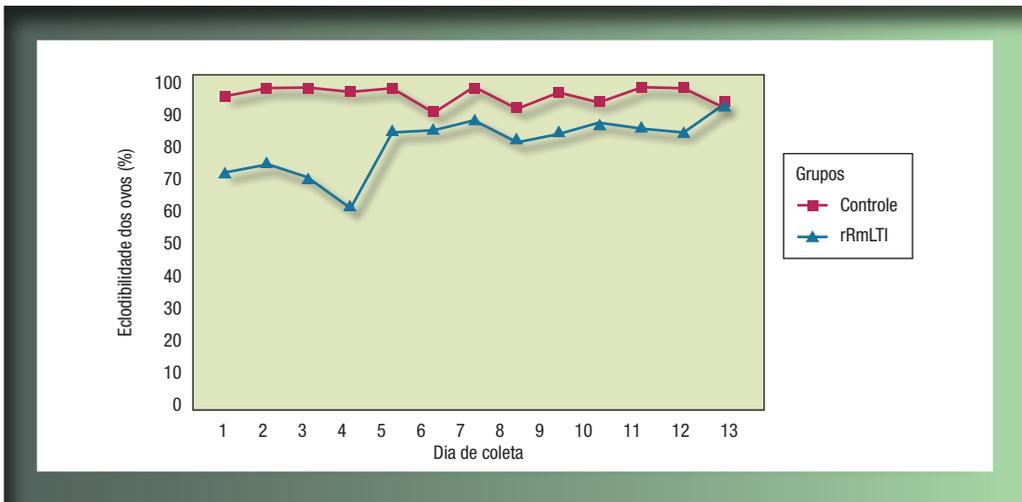
rRmLTI têm um pico cerca de 31 dias após a segunda imunização de reforço (3ª dose). A infestação de carrapatos se estabelece cerca de dez dias antes do início do aparente declínio na resposta humoral específica. Um efeito transitório sobre o peso médio das teleóginas que se desprenderam dos bovinos vacinados fica evidente até o nono dia do período de coleta (Figura 6.7).

Com exceção dos dias 2 e 4, o peso médio de teleóginas recolhidas do grupo vacinado é significativamente inferior até o nono dia (Figura 6.7,  $p < 0,05$ ). A equivalência de peso médio de teleóginas entre os grupos a partir do dia 9 do período de coleta é associada com a referida redução nos níveis de anticorpos anti-rRmLTI (Figura 6.6). Uma tendência semelhante é observada na taxa de eclosão de larvas de carrapatos que se desprenderam de bovinos vacinados (Figura 6.8).

A contagem acumulada de teleóginas até o dia 13 após o início do desprendimento é utilizada para calcular os efeitos da vacinação com rRmLTI (Tabela 6.2). Bovinos vacinados têm 30% menos carrapatos desprendendo-se deles quando comparados aos animais injetados com apenas adjuvante/salina. Embora a capacidade de postura seja afetada, há um efeito significativo associado com a vacinação no peso dos carrapatos e na eclodibilidade larval (Tabela 6.2,  $p < 0,05$ ). Em termos gerais, a vacina formulada com rRmLTI oferece 32% de imunoproteção aos bovinos contra a infestação de carrapatos (Tabela 6.2).



**FIGURA 6.7.** Redução de peso de teleóginas de *R. microplus* que se alimentaram em bovinos vacinados com rRmLTI. Média do grupo  $\pm$  Desvio Padrão. \*Dia de coleta com asterisco indica que o peso médio entre as teleóginas que se alimentaram de bovinos vacinados ou de bovinos controles foram significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ).  
 Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.



**FIGURA 6.8.** Porcentagem de eclosão de larvas por teleóginas alimentadas em bovinos vacinados com rRmLTI em comparação aos animais controles. Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.

**TABELA 6.2. Eficácia da vacina formulada com um inibidor de tripsina de larvas de *R. (B.) microplus* recombinante contra infestação deste carrapato e seus efeitos sobre os parâmetros reprodutivos das teleóginas.**

ANIMAL	NÚMERO TOTAL DE CARRAPATOS		PESO MÉDIO DOS CARRAPATOS (MG)		PESO MÉDIO DOS OVOS (MG)		ECLODIBILIDADE (%)	
	CONTROLE	VACINADO	CONTROLE	VACINADO	CONTROLE	VACINADO	CONTROLE	VACINADO
1	1209	818	267	210	112	161	95	90
2	661	441	254	209	138	142	98	85
3	571	588	276	209	121	143	97	86
4	521	602	285	234	145	160	98	89
5	1089	671	304	209	160	154	96	91
6	543	89	275	190	149	125	96	87
Média ± DP <sup>a</sup>	766 ± 303	535 ± 250	277 ± 17	210 ± 14	138 ± 18	148 ± 014	97 ± 1.2	88 ± 2.4
Teste-t	p = 0,1810		p < 0,0001		p = 0,3040		p < 0,0001	
% de Redução <sup>b</sup>	DT = 30,15		DW = 24,66		DO = -7,27		DF = 8,97	
Eficácia = 100 [1 - (535/766 x 148/138 x 88/97)] = 32 %								

<sup>a</sup>Média aritmética ± desvio padrão; estão mostrados os valores p do teste-t para amostras independentes.

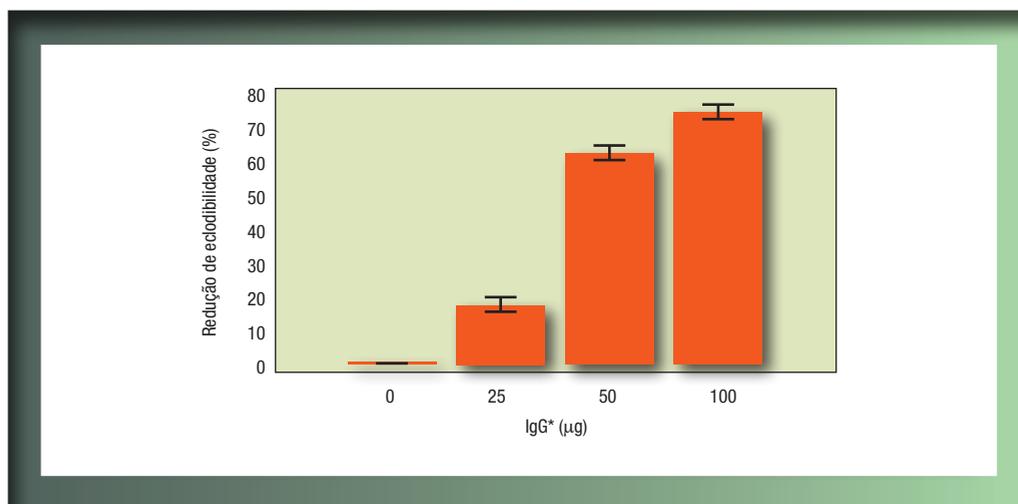
<sup>b</sup>As porcentagens de redução foram calculadas em relação ao grupo controle: %DT, número de teleóginas; %DW, peso das teleóginas; %DO, capacidade de postura; %DF, fertilidade dos ovos. Eficácia (%) = 100[1 - (CRT x CRO x CRF)]; onde CRT: redução do número de carrapatos adultos; CRO: redução da capacidade de postura, CRF: redução da fertilidade.

### Efeito de IgG anti-rRmLTI purificada na eclodibilidade larval

O efeito da resposta de anticorpos anti-rRmLTI na eclosão de larvas é também investigada *ex vivo*. Uma relação dose/resposta inversa é observada entre a eclosão de larvas e a quantidade de IgG ingerida pela teleóquina (Figura 6.9). A viabilidade dos ovos postos por teleóginas que ingeriram anticorpos IgG purificados de bovinos vacinados com rRmLTI é significativamente comprometida, chegando a uma diminuição de 75,6% na postura de carrapatos alimentados com 100 µg de IgG (p < 0,05).

### Identificação de RmLTI como um membro da família de ITPB tipo Kunitz

Uma comparação das sequências de DNA, a do EST CK186726 e do clone RmLTI otimizado para utilização em *P. pastoris*, revelou 77% de identidade entre as duas sequências. Dezenove bases desta sequência EST foram deletadas na sequência de DNA sintetizada para a clonagem de RmLTI no sistema de expressão de levedura (dados não mostrados).



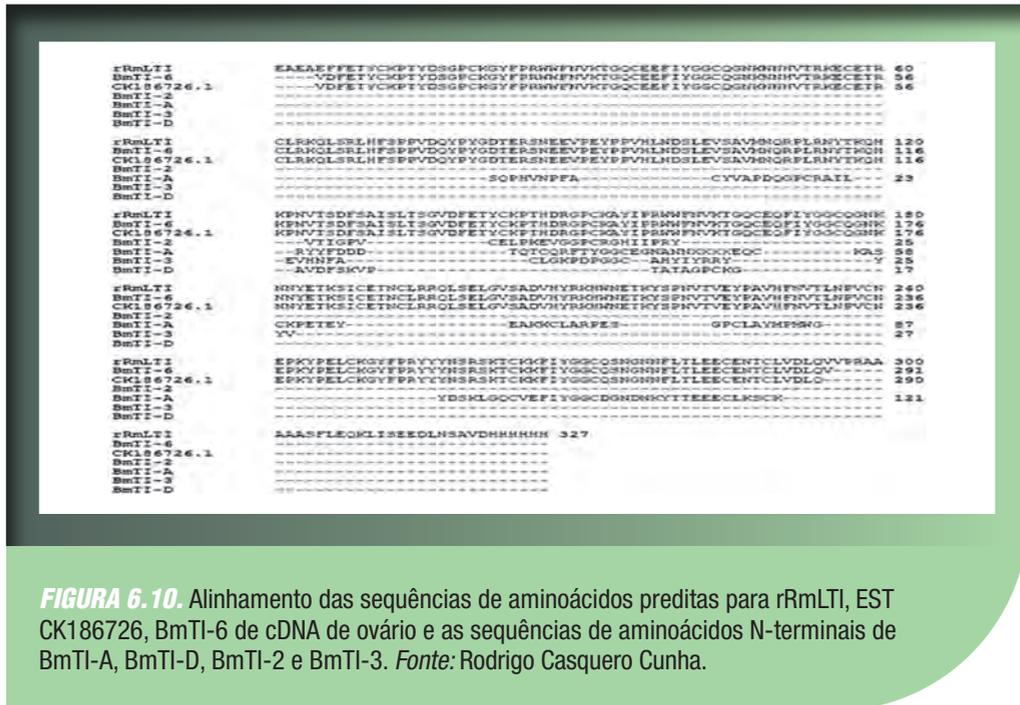
**FIGURA 6.9.** IgGanti-rRmLTI ingerida por teleóginas inibe a eclosão de larvas de maneira dose-dependente. \*Quatro grupos de dez carrapatos receberam 0, 25, 50 e 100 µg de IgG purificada. Cada teleógina foi alimentada com a quantidade especificada de IgG num volume de 20 µL utilizando um tubo capilar. O gráfico mostra a média dos tratamentos ± desvio padrão. A porcentagem média de inibição de eclosão foi significativamente diferente entre os diferentes grupos de tratamentos ( $p < 0,01$ ). *Fonte:* Rodrigo Casquero Cunha.

A Figura 6.10 representa o alinhamento das seqüências de aminoácidos previstas para rRmLTI, EST CK186726 e BMTI-6 de cDNA de ovário com as seqüências N-terminais informadas para BMTI-A, BMTI-D, BMTI-2, e BMTI-3. As seqüências de aminoácidos deduzidas de rRmLTI, EST CK186726 e BMTI-6 são 99% idênticas. Foram adicionados, durante os procedimentos de clonagem, seqüências de ácidos nucleicos que codificam seis aminoácidos adicionais (EAEAEF) na porção N-terminal e trinta e dois aminoácidos adicionais (VPRAAAAASFLEQKLISEEDLNSAVDHHHHHH) na porção C-terminal da rRmLTI. Isto devido à inserção de um local de restrição e à seqüência que codifica para o peptídeo poli-His, respectivamente.

A semelhança entre as seqüências parciais de aminoácidos sugere que RmLTI em larvas é um membro da família de ITPB-Kunitz, assim como a BMTI-6 no ovário de fêmeas adultas de carrapatos.

Uma análise melhor da suposta função de RmLTI é apresentada na Figura 6.11. Relevantes características proteicas identificadas na seqüência de aminoácidos deduzida para a seqüência CK186726 incluem três prováveis domínios de ITPB-Kunitz e dois prováveis sítios de inibidores de proteinase I2 tipo Kunitz conservados.

Como observado na BMTI-6, seis locais de N-glicosilação estão presentes na seqüência parcial da proteína RmLTI. Seis resíduos de cisteína foram observados em cada um dos três domínios Kunitz, possivelmente para formarem ligações dissulfeto que dão estabilidade ao polipeptídeo compacto na sua forma estrutural.



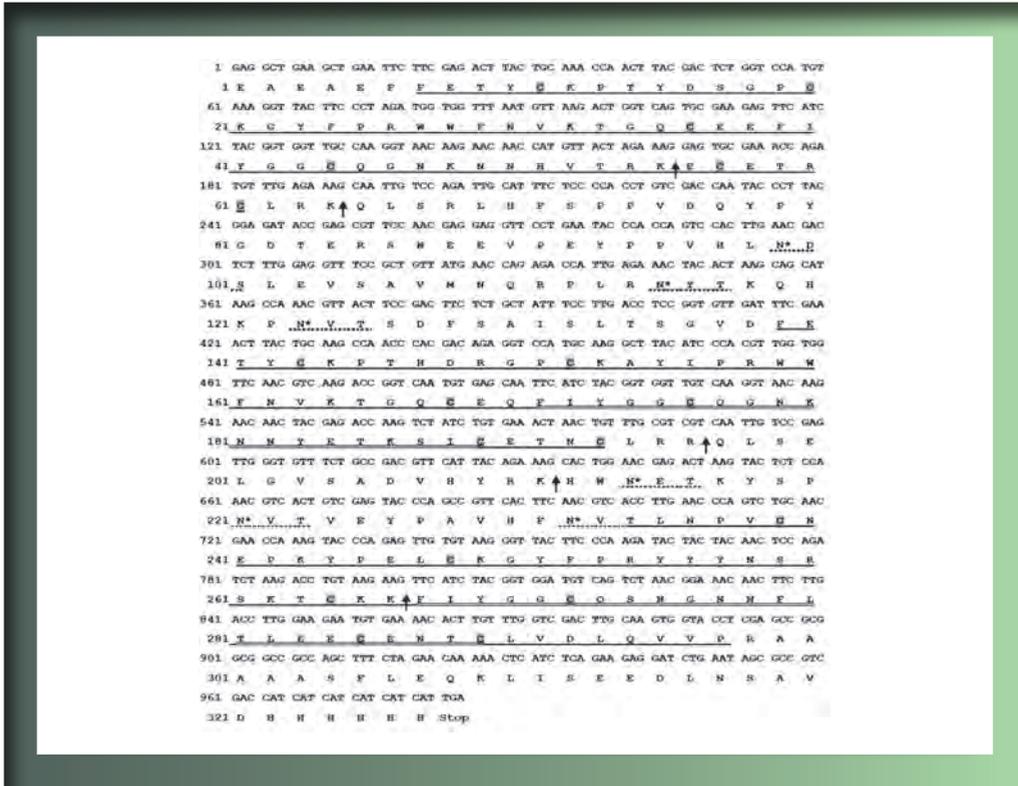
**FIGURA 6.10.** Alinhamento das sequências de aminoácidos previstas para rRmLTI, EST CK186726, BmTI-6 de cDNA de ovário e as sequências de aminoácidos N-terminais de BmTI-A, BmTI-D, BmTI-2 e BmTI-3. *Fonte:* Rodrigo Casquero Cunha.

## PROTÓCOLOS DE PREDIÇÃO, POR BIOINFORMÁTICA, DE EPÍTOPOS IMUNOGÊNICOS EM PROTEÍNAS DE CARRAPATOS

A Vacinologia Reversa e o uso da bioinformática no estudo de vacinas vêm ganhando espaço à medida que a era pós-genômica vai depositando a cada ano mais informações sobre genomas, transcriptomas e proteomas de carrapatos (GARCIA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2013; BATISTA et al., 2008).

Assim, ferramentas de bioinformática vêm sendo desenvolvidas com a finalidade de analisar estes dados em conjunto com informações já disponíveis sobre moléculas do sistema imunológico (MHCs e receptores de linfócitos B e T), tanto da espécie humana quanto de animais (principalmente camundongos). Isso permite o acesso de pesquisadores em todo o mundo a realizar ensaios *in silico*, visando uma triagem de antígenos ou suas subunidades de interesse imunogênico, para que sejam selecionados candidatos a uma vacina com maior precisão, acurácia e, menor tempo e custo (RAPPOULI, 2000).

Carrapatos são seres eucariotos, e ao contrário dos procaríotos, largamente utilizados no início da vacinologia reversa na era pós-genômica, possuem genomas muito extensos, o que os faz serem organismos complexos (com uma complexa interação com seus hospedeiros), dificultando a seleção de um antígeno em específico. Neste caso, cabe a cada pesquisador definir qual estratégia utilizar para selecionar proteínas ou famílias de proteínas alvos para serem candidatas a uma vacina para algum hospedeiro, humano ou animal, contra uma determinada espécie de carrapato. De fato, essa estratégia só será possível se o genoma, transcriptoma ou proteoma do carrapato a ser estudado for conhecido.



**FIGURA 6.11.** Um inibidor de tripsina em larvas de *R. microplus* é codificado pelo EST CK186726. A sequência de aminoácidos deduzida a partir do DNA sintetizado para codificar RmLTI e otimizado para códons usuais de *P. pastoris* foi analisada para as características de proteínas utilizando a ferramenta de bioinformática InterProScan. Resíduos de asparagina (N), preditos a serem N-glicosilados estão marcados com asteriscos. A linha pontilhada sublinha os códons Asn-Xaa-Ser/Thr. Resíduos de cisteína (C) preditos a formarem pontes dissulfetos estão destacados em cinza. Os aminoácidos que abrangem os domínios ITPB-Kunitz estão sublinhados. Dois locais preditos a serem inibidores de protease I2 tipo Kunitz conservados são duplamente sublinhados. *Fonte:* Rodrigo Casquero Cunha.

Atualmente existem distintos algoritmos que possuem finalidades específicas em análises de proteínas, como por exemplo: a probabilidade de uma determinada proteína possuir hélice transmembrana e possuir âncora GPI, que são características de proteínas associadas à membrana celular, desejadas para alvos em intestino, principalmente; possuir epítomos lineares de superfície ou conformacionais (neste caso para proteínas que estiverem depositadas em bancos de dados como Protein Data Base, e nas quais a estrutura terciária for conhecida por cristalografia por raio-X, por exemplo); epítomos para receptores de células B ou T (para alelos murinos ou humanos); regiões intrinseca-

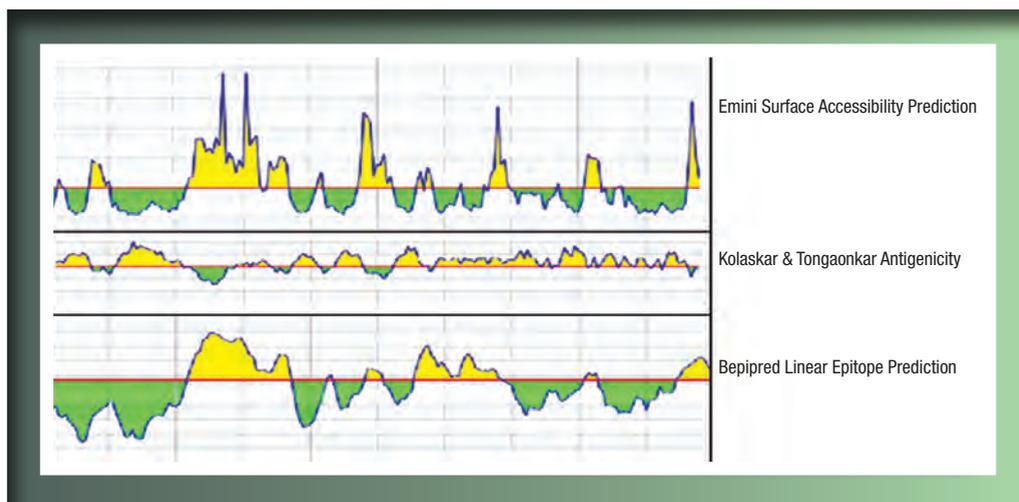
mente desordenadas, nas quais os epítomos são apresentados de maneira aleatória, uma vez que nessas regiões a estrutura terciária não é constante, entre outros.

Algumas ferramentas de bioinformática já foram utilizadas como estratégias de vacinologia reversa para carrapatos (MARITZ-OLIVIER et al., 2012; PATARROYO et al., 2002), e aqui listaremos alguns algoritmos livres e disponíveis online já utilizados e outros que podem ser úteis em prever características antigênicas, bem como a maneira de realizar essas análises. Quase todos os algoritmos exigem que as proteínas estejam em formato FASTA, que precisa ser inserido no campo solicitado:

Cytoscape (<http://www.cytoscape.org/>); determina vias metabólicas baseadas na relação entre os genes que são mais ou menos expressos. Isso indica alvos que possam ter maior importância para o sucesso do repasto sanguíneo pelo carrapato.

Geneious (<http://www.geneious.com/>): analisa várias características integradas dentro de uma proteína, como ponto isoelétrico predito, estrutura secundária, regiões antigênicas, etc.

IEDB Analysis Resource ([http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb\\_input](http://tools.immuneepitope.org/tools/bcell/iedb_input)): este servidor disponibiliza de uma gama de algoritmos que predizem distintas características dentro de uma proteína, como predição de regiões de superfície na estrutura terciária, epítomos lineares, hidrofobicidade, flexibilidade e etc. (Figura 6.12).



**FIGURA 6.12.** O exemplo da Figura 6.12 mostra alguns resultados de análise usando distintas ferramentas do mesmo servidor, de uma mesma proteína, baseada em sua estrutura primária. Os resultados são mostrados em forma de gráfico, onde, o eixo horizontal (x) representa a estrutura primária da proteína, ou seja, a sequência de aminoácidos, e o eixo vertical (y) representa o escore que cada determinada região da proteína adquiriu, baseado nas características do teste desejado, onde a linha vermelha é o limiar escolhido. Dessa forma, as regiões do gráfico que estiverem acima desta linha possuem alta probabilidade de possuir a característica desejada.

*Fonte:* Rodrigo Casquero Cunha.

IUPred (<http://iupred.enzim.hu/>): algoritmo designado para predizer regiões intrinsecamente desordenadas dentro da estrutura terciária de uma proteína (IUPs). Essa característica é interessante principalmente por consistir de regiões nas quais a estrutura terciária não é definida ou constante, resultando em possíveis epítomos que podem ser constantemente expostos, independente da região estar na superfície proteica (Figura 6.13).

MHC II binding predictions ([http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc\\_II\\_binding.html](http://tools.immuneepitope.org/analyze/html/mhc_II_binding.html)): prediz regiões na estrutura terciária da proteína que possuem grande probabilidade de se ligarem à molécula de MHC de classe II (Figura 6.14).

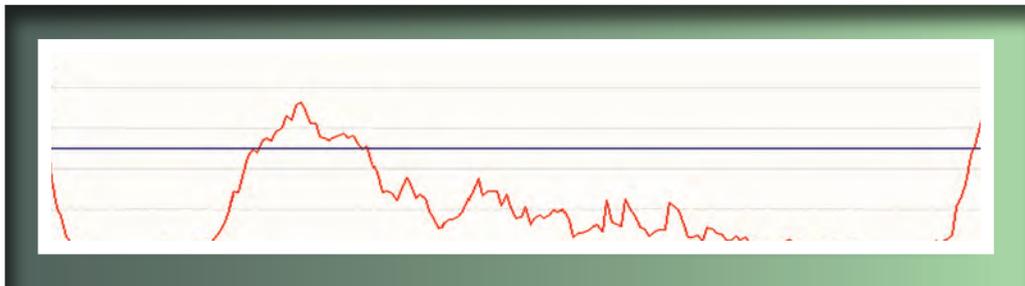
MODELLER v9.15 (<https://salilab.org/modeller/9.15/release.html>): realiza modelagem de estrutura 3D, destacando regiões que podem ser possíveis epítomos, inclusive conformacionais (Figura 6.15).

SignalP 4.1 Server (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>): este algoritmo indica a presença de peptídeos sinais, indicando se a proteína é secretada pela via clássica, assim, indica se pode ser importante para o estabelecimento da relação parasito-hospedeiro.

Swiss-PDB Viewer (<http://spdbv.vital-it.ch/>): realiza análises de várias proteínas ao mesmo tempo. Trabalha no sentido de dedução de alinhamentos estruturais e compara seus sítios ativos ou outra região relevante.

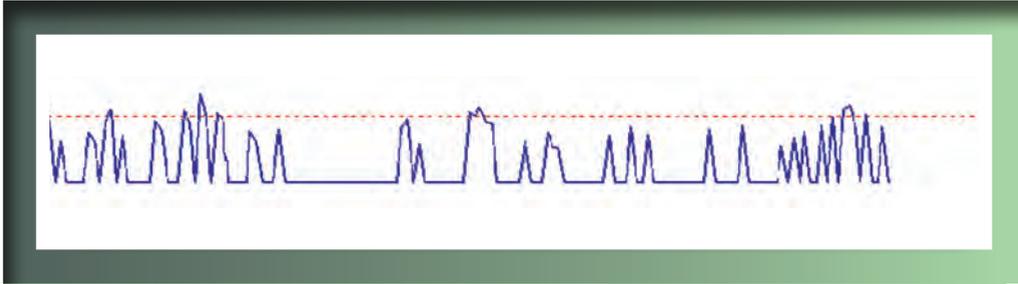
TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>): algoritmo que prediz regiões de hélices transmembranas, indicando se a proteína possui característica de proteína de superfície celular (interessante no caso de glicoproteínas de intestino (Figura 6.16).

UCSF Chimera (<https://www.cgl.ucsf.edu/chimera/>): programa que realiza análises de estruturas moléculas e dados relacionados, como mapa de densidade, arranjos supramoleculares, alinhamentos de sequências, trajetórias, resultados de acoplamento (*docking*), e conjuntos conformacionais em imagens de alta qualidade.



**FIGURA 6.13.** Neste exemplo, observamos que ao longo da estrutura primária desta proteína, apenas as regiões amino e carboxi terminais, e uma região situada entre o amino terminal e intermediária possuem escores que estão acima do limiar escolhido, ou seja, que possuem alta probabilidade de ser uma região intrinsecamente desordenada.

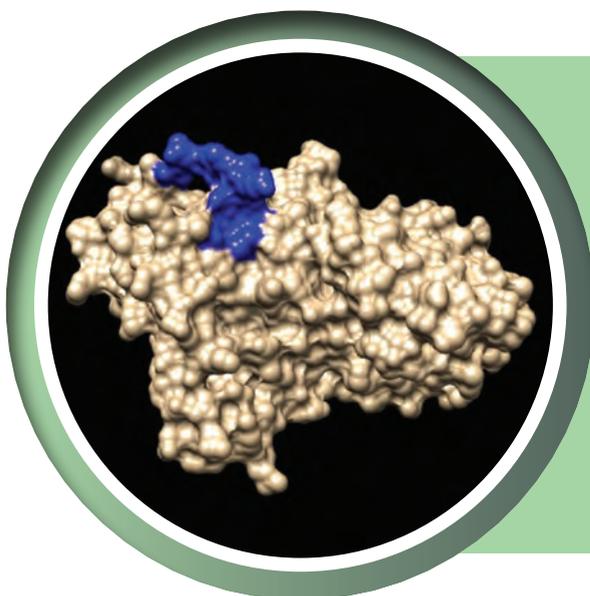
Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.



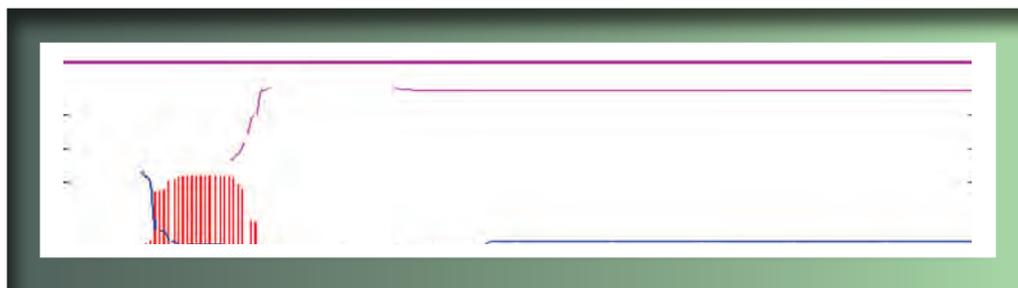
**FIGURA 6.14.** Pode-se observar a presença de seis picos no gráfico que ultrapassam o limiar (linha pontilhada vermelha). Esses pontos representam regiões ao longo da proteína com alta probabilidade de se ligarem a um receptor MHC de classe II humano oriundo de um determinado alelo, que pode ser escolhido previamente à análise, após a proteína ter sido processada e apresentada via uma célula apresentadora de antígeno (APC).

Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.

Vaxijen v2.0 (<http://www.ddg-pharmfac.net/vaxijen/VaxiJen/VaxiJen.html>): este algoritmo tem como objetivo informar se determinada proteína é ou não imunogênica, baseada na sua sequência em homologia com proteínas de seres humanos. Utilizado para determinar se proteínas virais, bacterianas, parasitárias, fúngicas ou tumorais são antigênicas.



**FIGURA 6.15.** Este é o resultado de uma imagem em 3D de uma modelagem de uma determinada proteína (traduzida do mRNA) da glândula salivar de *Amblyomma cajennense* (GARCIA et al., 2014). O destaque em azul representa a região do epítipo alvo de natureza linear. Note a localização do epítipo em região exposta à nível de estrutura terciária. Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.



**FIGURA 6.16.** Neste gráfico, regiões com características de hélice transmembrana são representadas com traços vermelhos na vertical. A região pode ser considerada hélice transmembrana caso a curva formada pelos traços vermelhos ultrapasse o limiar (linha rosa) que está paralelo ao eixo horizontal (x). Note que apesar de este exemplo possuir uma região com algum score, não ultrapassou o limiar, sendo assim, pouco provável de ser uma hélice transmembrana, o que traz indícios de ser uma proteína secretada pela via clássica ou ancorada à membrana por outra estrutura que não seja uma alfa hélice.

Fonte: Rodrigo Casquero Cunha.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALVES-BRANCO, F. P. J.; ECHEVARRIA, F. A. M.; SIQUEIRA, A. S. **Garça vaqueira (*Egretta ibis*) e o controle biológico do carrapato (*Boophilus microplus*)**. EMBRAPA-UEPAE, Bagé, 1983, 4 p. Comunicado Técnico 1.
- ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; MALAVAZI-PIZA, K. C.; SASAKI, S. D.; SAMPAIO, C. A.; TANAKA, A. S. BmTI antigen induce as bovine protective immune response against *Boophilus microplus* tick. **Internantional Immunopharmacology**, v. 2, n. 4, p. 557-563, 2002.
- ANDREOTTI, R. Performance of two Bm86 antigen vaccine formulations against tick using crossbreed bovines in stall test. **Revista Brasileira de Parastiologia Veterinária**, v.15, n.3, p. 97-100, 2006.
- ANDREOTTI, R. A synthetic bmti n-terminal fragment as antigen in bovine immunoprotection against the tick *Boophilus microplus* in a pen trial. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 66-70, 2007.
- ANDREOTTI, R.; PEDROSO, M. S.; CAETANO, A. R.; MARTINS, N. F. Comparison of predicted binders in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* intestine protein variants Bm86 Campo Grande strain, Bm86 and Bm95. **Revista Brasileira de Parastiologia Veterinária**, v. 17, n. 2, p. 93-8, 2008.
- ANDREOTTI, R.; CUNHA, R. C.; SOARES, M. A.; GUERRERO, F. D.; LEITE, F. P. L.; DE LEÓN, A. A. P. Protective immunity against tick infestation in cattle vaccinated with recombinant trypsin inhibitor of *Rhipicephalus microplus*. **Vaccine**, v. 30, n. 47, p. 6678-6685, 2012.
- ANDREOTTI, R.; GARCIA, M. V.; CUNHA, R. C.; BARROS, J. C. Protective action of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in a cattle pen trial. **Veterinary Parasitology**, v. 197, n. 1-2, 341-345, 2013.
- BATISTA, I. F. C.; CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M.; FARIA, F.; SIMONS, S. M.; BARROS-BATESTTI, D. M.; LABRUNA, M. B.; LEÃO, L. I.; HO, P. L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. Expressed sequence tags (ESTs) from the salivar glands of the tick *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Toxicon**, v. 51, n. 5, p. 823-834, 2008.
- BRUM, J. G. W. **Infecção em teleóginas de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) por *Cedecea lapagei* (Grimont et al., 1981): etiopatogenia e sazonalidade**. 1988. 95 f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Biologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 1988.
- CORDOVÉS, C. O. **Carrapato: controle ou erradicação**. 2. ed. Guaíba: Agropecuária, 1997, 177 p.

- CREGG, J. M.; CEREGHINO, J. L. Recombinant protein expression in *Pichia pastoris*. **Molecular Biotechnology**, v. 16, n. 1, p. 23-52, 2000.
- DE LA FUENTE, J. L. RODRÍGUEZ, M.; REDONDO, M.; MONTERO, C.; GARCÍA-GARCÍA, J. C.; MÉNDEZ, L.; SERRANO, E.; VALDÉS, M.; ENRIQUEZ, A.; CANALES, M.; RAMOS, E.; BOUÉ, O.; MACHADO, H.; LLEONART, R.; DE ARMAS, C. A.; REY, S.; RODRÍGUEZ, J. L.; ARTILES, M.; GARCÍA, L. Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with GAVAC against the cattle tick *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 16, n. 4, p. 366-373, 1998.
- ELDER, J. K.; KEARNAN, J. F.; WATERS, K. S.; DUNDWELL, G. H.; EMMERSON, F. R.; KNOTT, S. G.; MORRIS, R. S. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistance cattle and pasture spelling. **Australian Veterinary Journal**, Victoria, v. 56, n. 5, p. 219-231, 1980.
- GARCÍA-GARCÍA, J. C.; GONZALEZ, I. L.; GONZÁLEZ, D. M.; VALDÉS, M.; MÉNDEZ, L.; LAMBERTI, J.; D'AGOSTINO, B.; CITRONI, D.; FRAGOSO, H.; ORTIZ, M.; RODRÍGUEZ, M.; DE LA FUENTE, J. Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. **Experimental and applied acarology**, v. 23, n. 11, p. 883-95, 1999.
- GARCIA, G. R.; GARDINASSI, L. G.; RIBEIRO, J. M.; ANATRIELLO, E.; FERREIRA, B. R.; MOREIRA, H. N. S.; MAFRA, C.; MARTINS, M. M.; SZABÓ, M. P. J.; MIRANDA-SANTOS, I. K. F.; MARUYAMA, S. R. The sialotranscriptome of *Amblyomma triste*, *Amblyomma parvum* and *Amblyomma cajennense* ticks, uncovered by 454-based RNA-seq. **Parasites & Vectors**, v.7, p.430, 2014.
- GELLISSSEN, G. Heterologous protein production in methylotrophic yeasts. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 54, n. 6, p.741-750, 2000.
- GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor, 1995. 235 p.
- GOUGH, J. M.; KEMP, D. H. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. **Journal of Parasitology**, Lawrence, v. 79, n. 6, p. 900-907, 1993.
- HOHENBLUM, H.; GASSER, B.; MAURER, M.; BORTH, N.; MATTANOVICH, D. Effects of gene dosage, promoters, and substrates on unfolded protein stress of recombinant *Pichia pastoris*. **Biotechnology & Bioengineering**, v. 85, n. 4, p.367-375, 2004.
- MARITZ-OLIVIER, C.; ZYL, W. V.; STUTZER, C. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and tick-borne diseases**, v. 3, n. 3, p. 179-187, 2012.
- OLIVEIRA, C. J.; ANATRIELLO, E.; MIRANDA-SANTOS, I. K.; FRANCISCHETTI, I. M.; SÁ-NUNES, A.; FERREIRA, B. R.; RIBEIRO, J. M. C. Proteome of *Rhipicephalus sanguineus* tick saliva induced by secretagogues pilocarpine and dopamine. **Ticks and Tick-borne diseases**, v. 4, p. 469-477, 2013.
- OLIVEIRA, F. P.; SPADA J. C. P., SILVA, T. S. D.; FERREIRA, L. C.; LUQUETTI, B. C.; SOUTELLO, R. V. G. Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos diferentes grupos de acaricidas utilizados na região Noroeste do estado de São Paulo. **Revista Ciências Agrárias e da Saúde**, Andradina, v.9, n. 1, p. 54-60, 2013.
- PATARROYO, M. E.; PORTELA, R. W.; DE CASTRO, R. O.; PIMENTEL, J. C.; GUZMAN, F.; PATARROYO, M. E.; VARGAS, M. I.; PRATES, A. A.; MENDES, M. A. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 88, n. 3-4, p. 163-172, 2002.
- RAPPOULI, R. Reverse vaccinology. **Current opinion in microbiology**, v. 3, n. 5, p. 445-450, 2000.
- RODRÍGUEZ, M.; RUBIERA, R.; PENICHER, M.; MONTESINOS, R.; CREMATA, J.; FALCÓN, V.; SÁNCHEZ, G.; BRINGAS, R.; CORDOVÉS, C.; VALDÉS, M.; LLEONART, R.; HERRERA, L.; DE LA FUENTE, J. High level expression of the *B. microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v. 33, n. 2, p. 135-146, 1994.
- SUTHERST, R. W.; JONES, R. J.; SCHNITZERLING, H. J. Tropical legumes of the genus *Stylosanthes* immobilize and kill cattle ticks. **Nature**, London, v. 295, p. 320-321, 1982.
- TEODORO, R. L.; MARTINEZ, M. L.; SILVA, M. V. G. B.; MACHADO, M. A.; VERNEQUE, R. D. S. 2004. **Resistência bovina ao carrapato *Boophilus microplus*: experiência brasileira**. Anais do V Simpósio da Sociedade Brasileira de Melhoramento Animal. Pirassununga, SP. CD ROM.

- TANAKA, A. S.; ANDREOTTI, R.; GOMES, A.; TORQUATO, R. J.; SAMPAIO, M. U.; SAMPAIO, C. A. A double headed serine proteinase inhibitor – human plasma kallikrein and elastase inhibitor – from *Boophilus microplus* larvae. **Immunopharmacology**, v. 45, n. 1-3, p. 171-177, 1999.
- WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. Vaccination with “concealed” antigens for tick control. **Parasitology Today**, v. 4, n. 7, p. 196-198, 1988.
- WILLADSEN, P.; RIDING, G. A.; MCKENNA, R. V.; KEMP, D. H.; TELLAM, R. L.; NIELSEN, J. N.; LAHNSTEIN, J.; COBON, G. S.; GOUGH, J. M. Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. **Journal of Immunology**, Baltimore, v. 143, n. 4, p. 1346-1351, 1989.
- WILLADSEN, P. Novel vaccines for ectoparasites. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 71, n. 2-3, p. 209-222, 1997.



CAPÍTULO

7



**Protocolos para  
estudos de  
variabilidade  
genética em  
populações de  
carrapatos**

*Bárbara Guimarães Csordas  
Poliana Fernanda Gianchetto  
Renato Andreotti*





## INTRODUÇÃO

Em 1995, Tabachnick e Black fizeram um apelo para estudos genéticos moleculares de vetores artrópodes para preencher as lacunas em nossa compreensão da dispersão e fluxo gênico em populações de vetores.

A importância da variação genética em vetores artrópodes também foi avaliada um ano depois por Gooding (1996), com foco na competência vetorial na estruturação genética de populações de mosquitos. Até então, poucos estudos voltados especificamente para genética de populações de carrapatos foram realizadas (WALLIS; MILLER, 1983; BULL et al.; 1984; HILBURN; SATTLER, 1986).

Entretanto, já era necessário verificar a dispersão e especificidade de patógenos em subpopulações de carrapatos devido aos esforços necessários no combate e controle destes vetores (SATTLER et al., 1986; KUBASU, 1992). Em trabalhos mais recentes, a aplicação da genética para demonstrar a evolução e a especialização de hospedeiros tem sido revistos (BARKER; MURRELL, 2002; McCOY et al., 2013). Um estudo alertando a relação entre a estrutura genética de carrapatos e a epidemiologia em doença humana foi publicado por McCoy (2008).

A maioria dos estudos em variação genética está focada em questões centrais como:

- A biologia do vetor incluindo o uso de ferramentas moleculares para identificar espécies crípticas (refere-se a duas ou mais espécies que foram classificadas como uma espécie nominal única, uma vez que elas são morfologicamente indistinguíveis) (BICKFORD et al., 2007);
- A importância de quantificar a variação genética da população (ARAYA-ANCHETTA, et al., 2015);
- O papel da dispersão do vetor em epidemiologia e estrutura genética de patógenos transmitidas por vetores (ARAYA-ANCHETTA et al., 2015).

O objetivo neste capítulo é definir os protocolos mais utilizados para estudos de variabilidade genética.

## COLETA E ARMAZENAMENTO DE ESPÉCIMES PARA TRABALHOS MOLECULARES

Um protocolo de estudo de variabilidade genética inicia-se na coleta e armazenamento correto dos espécimes. Diversos estudos demonstraram que o método mais eficaz na preservação de espécimes para o trabalho molecular é o congelamento em ultrafreezer -80°C de espécimes vivos (POST et al., 1993; REISS et al., 1995; DILLON et al., 1996).

Uma alternativa aceitável é o armazenamento em etanol a 100%. Amostras coletadas de outros meios devem ser transferidas para etanol a 100% e armazenadas a -20°C tão rapidamente quanto possível, para evitar degradação do material genético por meio de enzimas. Concentrações mais baixas de etanol dão resultados variáveis e deverão ser evitados na medida do possível (CRUICKSHANK, 2002).

## EXTRAÇÃO DE DNA

Ao se extrair DNA de carrapatos para estudos de variabilidade genética é preferível que sejam de indivíduos isolados para evitar a mistura de genótipos distintos, parti-

cularmente se houver qualquer dúvida sobre a identidade dos carrapatos. O DNA extraído deve ser identificado e armazenado a  $-80^{\circ}\text{C}$  (CRUICKSHANK, 2002).

Um trabalho realizado por Halos et al. (2004) demonstrou a eficiência da extração de DNA em carrapatos *Dermacentor* spp., *Rhipicephalus* spp. e *Ixodes ricinus*. Dentre três métodos utilizados, puderam concluir que após a trituração e digestão com proteínas, as técnicas de extração de DNA com fenol/clorofórmio juntamente com kit comercial podem ser utilizados.

O método que consegue oferecer máxima eficiência, em termos de rapidez, número e dimensão de amostras a ser tratada é o combinado *bead beater* – digestão de proteína – kit de extração.

No entanto, apesar do protocolo combinado ser eficiente o custo benefício é mais alto. Trabalhos realizados por Sangioni et al. (2005) demonstraram uma alta eficiência da extração utilizando protocolo com isocianato de guanidina e fenol/clorofórmio que possuem custo intermediário. Logo, este protocolo é o mais utilizado nas pesquisas com carrapatos no Brasil.

Para realizar este protocolo então:

- Os carrapatos são identificados e colocados em tubos de 1,5mL, quando estas amostras estiverem em álcool, é necessário furá-los para evaporação. Triturar os carrapatos com ajuda de pistilos.
- Amostras são trituradas com 150  $\mu\text{l}$  de TE pH 8,0 ou PBS. Depois, com a ajuda do agitador, as amostras são misturadas por 10 segundos e com o auxílio da centrífuga é realizado o spin de 6 segundos. Adiciona-se 450  $\mu\text{l}$  do preparo Isocianato de Guanidina + Fenol.
- Posteriormente as amostras devem descansar por 10 minutos, logo após, são agitadas por 10 segundos e spin de 6 segundos alternado a cada 2 minutos. Adiciona-se 100  $\mu\text{l}$  de clorofórmio e agita-se por 10 segundos, alternando em 2 minutos de descanso.
- Centrifuga-se a 12.000 rpm por 5 minutos. Recupera-se a fase aquosa e dispensa-se o restante do material. Adiciona-se 600  $\mu\text{l}$  de isopropanol e deixar no freezer por 2 horas ou *overnight* (12-16 horas). Centrifugar a 12.000 rpm por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . Descartar o sobrenadante tomando o cuidado em limpar bem a borda do tubo. Adicionar 800  $\mu\text{l}$  de etanol a 70%. Centrifugar a 12.000 rpm por 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- Descartar o sobrenadante e secar o pellet a  $37^{\circ}\text{C}$  por 1 hora ou a  $56^{\circ}\text{C}$  no termobloco por 15 minutos, tendo o cuidado em deixar o tubo aberto. Ressuspender o *pellet* em água mili-Q autoclavada (50 $\mu\text{l}$ ). Homogeneizar bem e deixar em banho-maria ou no termobloco a  $56^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos ou *overnight* a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Identificar e quantificar cada amostra e guardá-las a  $-20^{\circ}\text{C}$ .

## **COMO ESCOLHER BONS MARCADORES PARA ESTUDOS DE VARIABILIDADE?**

Após a extração de DNA será realizada a reação em cadeia da polimerase (PCR). Porém existe um estudo minucioso para saber qual marcador molecular se encaixa melhor ao estudo proposto.

O segundo espaçador interno transcrito do gene ribossomal nuclear (ITS2) e o gene mitocondrial que codifica a proteína citocromo oxidase subunidade I (COX-I) em con-

junto fornecem uma poderosa ferramenta para a filogenética, auxiliando em baixos níveis taxonômicos. Os genes nucleares ribossomais (DNAr) 18S e 28S são ferramentas para a filogenética nos níveis mais profundos dentro da ordem Acari (CRUICKSHANK, 2002).

Marcadores diferentes são mais adequados para finalidades diferentes. Por exemplo, os genes ribossomais podem ser difíceis de alinhar, mas são susceptíveis de ter locais mais informativos do que os genes codificadores de proteínas. Mesmo que as regiões fiquem desalinhadas, estas podem ser removidas. O marcador ribossomal ainda pode deixar os locais mais informativos do que os marcadores que estão presentes em um gene que codifica proteína (McLAIN et al., 1995; FENTON et al., 2000).

Existe uma diversidade de marcadores que são utilizados em estudos com carrapatos, e todos eles têm os seus problemas e suas desvantagens. Um exemplo disso, é a evolução rápida de genes ITS que podem acarretar no não diferenciamento entre as espécies. Entretanto, escolhendo o marcador mais apropriado para a tarefa, estes problemas podem ser minimizados antes que qualquer sequenciamento seja realizado, poupando tempo e dinheiro (CRUICKSHANK, 2002).

### PROTOCOLO DE PCR

O DNA deve ser submetido à reação em cadeia da polimerase (PCR) e a concentração do DNA para a PCR é de 50-100 ng/μL, para amplificação dos fragmentos correspondentes as regiões de cada marcador molecular.

A PCR possibilita que determinada região do genoma de qualquer organismo seja multiplicada em milhões de cópias, o que facilita a análise genética e permite a caracterização de microrganismos causadores de doenças por exemplo.

Os reagentes da PCR devem ser manipulados em um ambiente adequado, que vai desde um projeto físico que separe os laboratórios ao uso de equipamentos e pipetas, evitado desta forma o risco de contaminação por DNA que não pertence às amostras trabalhadas.

**TABELA 7.1. Tipos de primers utilizados em estudo de variabilidade genética em *Rhipicephalus microplus***

PRIMERS	SEQUÊNCIAS PRIMERS (5' ---- 3')	(PB*)	REFERÊNCIAS
ITS2 F	TCGGATCACATATCAAGAGAG	749	Dados dos autores
ITS2 R	CCCAACTGGAGTGGCCAGTTT		
COX-1.2F	CTTCAGCCATTTTACCGCGA	681	Dados dos autores
COX-1.2R	CTCCGCCTGAAGGGTCAAA		
16SF	GCTCAATGATTTTTTAAATTGCTGT	450	(NORRIS et al., 1986; MANGOLD et al., 1998)
16SR	CCGGTCTGAACTCAGATCAAGT		
18SF	CCTGAGAAACGGCTACACATC	63	GUERRERO et al., 2014
18SR	GTGCCGGGAGTGGTAATT		

\*(pb) pares de base

A solução em que ocorre a reação (*master mix*) é preparada em gelo ou em suportes congelados que são próprios para realização do protocolo e posteriormente são colocadas em micro tubos de plástico de 0,2 mL esterilizados.

A PCR pode ser padronizada para um volume final de 25  $\mu$ l, contendo Tampão 10X, 50 mM de MgCl, 25 mM de dNTPs, 10  $\mu$ M de cada primer (F e R), 0,5U de *Taq* DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen by Life Technologies<sup>TM</sup>, North America, USA), 1 $\mu$ L de DNA a 50 ng/ $\mu$ L e água suficiente para o volume final.

Os primers que estão sendo mais utilizados para estudos de filogenia molecular que permitem distinguir espécies crípticas, são os marcadores moleculares de DNAmT COX-1 e 16S (BURGER et al., 2014).

Para produzir os amplicons da PCR, é necessário ter equipamento chamado de termociclador. As condições de PCR podem ser otimizadas para cada reação, como a temperatura de anelamento que são ajustadas de acordo com os oligonucleotídeos utilizados.

As condições gerais e padronizadas de temperatura para cada primer são: 95°C durante 2 min., seguido por 40 ciclos de 95°C durante 1 min., (56°C por 30 seg, no caso do primer COX-1) (60°C para os primers ITS2, 16S e 18S, por 30 seg), 72°C durante 1 min, 30 seg e, extensão final de 72°C por 7 min.

Os produtos da PCR devem ser analisados em gel de agarose (1,5%), corado com brometo de etídio e observados em transluminador UV.

As bandas visualizadas no gel de agarose, referentes aos produtos amplificados pela PCR, são purificados e utilizando protocolos de *kits* comerciais, por exemplo, o *kit* Purelink<sup>TM</sup>Kit (Invitrogen by Life Technologies<sup>TM</sup>, North America, USA). Posteriormente, se faz a clonagem em vetor pGemT-Easy<sup>®</sup>(Promega, Madison, WI-USA), segundo manual do fabricante, para sequenciamento.

## ANÁLISE GENÉTICA

O sequenciamento dos produtos da PCR, com tamanho superior a 500pb, é realizado pelo método Sanger, utilizando-se o sequenciador ABI 3730 DNA Analyser, Applied Biosystems. As reações de sequenciamento devem ser realizadas utilizando-se o *primer* universal para sequenciamento T7 Transcription Start (5'-CTAATACGACTCACTA-TAGGG-3') (TROWER; ELGAR, 1994) e o kit BigDye<sup>®</sup> Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit. As corridas são realizadas em capilares de 36 cm utilizando-se o polímero POP7 e as sequências geradas, analisadas pelo software Sequencing Analysis 5.3.1, por meio do programa Base Caller KB Phred (EWING-GREEN, 1998; EWING et al., 1998).

As sequências do plasmídeo são identificadas e removidas, utilizando-se o algoritmo de busca *hash*, do NCBI (VecScreen) (ALTSCHUL et al.,1997). Posteriormente, são obtidas as sequências consenso e alinhadas com os dados do GenBank por meio da plataforma online BLASTn (ALTSCHUL et al., 1997), para encontrar as regiões similares com as sequências já depositadas.

## ALINHAMENTO DE SEQUÊNCIAS E CONSTRUÇÃO DA ÁRVORE FILOGENÉTICA

As sequências dos marcadores moleculares são alinhadas separadamente. Para cada marcador, forma-se um banco de dados contendo todas as sequências semelhantes

obtidas da análise realizada pelo programa BLASTn. O programa Mega 6.0 (TAMURA et al., 2013) alinha as sequências retiradas do GenBank utilizando a ferramenta *Clustal W* ou o *Muscle*.

Para que possa ser realizada esta análise é necessário que o formato do arquivo seja modelo FASTA.

A ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> é utilizada para encontrar regiões de similaridade local entre sequências (ALTSCHUL et al.,1997). A ferramenta BLASTn compara sequências de nucleotídeos e calcula a significância estatística dos resultados.

Após copiar a sequência de interesse inicia-se a entrada na ferramenta BLASTn, selecionando a função BLAST; não há necessidade de mudar nenhum parâmetro desta ferramenta e é recomendado deixar em funcionamento padrão. A ferramenta começa a buscar no banco de dados do GenBank, todas as sequências nucleotídicas semelhantes a sequência de interesse.

A análise fornecerá uma pontuação dependendo do número de bases nucleotídicas lidas e alinhadas corretamente com as sequências do banco de dados, sendo (>=200) o maior valor que pode ser obtido.

Quanto menor forem os valores de *E value*, mais confiável será a análise realizada pela ferramenta; valores (0.0) são considerados estatisticamente significativos. A identidade ou semelhança (*Match*) da sequência alvo com aquelas achadas no banco de dados é demonstrado através de uma porcentagem.

Para selecionar todas as sequências, deve-se selecionar a tecla *All* e logo após em *Download*, escolher o modelo FASTA (*aligned sequences*). Selecionar em *Continue* e o banco de dados exportará todas as sequências em formato de arquivo (.txt), porém, dentro deste formato de arquivo as sequências estarão alinhadas em formato FASTA. Esta etapa é necessária para formar o banco de dados para a construção da árvore filogenética.

```
>KP226164_Rhipicephalus_microplus_MS_COX-1¶
---cttcagccattttaccgcgatgaatatactcaactaatcataaagacattggaacaa¶
tataatttaatttttggtgcátgagcaggaatáttaggattaagtataagaatattaattc¶
gacttgagctaggtcaccaggaagattaatgggtaatgatcaaatttataatgtaatcg¶
taactgccatgcatttattatgattttctttatagtaaacctattataattgggggat¶
ttggaattggcttgccctattatattaggggcccctgatatagctttccacgtataa¶
ataatataagattttggctttaccoccttcattatttttattaattaattcatctttag¶
ttgaatcaggagcagggactggatgaactgtgtatccccattatcatcaaatttatctc¶
attaegcccttctgttgatttagccattttttctcttcacttagctggggcatcatcaa¶
ttttaggggcaattaattttatacaactattttaaatatagcttctattggcatatcta¶
tagaacgtataaccttatttgtctgatctgttttaattacagccattcttttattat¶
ctttacctgttttagcaggggctattactatattgttaacagacogaaattttaatact¶
catttttgacccttcaggcggag¶
```

**FIGURA 7.1.** Exemplo de arquivos modelo FASTA: Estes arquivos podem ser abertos no programa da Microsoft, Office Word ou em bloco de notas.

Abrir o arquivo, copiar todas as informações e colar no programa Mega 6.0 (<http://www.megasoftware.net/>). Este passo é necessário para visualizar todo o alinhamento e realinhar as sequências seguindo as ferramentas do programa (TAMURA et al., 2013).

No programa Mega 6.0, se deve selecionar *Align* e em seguida em *Edit/Build Alignment*.

Logo após, abrirá uma janela que já estará selecionada em *Create a new alignment*, clicar em *OK* (Figura 7.2A). Abrirá outra janela que estará perguntando que tipo de sequência que será inserida no programa, escolha a opção DNA.

Irá aparecer uma nova janela onde deverão ser adicionadas as sequências, utilizando o comando Ctrl+V.

Selecionar todas as sequências para que ocorra o alinhamento das mesmas; selecionar em *Align by ClustalW* e escolher o o ajuste padrão para que ocorra o alinhamento.

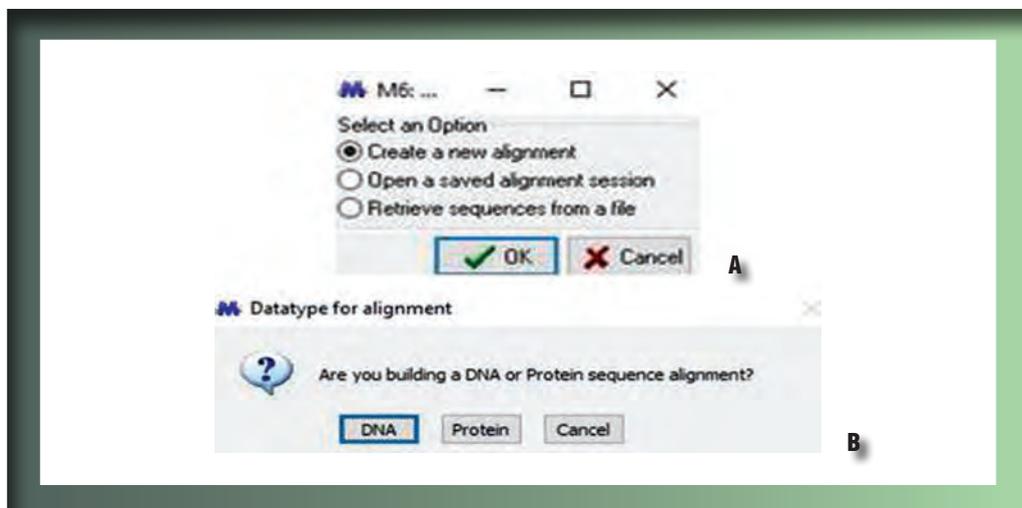
Exportar o alinhamento para que ele fique em formato FASTA.

Para a construção da árvore filogenética por inferência Bayesiana a maioria dos programas utiliza o modelo do arquivo em formato NEXUS que pode ser aberto no Office Word e ser transformado de modelo FASTA para NEXUS.

Para transformar o modelo FASTA em NEXUS:

- Abra o arquivo já exportado em FASTA, gerado pelo programa Mega 6.0, no programa Office Word;
- Acrescentar ao topo, antes de começar o texto:

```
#NEXUS
BEGIN DATA;
  DIMENSIONS NTAX=59 NCHAR=681;
```



**FIGURA 7.2.** Preparando o programa para receber as sequências nucleotídicas retiradas do *GenBank*. **(A)** Janela para criar as sequências. **(B)** Janela para escolher o tipo de sequência.

```
FORMAT DATATYPE=DNA missing=N gap=-;
MATRIX
```

- No final de cada nome das sequências terá um parágrafo, troque todos por espaço;
- No ícone substituir do Word, substitua todos (>) por (nada), assim será retirado de todo o texto;
- Ao final da última letra da última sequência, colocar (;) antes do parágrafo;
- Adicionar ao final da última sequência, o que segue abaixo:

```
END;
```

```
BEGIN MRBAYES;
```

```
log start filename=NomeOutput.txt;
setautoclose=yes;
lsetnst=6 rates=invgamma;
mcmcngen=10000000 samplefreq=10000 printfreq=10000
diagfreq=10000 nruns=2 nchains=4 temp=0.10000 savebrlens=yes;
sumpburnin=250;
sumtburnin=250;
log stop;
END;
```

- Em todo o texto onde se encontram os nomes das sequências, não poderá haver espaços. O único espaço será depois do nome das sequências e, antes de começar as sequências;

```
#NEXUS
BEGIN DATA;
- DIMENSIONS NTAX=59 NCHAR=681;
- FORMAT DATATYPE=DNA MISSING=N GAP=-;
- MATRIX
KF226159_R_microplus_AC
CTTCAGCCATTTTACCGCGATGAATATACTCAACTAATCATAAAGACATTGGAACATATATTTAATTTTGG
TGCATGAGCAGGAATATTAGGATTAAGTATAAGAATATTAATTGACTTGAGCTAGGCAACCAGGAAGATTA
RTTGGTAATGATCAAAATTTATAATGTAATCTGAACCTGCCATGCATTATTTATGATTTCTTTATAGTAATCA
CTATTATAATTTGGGGATTTGGAAATTTGGCTTTGCTCCCTATTATATTAGGGGGCCCTGATAGCTTTTCCAGG
TATAAATAATATAAGATTTTGGCTTTTCCCTTCATTATTTTATAATTAATTCATCTTAGTTGAATCA
GGAGCAGGGACTGGATGAACCTGTGATCCCTCATTATCATCAAATTTATCTCATTACGGCCCTCTGTGATT
TAGCCATTTTCTCTTCACCTTAGCTGGGGCATCATCAATTTTAGGGCAATTAATTTTATACAACTATTTT
AAATATACGTTCTATTGGCAIATCTATAGAAGTATACCTTTATTGTCTGATCTGTTTAAATTACAGCCATT
CTTTATATTATCTTTACCGT-
TTAGCAGGGCTATTACTATATTGTTAACAGACCGAAATTTAATACTTCATTTTTTGAACCCCTCAGGGGAGI
KF226162_R_microplus_AM
CTTCAGCCATTTTACCGCGATGAATATACTCAACTAATCATAAAGACATTGGAACATATATTTAATTTTGG
TGCATGAGCAGGAATATTAGGATTAAGTATAAGAATATTAATTGACTTGAGCTAGGCAACCAGGAAGATTA
```

**FIGURA 7.3.** Início do formato NEXUS utilizado em análises filogenéticas com inferência Bayesiana. Onde (NTAX=) é o número de sequências que serão analisadas e (NCHAR=) é o tamanho que todas as sequências possuem – este tamanho não pode variar entre as sequências que serão analisadas.

A estatística Bayesiana, aplicada a análises filogenéticas, constrói tanto uma árvore estimada quanto o grau de incerteza de cada grupo naquela árvore. Esse método estatístico está relacionado com a Máxima Verossimilhança. A hipótese é aquela com a máxima probabilidade posterior, que entende por ser, a verossimilhança multiplicada pela probabilidade *a priori* desta hipótese (HOLDER; LEWIS, 2003).

Para iniciar o programa MrBayes (<http://mrbayes.sourceforge.net/download.php>) é necessário que o arquivo criado esteja no mesmo local onde o programa foi instalado. Ao abrir o programa escrever “execute”, e colocar um espaço. Em seguida, escrever exatamente como foi dado o nome do arquivo, acrescentando “.nex” no final, selecionando, então, *Enter*. O programa iniciará e mostrará o tempo em que terminará de gerar a árvore (HUELSENBECK; RONQUIST, 2001; RONQUIST; HUELSENBECK, 2003).

Após o término da construção, o arquivo gerado terá como o modelo de arquivo (.tre), exemplo: COX-1.nex.con.tre. Este arquivo pode ser lido no programa livre, FigTree <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.

A leitura da árvore filogenética é feita segundo o valor da porcentagem: valores que mostram 1, significam que o ramo ou nó tem 100% de probabilidade de pertencer àquela espécie. O valor estatístico mínimo para aceitar a hipótese proposta varia entre 60 a 70%, ou seja, 0,60 a 0,70.

---

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHÄFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p.3389-3402, Sept. 1997.
- ARAYA-ANCHETTA, A.; BUSCH, J. D.; SCOLES, G. A.; WAGNER, D. M. Thirty years of tick population genetics: a comprehensive review. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 29, p.164-79, 2015.
- BARKER, S.; MURRELL, A. Phylogeny, evolution and historical zoogeography of ticks: a review of recent progress. **Experimental Applied Acarology**, v. 28, n. 1-4, p. 55-68, 2002.
- BICKFORD, D.; LOHMAN, D. J.; SOHDI, N. S.; Ng, P. K. L; MEIER, R.; WINKER, K.; INGRAM, K. K.; DAS, I. Cryptic species as a window on diversity and conservation. **Trends in Ecology & Evolution**, v. 22, n. 3, p.148-155, 2007.
- BURGER, T. D.; SHAO, R.; BARKER, S. C. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 76, p. 241-253, 2014.
- BULL, C. M.; ANDREWS, R. H.; ADAMS, M. Patterns of genetic variation in a group of parasites, the Australian reptile ticks. **Heredity**, v. 53, p.509-525, 1984.
- CRUICKSHANK, R. H. Molecular markers for the phylogenetics of mites and ticks. **Systematic & Applied Acarology**, v. 7, p.3-14, 2002.
- DILLON, N.; AUSTIN, A. D.; BARTOWSKY, E. Comparison of preservation techniques for DNA extraction from hymenopteran insects. **Insect Molecular Biology**, v. 5, n. 1, p.21-24, 1996.
- EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p.186-94, 1998.
- EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M. C.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v. 8, n. 3, p.175-185, 1998.
- FENTON, B.; BIRCH, A. N.; MALLOCH, G.; LANHAM, P. G.; BRENNAN, R. M. 2000. Gall mite molecular phylogeny and its relationship to the evolution of plant host specificity. **Experimental Applied Acarology**, v. 24, n. 10, p. 831-861, 2000.
- GOODING, R. H. Genetic variation in arthropod vectors of disease-causing organisms: obstacles and opportunities. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 3, p. 301-320, 1996.

- GUERRERO, F. D.; ANDREOTTI, R.; BENDELE, K. G.; CUNHA, R. C.; MILLER, R. J.; YEATER, K.; PÉREZ DE LEÓN, A. A. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aquaporin as an effective vaccine antigen to protect against cattle tick infestations. **Parasites & Vectors**, v. 7, p.475-487, 2014.
- HALOS, L.; JAMAL, T.; VIAL, L.; MAILLARD, R.; SUAUI, A. L. E.; MENACH, A.; BOULOUIS, H. J.; VAYSSIER-TAUSSAT, M. Determination of an efficient and reliable method for DNA extraction from ticks. **Veterinary Research**, v. 35, n. 6, p.709-713, 2004.
- HILBURN, L.; SATTLER, P. Electrophoretically detectable protein variation in natural populations of the lone star tick, *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae). **Heredity**, v. 57, n. 1, p. 67-74, 1986.
- HOLDER, M.; LEWIS, P. O. Phylogeny estimation: traditional and Bayesian approaches, Review. **Nature Reviews Genetics**, v.4, p. 275-284, 2003.
- HUELSENBECK, J. P.; RONQUIST, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogeny. **Bioinformatics**, v. 17, n. 8, p. 754-755, 2001.
- KUBASU, S. S. The ability of *Rhipicephalus appendiculatus* (Acarina, Ixodidae) stocks in Kenya to become infected with *Theileria parva*. **Bulletin of Entomological Research**, v.82, n. 3, p.349-353, 1992.
- MANGOLD, A. J.; BARGUES, M. D.; MAS-COMA, S. Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among *Metastrata* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 84, n. 6, p.478-484, 1998.
- McCOY, K. D. The population genetic structure of vectors and our understanding of disease epidemiology. **Parasite**, v. 15, p. 444-448, 2008.
- McCOY, K.D.; LEGER, E.; DIETRICH, M. Host specialization in ticks and transmission of tick-borne diseases: a review. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 3, p. 57-69, 2013.
- McLAIN, D. K.; WESSON, D. M.; OLIVER, J. H.; COLLINS, F. H. Variation in ribosomal DNA internal transcribed spacers 1 among eastern populations of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 32, n. 3, p. 353-360, 1995.
- NORRIS, D. E.; KLOMPEN, J. S. H.; KEIRANS, J. E.; BLACK, W. C. Population genetics of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) based on mitochondrial 16S and 12S genes. **Journal of Medical Entomology**, v. 33, n. 1, p. 78-89, 1996.
- POST, R. J.; FLOOK, P. K.; MILLEST, A. L. Methods for the preservation of insects for DNA studies. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 21, n. 1, p. 85-92, 1993.
- REISS, R. A.; SCHWARTZ, D. P.; ASHWORTH, A. C. Field preservation of Coleoptera for molecular genetic analyses. **Environmental Entomology**, v. 24, n. 3, p. 716-719, 1995.
- RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, v.19, n. 12, p. 1572-1574, 2003.
- SANGIONI, L. A.; HORTA, M. C.; VIANNA, M. C.; GENNARI, S. M.; SOARES, R. M.; GALVÃO, M. A.; SCHUMAKER, T. T.; FERREIRA, F.; VIDOTTO, O.; LABRUNA, M. B. Rickettsial infection in animals and Brazilian spotted fever endemicity. **Emerging Infectious Disease**, v. 11, n. 2, p. 265-70, 2005.
- SATTLER, P. W.; HILBURN, L. R.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; ROJAS AVALOS, J. B. Genetic similarity and variability between natural populations and laboratory colonies of North American *Boophilus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Parasitology**, v. 72, n. 1, p. 95-100, 1986.
- TABACHNICK, W. J.; BLACK, W. C. Making a case for molecular population genetic studies of arthropod vectors. **Parasitology Today**, v. 11, n. 1, p. 27-30, 1995.
- TAMURA, K.; STECHER, G.; PETERSON, D.; FILIPSKI, A.; KUMAR, S. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. **Molecular Biology and Evolution**, v. 30, n. 12, p. 2725-2729, 2013.
- TROWER, M. K.; ELGAR, G. S. **PCR cloning using T-vectors**. In: Methods in Molecular Biology, 31, 1994, Totowa, New Jersey. **Proceedings...** Protocols for Gene Analysis. HARWOOD, A. J. ed. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey, 1994. p. 19-33.
- WALLIS, G. P.; MILLER, B. R. Electrophoretic analysis of the ticks *Ornithodoros (Pavlovskyella) erraticus* and *O. (P.) sonrai* (Acari: Argasidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 20, p. 570-571, 1983.



CAPÍTULO

8

**Metodologias  
para extração de  
extratos vegetais  
e técnicas de  
biomonitoramento  
*in vitro***

*Larissa Bezerra dos Santos  
Fernando de Almeida Borges*





## **FITOTERAPIA, MÉTODO DE OBTENÇÃO DE EXSICATAS, EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS E OU COMPOSTOS BIOATIVOS**

Os fitoterápicos podem ser preparados a partir de extratos brutos de plantas, que compreendem os metabólitos secundários das plantas, ou seja, compostos orgânicos com funções ecológicas nas plantas (KLEIN et al., 2009), tais como, proteção e atrativos para polinizadores. Os metabólitos secundários podem ser divididos em terpenos, compostos fenólicos e alcalóides – componentes contendo nitrogênio (CROTEAU et al., 2000). Os fitoterápicos podem ser produzidos também por frações isoladas obtidas por meio destes extratos brutos (KLEIN et al., 2009) e, por meio de processos fitoquímicos, é possível identificar estas substâncias bioativas dos extratos naturais e até mesmo isolar cada constituinte.

Basicamente, a extração de compostos bioativos de plantas segue um mesmo padrão: coleta de matéria-prima, identificação botânica, secagem, congelamento, liofilização, processo de extração, análise cromatográfica, isolamentos de compostos ativos, purificação, fracionamento e avaliação da toxicidade (SAHOO et al., 2010).

O critério a ser utilizado na coleta das plantas deve considerar, primeiramente, que haja flores (o mais correto quando se busca uma exsicata é que a planta esteja na fase de florescência, para ser identificada), que sejam coletadas as flores e os frutos separados (vagem em abundância) e, nesse caso, devem ser realizados um extrato de frutos e um extrato de ramos finos e folhas. Sugere-se que sejam analisados extratos separados da mesma espécie para maior confiabilidade dos resultados obtidos.

As espécies coletadas devem ser identificadas utilizando-se um herbário e, então, catalogadas seguindo um padrão para as exsicatas onde serão depositadas (ROTTA et al., 2008).

As diferentes partes vegetais coletadas devem ser secas e depois trituradas em um moinho de facas com padronização do tamanho da partícula de 20 Mesh (malha da peneira). Os extratos podem ser obtidos por meio de um extrator de solvente acelerado utilizando nitrogênio com gás pressurizador em células de cinco e 100 mL, dependendo da quantidade do material vegetal seco (SONAGLIO et al., 2010).

Para obtenção do extrato hidro-alcoólico, podem ser utilizadas várias metodologias, mas a mais comumente utilizada para a análise químico-farmacológica é realizada com 50% de água e 50% de etanol (CECHINEL FILHO, 1998). O etanol a 70 % é muito utilizado em percolações e é o um solvente utilizado na extração de uma ampla variedade de compostos (QUAN; TURNER, 2009). Com este extrato bruto são realizados testes biológicos e caso haja atividade positiva, o próximo solvente a ser utilizado é o metanol, pois este permite a extração de mais compostos. Posteriormente, utilizando-se solventes de polaridades crescentes, é realizada uma partição – líquido-líquido. Esta partição tem a finalidade de semi-purificação das substâncias por meio das polaridades dos solventes utilizados. As frações obtidas nesta semi-purificação devem ser utilizadas em testes biológicos e, caso haja atividade positiva, deverão passar por procedimentos cromatográficos com o intuito de isolar e purificar os compostos (CECHINEL FILHO, 1998).

### **DILUENTES E ADJUVANTES EM EXTRATOS VEGETAIS**

Algumas substâncias são insolúveis em água, por isso, o emprego de solventes ou até mesmo surfactantes faz parte da busca por novas substâncias ativas. O uso de diluentes

é ajustado à polaridade de determinada planta, ou da parte da planta a ser utilizada; o diluente não deve interferir na eficácia dos compostos e deve contribuir para que o extrato expresse a real ação acaricida (RESENDE et al., 2012).

O adjuvante deve ser adequado às substâncias bioativas, com o intuito de produzir uma fórmula estável (CHAGAS et al., 2012). O diluente utilizado na solubilização do extrato tem importância significativa e, em se tratando de óleo essencial, a utilização de um solvente aumenta sua superfície de ação quando convertido em concentrado emulsionável (CHAGAS et al., 2002; SILVA et al., 2008), uma vez que pode potencializar a eficácia do extrato ou não (PIVOTO et al., 2010).

Os solventes de baixo peso molecular e com pouca viscosidade são preferíveis para os testes de imersão. Chagas et al. (2012) chamam a atenção para pesos moleculares em particular, bem como para a concentração de cada substância, mas é possível diversificar na solubilização por meio do álcool metílico, etílico, acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), acetato de etila, xilol e triton.

O etanol deve ser o solvente empregado nas extrações – solvente de grau analítico -, ou seja, solvente puro. O solvente deve ser filtrado em filtro Hexis (0,45 µm) e depois degaseificado em ultrassom. A extração do material vegetal deve ser realizada em extrator de fluido pressurizado pelo método bruto, utilizando como solvente etanol na proporção 7:3 água (SONAGLIO et al., 2010).

Uma planta pode apresentar mais de um composto bioativo e esses compostos podem ter atividade separada ou em associação (RIBEIRO et al., 2011). De uma mesma planta, os compostos extraídos e a sua ação podem variar conforme as respectivas disponibilidades nos metabólitos secundários das diferentes partes dessa planta (PIVOTO et al., 2010; D'ALESSANDRO, 2008; RIBEIRO et al., 2011), em caules e folhas (RIBEIRO et al., 2011), e em sementes (GIGLIOTI et al., 2011). Alguns compostos em pequenas proporções podem impedir a atividade de outros compostos bioativos, ou então apresentarem sinergismo com substâncias que sozinhas não produziram atividade, ou até mesmo serem a fração mais eficaz (PONTES et al., 2007).

As características químicas destes constituintes variam entre diferentes espécies e é possível que espécies pertencentes à mesma família sigam o mesmo perfil químico (CRONQUIST, 1988). Também é comum acontecer entre plantas de uma mesma espécie variação na quantidade de constituintes e ou nas respectivas bioatividades. Daí recomenda-se formar uma coleção de plantas da mesma espécie para estudar, também, a variabilidade interespecífica e, assim, não descartar uma planta com base na avaliação de um único indivíduo.

Extratos de uma mesma espécie de planta podem variar dependendo da colheita, da origem vegetal, do processo de secagem e de outros fatores como partes da planta a serem utilizadas. Atualmente, por meio de técnicas utilizando cromatografia líquida de alto desempenho (HPLC), pode-se analisar o perfil de extratos de plantas, bem como, identificar e avaliar a composição química das mesmas (ALVES, 2005).

Os processos fitoquímicos, tais como, extração, fracionamento químico, separação, isolamento, elucidação estrutural de produtos naturais (valendo-se de técnicas cromatográficas), fornecem uma direção aos estudos com extratos vegetais (HAN et al., 2007). Esses processos podem direcionar o estudo de plantas em que o extrato vegetal e ou óleo essencial foi capaz, por exemplo, de causar mortalidade em carrapatos em teste de

imersão de adulto, mas que ainda não possui ativos acaricidas identificados e ou isolados (RAVINDRAN et al., 2012).

## MÉTODOS DE IDENTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS PRESENTES NAS PLANTAS

Geralmente, o extrato bruto ou o óleo essencial é mais ativo do que o composto isolado a partir destes. Um exemplo disso é o óleo essencial de *Calea serrata* (erva de cobra), que é mais ativo em comparação ao composto isolado “Precoceno II” da mesma planta (RIBEIRO et al., 2011). Assim, como o extrato bruto pode ser mais ativo do que o composto isolado, também podem existir diferentes níveis de atividade entre as diferentes partes da planta, que podem ter ou não o composto ativo, como no caso da *Simarouba versicolor* (pau-paraíba) cuja substância acaricida ativa está presente na raiz da planta, enquanto que nas flores e folhas essa substância é inexistente (CATTO et al., 2009).

Quando o extrato bruto é semi-purificado utilizando solventes de polaridade crescentes, como hexano, diclorometano, metanol, acetona, acetato de etila e butanol, os respectivos extratos obtidos apresentarão os constituintes de acordo com a polaridade do solvente (CECHINEL FILHO, 1998). No extrato hexano podem ser encontradas substâncias como esteróides, terpenos e acetofenonas, que são substâncias altamente lipofílicas. No extrato de diclorometano podem ser encontradas substâncias como ligninas, flavonóides metoxilados, sesquiterpenos, lactonas, triterpenos, cumarinas e alcaloides na forma livre, as quais são substâncias lipofílicas. Nos extratos metanol e acetona ocorrem extrações de agliconas, ceras, sapogeninas, iridóides e sesquiterpenos, que são substâncias miscíveis com água. No extrato acetato de etila podem ser encontradas substâncias como taninos; xantonas; ácidos triterpenos; iridoides; saponinas e compostos fenólicos em geral. No extrato de butanol podem ser encontradas substâncias como flavonoides glicolisados, taninos, saponinas e carboidratos (CECHINEL FILHO, 1998; SONAGLIO et al., 2010).

É necessário ter sempre em mente, conforme já foi mencionado anteriormente, que pode haver oscilação de composição, disponibilidade e localização das substâncias químicas das plantas com relação às partes das plantas, bem como, a época de colheita e estágio de desenvolvimento (PIVOTO et al. (2010). Tais variações também podem ocorrer entre as espécies de um mesmo gênero e mesmo dentro de uma mesma espécie.

Após a realização de testes biológicos, o extrato selecionado é submetido à técnica de cromatografia em coluna aberta com sílica gel e, em seguida, novamente as frações são avaliadas por meio de cromatografia de camada delgada. O Isolamento dos compostos bioativos acontece após esta fase, quando as frações são analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência. A identificação e quantificação desses compostos ocorrem com a utilização da cromatografia gasosa acoplada a espectrofotômetro de massa, e a identificação da estrutura molecular das substâncias naturais ocorre por meio do uso da ressonância magnética (CECHINEL FILHO, 1998).

A utilização do timol, um monoterpene presente em diversas plantas, em testes *in vivo* depende de diluentes que possam manter o composto estável fazendo com que haja menos volatilização da substância ativa (OLIVEIRA et al., 2010). Quando dissolvido em etanol e água esta substância é capaz de apresentar atividade acaricida contra *Rhipicephalus sanguineus* e *Dermacentor nitens*.

## TÉCNICAS *IN VITRO* PARA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS DE PLANTAS

Os testes *in vitro* permitem uma avaliação preliminar sobre as atividades acaricidas de extratos vegetais, constituindo-se no primeiro passo para a caracterização de compostos ativos presentes nas plantas. Além disso, as técnicas *in vitro* podem ser utilizadas para avaliação de resistência acaricida (COSTA et al., 2002).

### Teste de imersão larval (TIL) – Shaw (1996)

As primeiras avaliações podem ser realizadas com três diferentes concentrações do extrato vegetal, em triplicata. Posteriormente é realizado um teste em concentrações seriadas, para que se obtenha uma curva dose X resposta (SANTOS et al., 2013).

Primeiramente, as teleóginas são coletadas no início da manhã ou final da tarde, lavadas e fixadas em decúbito dorsal em placas de *petri*, levadas a uma estufa B.O.D. por 18 dias em 27° C ±1 e UR (umidade relativa) de 80%, para obtenção de posturas.

Após este período são pesadas alíquotas de 0,025 grama de ovos, mantidos em B.O.D. em tubos tipo eppendorf, com capacidade de 2 mL. O tubo deve ser adaptado com um furo na tampa para que haja passagem de ar e possibilitar posterior injeção dos tratamentos.

**FIGURA 8.1.** Fêmeas de *R. (B.) microplus* fixadas em placa de Petri (A) e realizando a postura de ovos (B).



Os diluentes empregados nas avaliações *in vitro* devem ser determinados pela polaridade e solubilidade em água dos extratos a serem avaliados. Como exemplos de diluentes podem ser utilizados: etanol, Tween 80, água, destilada etc.

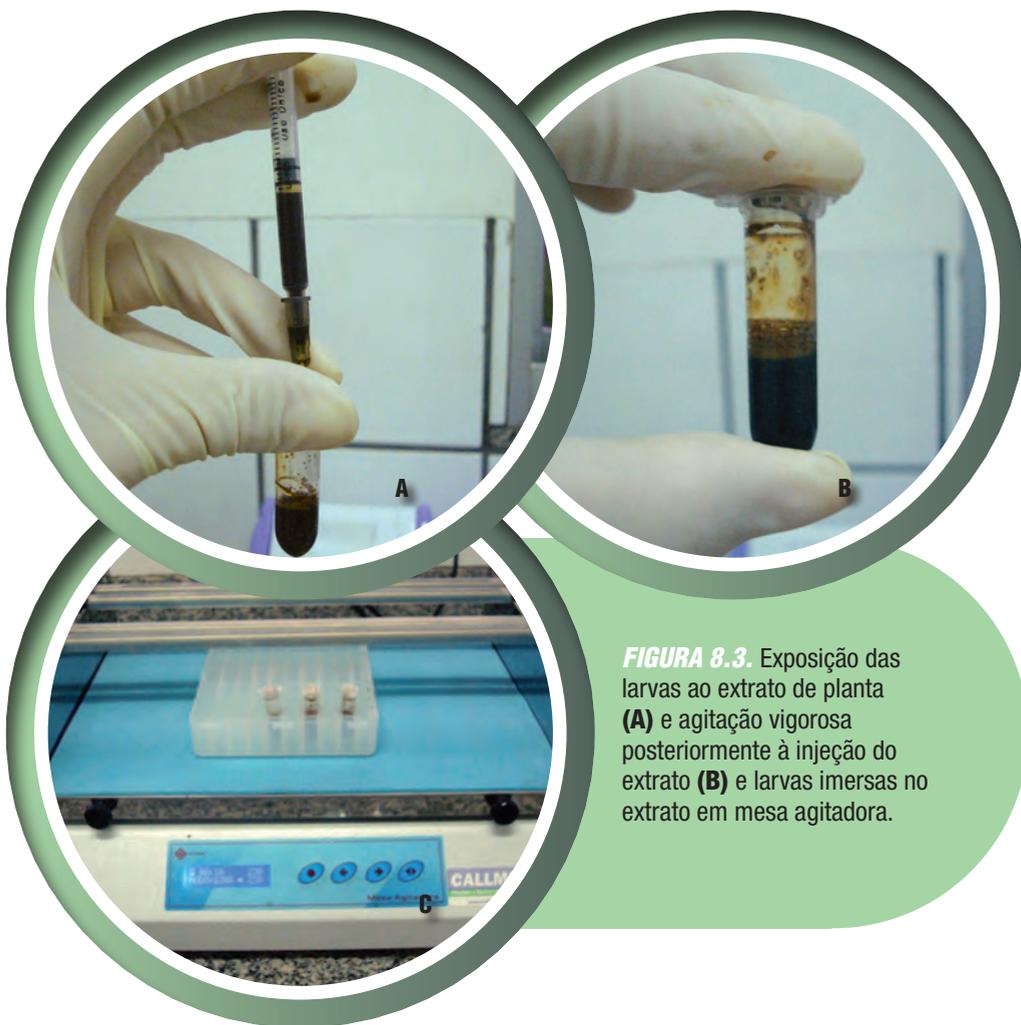
Imediatamente após a adição de 1 mL de extrato diluído nos tubos tipo eppendorf contendo cerca de 500 larvas (0,025 gramas de ovos), o tubo é fechado e agitado vigorosamente durante alguns segundos e depois a 200 rpm em mesa agitadora durante 10 minutos.

Após os 10 minutos de imersão, as larvas são colocadas em envelopes de papel filtro com o auxílio de um pincel, fechando-se os envelopes com prendedores de papel e mantendo-os em câmara BOD a  $27 \pm 1^\circ\text{C}$  e UR de 80%.

Após os 10 minutos de imersão, as larvas são colocadas em envelopes de papel filtro com o auxílio de um pincel, presas com prendedores de papel e mantidas em  $27^\circ\text{C} \pm 1$  e URA de 80% ou, dependendo das condições, em temperatura ambiente (Figura 8.4).



**FIGURA 8.2.** Larvas pós-eclosão em tubo tipo eppendorf **(A)**, extrato vegetal em agitação no vortex **(B)** e extrato vegetal solubilizado em diferentes concentrações **(C)**.



**FIGURA 8.3.** Exposição das larvas ao extrato de planta (A) e agitação vigorosa posteriormente à injeção do extrato (B) e larvas imersas no extrato em mesa agitadora.

Após 24 horas, os envelopes deverão ser abertos e as larvas vivas e mortas serem contadas (Figura 8.5).

Após 24 horas deverão ser contadas as larvas vivas e as mortas.

Para cada extrato, é utilizado um controle químico convencional positivo, com eficácia previamente determinada para garantir bom controle dos carrapatos que forem submetidos ao teste (na concentração recomendada pelo fabricante) e um controle negativo (com o diluente escolhido).

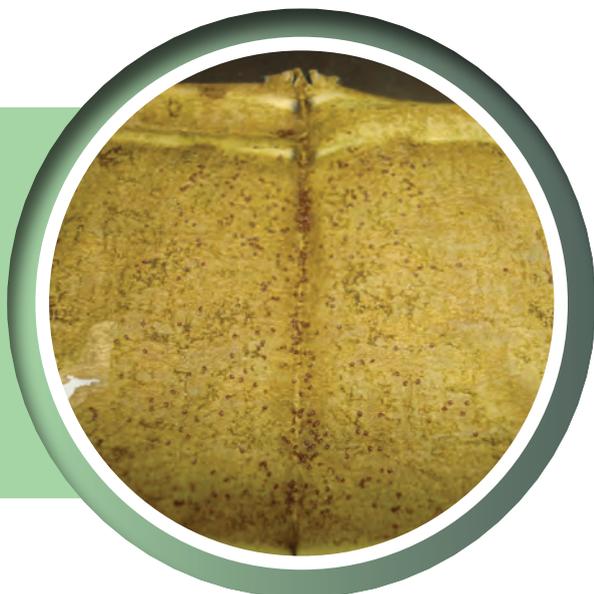
### Teste do pacote larval

Esta técnica é também utilizada no diagnóstico da resistência e pode ser utilizada na avaliação de extratos vegetais. Neste caso o extrato é diluído em tricloetileno e óleo de oliva e, em seguida, diluído seriadamente para obtenção de concentrações decrescentes do extrato ou droga. Essas soluções são utilizadas para impregnar papéis filtro. Após a



**FIGURA 8.4.** Larvas sendo depositadas no envelope de papel filtro (A) e pacotes de papel filtro com larvas e extrato mantidos em temperatura ambiente (B).

**FIGURA 8.5.** Pacotes de papel filtro, com larvas e extrato, aberto após 24 horas.



secagem dos papéis, as larvas são depositadas e mantidas nos pacotes por 24 horas sob condições padronizadas antes da avaliação da mortalidade.

### Teste de imersão de adulto (TIA) – (Drummond et al., 1973)

Devem ser utilizadas as teleóginas conforme Drummond et al. (1973), distribuídas entre as repetições de forma homogênea (de acordo com o peso).

Os testes devem ser realizados com três concentrações no teste preliminar, em duplicata (10 fêmeas por grupo, N = 20/concentração) para o estudo do efeito de diferentes concentrações sobre a mortalidade e os aspectos reprodutivos das fêmeas.

Deve ser utilizado um grupo controle positivo (na concentração de acordo com o fabricante) e um negativo (contendo água e o diluente e ou o surfactante escolhido para solubilização do extrato).

Posteriormente é realizado um teste em concentrações seriadas, para que se obtenha uma curva dose X resposta.

**FIGURA 8.6.** Teleóginas de *R. microplus* sendo preparadas para randomização (A) e solubilização de extrato para imersão do teste de imersão de adulto (B).

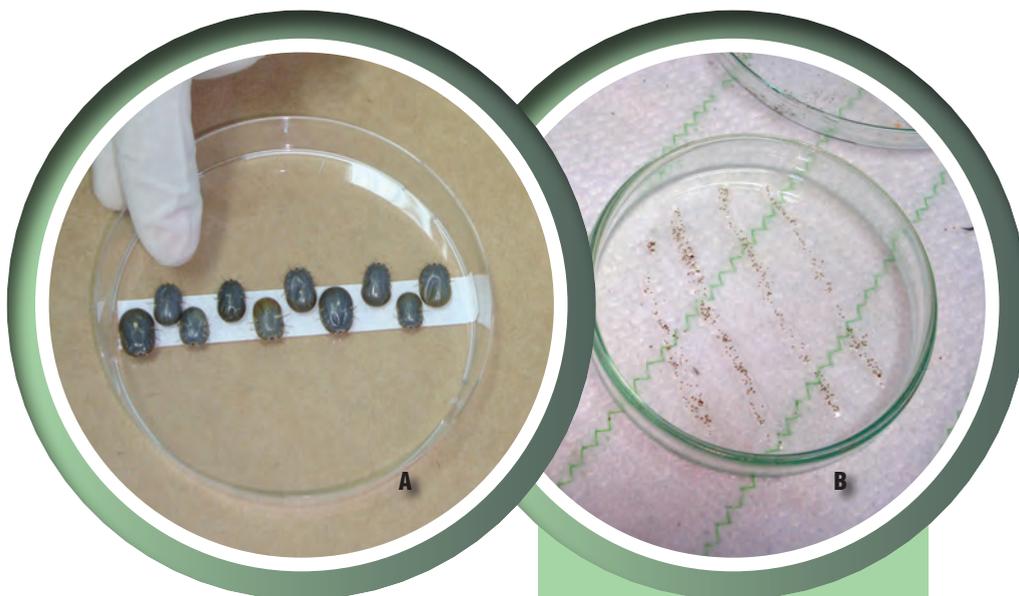




**FIGURA 8.7.** Imersão de adultos, sob agitação, em mesa agitadora por 5 minutos.

**FIGURA 8.8.** Fêmeas peneiradas, secas em papel absorvente.





**FIGURA 8.9.** Fêmeas após a secagem, sendo presas em placa de Petri (fita dupla face) e, terminada a postura, avalia-se a eclodibilidade.

### Análise dos dados

Para o cálculo da eficácia sobre as larvas, utiliza-se:

$$E\% = \left[ \frac{\text{Média de larvas mortas}}{\text{Média de larvas vivas} + \text{Média de larvas mortas}} \right] \times 100.$$

A eficiência reprodutiva (ER) e o índice de eficácia (IE) do extrato vegetal em fêmeas adultas ingurgitadas calcula-se segundo Drummond et al. (1973):

$$ER = \left( \frac{\text{Peso da massa de ovos}}{\text{Peso da massa de fêmeas}} \right) \times \% \text{ eclusão} \times 20.000.$$

$$IE = \left[ \frac{\text{ER do grupo controle} - \text{ER do grupo tratado}}{\text{ER do grupo controle}} \right] \times 100.$$

O critério de avaliação dos extratos é estabelecido, de acordo com as diretrizes da Associação Mundial para o Avanço da Veterinária Parasitologia (WAAVP) (HOLDSWORTH et al., 2006), para avaliar a eficácia de acaricidas, eficácia superior a 95%.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVES, F. N. R. Desafio para inovação de fitomedicamentos no contexto da indústria farmacêutica nacional. *Revista Fito*, v. 1, n. 1, p. 18-29, 2005.

- CATTO, J. B.; BIANCHINI, I.; SAITO, M. L. Efeito acaricida *in vitro* de extratos de plantas do Pantanal no carrapato de bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Dados eletrônicos. Embrapa gado de corte. Campo Grande, MS, 2009.
- CECHINEL FILHO, V. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, 1998.
- CHAGAS, A. C. M.; PASSOS, W. M.; PRATES, H. T.; LEITE, R. C.; FURLONG, J. F.; FORTES, I. C. P. Efeito acaricida de óleos essenciais e concentrados emulsionáveis de *Eucalyptus* spp. em *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Reserch of Animal Science**. São Paulo, v. 39, n. 5, p. 247-253, 2002.
- CHAGAS, A. C. S.; BARROS, L. D.; COTINGUIBA, F.; FURLAN, M.; GIGLIOT, R.; OLIVEIRA, M. C. S.; BIZZO, H. R. *In vitro* efficacy of plant extracts and synthesized substances on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitol Research**, v. 110, n. 1, p. 295-303, 2012.
- COSTA, S. M.; BEVILAQUA, C. M. L.; SOUZA, M. M. C.; LEITE, F. K. A. Efeito ovicida de extratos de sementes de *Mangifera indica* L. sobre *Haemonchus contortus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.11, n.2, p.57-60, 2002.
- CRONQUIST, A. **The evolution and classification of flowering plants**. Lawrence, Printed by Allen Press, Inc., 1988, 555p.
- D'ALESSANDRO, W. B. Avaliação da atividade de acaricidas químicos sintéticos, extrato botânico sobre *Rhipicephalus sanguineus* e ação dos óleos essenciais sobre *Amblyomma cajennense*. Dissertação de Mestrado em Medicina Tropical – Parasitologia – IPTSP/UFG/2008.
- DRUMMOND, R. O.; ERNEST, S. E.; TREVINO, J. L. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.
- HAN, J. M. Y.; MAN XU, J.S.; BAORONG WANG, D. G. Characterization of flavonoids in the traditional Chinese herbal medicine-Huangqin by liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. **Journal of Chromatography B**, v. 848, n. 2, p. 355-362, 2007.
- HOLDSWORTH, P. A.; KEMP, D.; GREEN, P.; PETER, R. J.; De BRUIN, C.; JONSSON, N. N.; LETONJA, T.; REHBEIN, S.; VERCRUYSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W. A. A. V. P.). Guidelines for evaluating the efficacy of acaricides agaist ticks (Ixodidade) on ruminants. **Veterinary Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 29-43, 2006.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 3, p. 241-248, 2009.
- OLIVEIRA, F. C.; OLIVEIRA, P. A.; PAPPEN, F. G.; AGUIAR, C. L. G.; FARIAS, N. A. R. Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a acaricidas utilizados em banheiros de imersão no sul do Rio Grande do Sul. XIX ENPOS. **Mostra científica UFPeL**, 2010.
- PIVOTO, F. L.; BUZATTI, A.; KRAWCZAK, F. S.; CAMILLO, G.; SANGIONI, L. A.; ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; VOGEL, F. S. F. Ação acaricida *in vitro* de *Tropaeolum majus* sob teleóginas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 40, n. 10, p. 2141-2145, 2010.
- PONTES, W. J. T.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G.; GONDIM JÚNIOR, M. G. C.; OLIVEIRA, J. V.; SCHWARTZ, M. O. E. Atividade acaricida dos óleos essenciais de folhas e frutos de *Xylopiya sericea* sobre o ácaro rajado (*Tetranychus urticae* koch). **Quimimica Nova**, vol. 30, n. 4, p. 838-841, 2007.
- QUAN, C.; TURNER, C. Extraction of Astaxanthin from Shrimp Waste Using Pressurized Hot Ethanol. **Chromatographia**, v. 70, n. 1-2, p. 247-251, 2009.
- RAVINDRAN, R.; JULIET, S.; SUNIL, A. R.; KUMAR, K. G. A.; NAIR, S. N.; KAMITHAMOL, K. K.; BANDYOPADHYAY, A.; RAWAT, A. K. S.; GHOSH, S. Acaricidal activity of *Cassia alata* against *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*. **Experimental and Applied Acarology**, v. 56, n. 1, p. 69-74, 2012.
- RESENDE, J. D.; DAEMON, E.; MONTEIRO, C. M.; MATURANO, R.; PRATA, M. C.; RODRIGUES, A. F. F. Toxicity of solvents and surfactants to *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787) (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Neumann, 1897) (Acari: Ixodidae) larvae. **Experimental Parasitology**, v. 131, n. 2, p. 139-142, 2012.
- RIBEIRO, V. L. S.; DOS SANTOS, J. C.; MARTINS, J. R.; SCHRIPSEMA, J.; SIQUEIRA, I. R.; POSER, G.; APEL, M. A. Acaricidal properties of the essential oil and precocene II obtained from *Calea ser-rata* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, v. 179, n. 1-3, p. 195-198, 2011.

- SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 462-471, 2010.
- SHAW, R. D. Culture of an organophosphate resistant strain of *Boophilus microplus* (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum. **Bulletin of Entomological Research**, v. 56, n. 3, p. 398-405, 1996.
- SILVA, F. F.; SOARES, M. C. S. C.; ALVES, C. L. C.; LIMA, M. M.; SILVA, L. V. A.; FAUSTINO, M. A. G.; SILVA JÚNIOR, F. F. Avaliação comparativa da eficácia de fitoterápicos e produtos químicos carra-paticidas no controle do *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) por meio do biocarrapaticidograma. **Medicina Veterinária**, Recife, v. 2, n. 3, p. 1-8, 2008.
- SONAGLIO, D.; ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. **Desenvolvimento tecnológico e produção de fitoterápicos**. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. UFSC. 2010.

CAPÍTULO

9



**Utilização de  
fungos  
entomopatogênicos  
para o controle  
de carrapatos:  
protocolos  
experimentais**

*Marcos Valério Garcia  
Leandro de Oliveira Souza Higa  
Vinicius da Silva Rodrigues  
Jacqueline Cavalcante Barros*





## INTRODUÇÃO

*Rhipicephalus microplus*, conhecido popularmente como carrapato-do-boi, está amplamente distribuído no mundo. O carrapato bovino pode ser encontrado nas diversas regiões do Brasil, sendo o controle deste ectoparasita realizado principalmente por meio de produtos químicos. Um dos principais entraves neste método de controle é a capacidade que o parasita tem em adquirir resistência aos tratamentos aplicados (controle químico), dificultando o controle do parasita.

Este carrapato causa prejuízos diversos à produção da cadeia bovina nacional, sendo responsável por danos diretos (perda de peso, diminuição na produção de leite, danos no couro, transmissão de patógenos) e indiretos (aquisição de acaricidas e mão-de-obra para aplicação dos produtos), somando perdas da ordem de 3,24 bilhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2014).

As principais bases químicas utilizadas atualmente no controle do carrapato são: organofosforados, piretróides, aminidínicos, lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis (fipronil) (FURLONG; PRATA, 2000) e o fluazuron (inibidor do crescimento).

A presença da resistência é constatada em todo mundo desde meados do século 20, sendo o Brasil um dos países com maior número de classes apresentando a condição de resistência por parte dos carrapatos.

Dentre as principais causas da resistência, temos a aplicação inadequada dos produtos químicos e o aumento no grau de sangue taurino, o que, geralmente, confere menor tolerância às infestações (ARANTES et al., 1995). Atualmente, no Brasil, já se tem relatos de resistência a basicamente todas as classes de acaricidas, incluindo cepas multirresistentes (RECK et al., 2014; HIGA et al., 2015).

Diante de tal situação, a necessidade de busca por novas metodologias de controle têm chamado a atenção das indústrias nos últimos anos, uma vez que estudos para desenvolver novas moléculas com ação acaricida são altamente onerosos. Dentre as formas de controle alternativo podemos citar: vacinas, produtos fitoterápicos e a utilização de microrganismos, controle este conhecido como microbiológico (bactérias, nematóides e fungos entomopatogênicos).

Nesse capítulo daremos foco principalmente aos fungos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* que, entre os entomopatogênicos, são os mais estudados (FERNANDES et al., 2012) e que exercem grande capacidade de controle desses artrópodes, principalmente quando testados em condições laboratoriais.

## USO DE FUNGOS ENTOMOPATOGÊNICOS

O termo entomopatogênico é empregado a alguns organismos que possuem a capacidade de causar patogenia a um hospedeiro, geralmente insetos, nos quais a utilização deste fungo é amplamente conhecida e empregada como inseticidas. A ação inseticida se dá por meio da liberação de toxinas e outras substâncias (ALMENARA, 2011).

Alguns fungos atuam de forma mecânica, penetrando na cutícula do hospedeiro e lesando tecidos internos do carrapato sem, necessariamente, demonstrarem preferência por orifícios naturais (anus, orifício genital e o espiráculo respiratório) (BITTENCOURT et al., 1999; GARCIA et al., 2004).

Para o controle de carrapatos, os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* são os mais estudados (FERNANDES et al., 2012).

Um dos grandes problemas no uso de fungos como acaricidas é a influência de fatores abióticos (temperatura, radiação solar e umidade), reduzindo a persistência dos conídios e consequentemente diminuindo a eficácia (RANGEL et al., 2004; BRAGA et al., 2002).

Um dos fatores que auxiliam na eficácia dos fungos entomopatogênicos é o tipo de pastagem. Basso et al. (2005) aplicaram a calda contendo cultura de *M. anisopliae* em canteiros com gramíneas das espécies *Brachiaria brizantha* e *Cynodon* spp., que infestaram previamente com larvas de *R. microplus*. Estes autores consideraram os resultados satisfatórios para o controle de larvas em pastagens, com eficácia mais acentuada em pastagens de *Cynodon* spp. A maior eficácia no capim *Cynodon* spp. se deve ao tipo de microclima provido, uma vez que o crescimento do tipo estolão favorece a retenção de umidade no solo (SAUERESSIG, 1994).

Garcia et al. (2011) avaliaram a eficácia de *M. anisopliae* em pasto de *Brachiaria decumbens* e também por meio de bioensaios *in vitro* (teste de imersão com teleóginas de *R. microplus*). O pasto tratado foi pulverizado a cada 21 dias com suspensão conidial aquosa de *M. anisopliae*, somando um total de 12 aplicações, doze animais foram mantidos na pastagem durante as pulverizações. Neste estudo, não houve diferença estatística significativa na contagem de larvas no pasto tratado e teleóginas nos animais, em comparação com o pasto controle que foi pulverizado com o veículo da suspensão, sendo a eficácia comprovada apenas nos testes de imersão.

A toxina 'destruxina A', produzida pelo fungo *M. anisopliae*, foi utilizada isoladamente para o tratamento dos carrapatos por Gôlo et al. (2011). A produção dessa toxina parece estar ligada à virulência de *M. anisopliae* (PAL et al., 2007), mas não foi encontrado nenhum efeito sobre as teleóginas ou mesmo sobre seus parâmetros reprodutivos.

Quinelato et al. (2012) selecionaram três cepas de *M. anisopliae* dentre 30 isolados provenientes de todo Brasil, mostrando eficácia de até 100% em algumas cepas nos testes *in vitro* no vigésimo dia pós tratamento. Tal achado constitui fato importante para o desenvolvimento de formulações que apresentem virulência direcionada para o controle de *R. microplus*.

Monteiro et al. (2013) realizaram estudo na tentativa de otimizar a eficácia de fungos utilizando nematóides também entomopatogênicos. Nematoides (*Heterorhabditis bacteriophora* HP88 e *Heterorhabditis indica* LPP) e fungos (*Metarhizium anisopliae* IBCB 116 e *Beauveria bassiana* ESALQ 986) foram testados separadamente e em conjunto. Em condições *in vitro* os autores encontraram eficácia parcial dos fungos (31% a 55%) e dos nematóides isoladamente (90%). O uso conjunto dos patógenos alcançou eficácia de 100%, sendo um importante achado para futuros testes no campo e para o desenvolvimento de novas tecnologias.

Diante dos avanços nas pesquisas, o interesse na produção de formulações comerciais tem aumentado muito por parte das indústrias. Algumas formulações baseadas na ação de fungos entomopatogênicos já podem ser encontradas, porém sua grande maioria foi desenvolvida para controle de pragas agrícolas (FARIA; WRIGHT, 2007).

Camargo et al. (2014) realizaram o primeiro teste com uma formulação comercial, o Metarril SP orgânico. Neste estudo, foram utilizados três litros da formulação fúngica

em cada bovino infestado com larvas de *R. microplus*. O tratamento apresentou aumento gradual na eficácia durante o decorrer do experimento, alcançando 67,39% na terceira semana. Outra informação importante no estudo envolve a ausência de reações adversas nos bovinos por efeito do tratamento.

Um fator que pode auxiliar na ação dos fungos é a utilização de óleos de origem vegetal na solução de água e suspensão conidial (SAMISH et al., 2014). Esses autores utilizaram o *Metarhizium brunneum* contra o carrapato *Rhipicephalus annulatus*, encontrando resultados significativos na variável 'eclodibilidade' das larvas em tratamentos contendo o óleo.

Os autores acima realizaram também teste em baldes, encontrando diferença significativa entre populações de carrapatos tratados e não tratados no verão e no inverno com o referido fungo. Na estação do verão, 93% das fêmeas expostas aos fungos morreram em uma semana, e no inverno, a eficácia caiu para 62.2% em três semanas. Essas informações somam importantes relatos para a formulação de produtos comerciais e futuros testes no campo.

Em um trabalho realizado na China, Sun et al. (2013) comprovaram também a eficácia do fungo *B. bassiana* no controle do carrapato bovino. Em condições laboratoriais foi comprovada a ação patogênica de três isolados do fungo, nas concentrações de  $10^7$ ,  $10^8$  e  $10^9$  conídios/mL, constituindo mais uma importante alternativa como forma de controle e objeto de futuros estudos para testes no campo.

O patógeno *B. bassiana*, juntamente com *M. anisopliae* também foi testado em ninfas de *Amblyomma cajennense*. Os relatos foram feitos por Lopes et al. (2007), que utilizou Boveril WP PL63 e Metarril SC 1037. O produto à base de *B. bassiana* foi testado nas concentrações de  $2 \times 10^7$  e  $4 \times 10^7$  conídios/mL (4.000 e 8.000g p.c./100L, respectivamente) e o produto à base de *M. anisopliae* nas concentrações de  $1 \times 10^7$ ,  $1,5 \times 10^7$ ,  $2 \times 10^7$ ,  $3 \times 10^7$  e  $5 \times 10^7$  conídios/mL (1.000; 1.500; 2.000; 3.000 e 5.000 mL p.c./100L, respectivamente). O tratamento à base de *B. bassiana* atingiu 40% apenas na formulação com maior concentração, enquanto que o produto à base de *M. anisopliae* atingiu até 100% de eficácia após seis dias de tratamento, nas duas formulações com maiores concentrações.

Mais recentemente, Webster et al. (2015) avaliaram a utilização do *M. anisopliae* associado com produtos acaricidas. Diversas formulações de acaricidas foram diluídas de acordo com a indicação comercial. Cada composto acaricida foi adicionado às suspensões de *M. anisopliae* (concentração final de  $1 \times 10^8$  conídios/mL) e deixados em contato por oito diferentes intervalos (1, 5, 10, 24, 48, 72, 96 e 120 horas).

Todos os acaricidas testados por Webster et al. (2015) (amitraz, cipermetrina, diazinon, cipermetrina + clorpirifós + butóxido de piperonila) reduziram a viabilidade dos fungos em pelo menos um dos tempos, com exceção da formulação cipermetrina + clorpirifós.

Os autores acima realizaram ainda experimentação no campo, utilizando 20 bovinos (*Bos taurus taurus*) com os seguintes tratamentos: formulação acaricida (cipermetrina + clorpirifós); suspensão conidial de *M. anisopliae*; formulação acaricida + suspensão conidial; grupo controle sem tratamento. Não houve diferença estatística nos tratamentos com acaricida e suspensão conidial isoladamente (71.1% e 56.3%, respectivamente), porém a associação entre os dois produtos apresentou 97.9% de eficácia.

### **Protocolo utilizado experimentalmente para obtenção da suspensão de conídios puros do fungo *M. anisopliae* visando o controle do carrapato *R. microplus* na pastagem**

- O fungo *M. anisopliae* pode ser cultivado em placas de Petri contendo como substrato uma mistura de batata, dextrose e ágar (BDA), mantida em estufa a  $27 \pm 0,5$  °C, sem fotoperíodo (na ausência de luz).
- Recuperação da virulência do fungo: a partir de placas colonizadas, pode-se realizar bioensaios para recuperação da virulência do isolado. Recomenda-se utilizar três grupos de dez fêmeas de *R. microplus* ingurgitadas. Para tal é empregado o Teste de Imersão de Adultos (TIA), onde as teleóginas são imersas na suspensão conidial do fungo na concentração de  $10^8$  conídios/mL, durante três minutos. O mesmo procedimento deve ser aplicado no grupo testemunha ou controle, no qual é utilizado apenas o veículo da suspensão.
- Após a morte das fêmeas e extrusão do patógeno, o fungo é reisolado em placas de Petri contendo o meio BDA.
- Este processo ocorre até que a ação do fungo sobre as teleóginas alcance um percentual de eficácia (morte) maior do que 90%.
- Posteriormente o fungo é novamente reisolado e a cultura pura é destinada a uma empresa especializada na produção em massa do fungo, segundo metodologia descrita por Leite et al. (2003).
- A produção se dá em sacos contendo 1 kg de arroz seco com o fungo crescido, os quais são mantidos a  $-20$  °C até o momento do uso.

### **Preparo da suspensão conidial**

- Aproximadamente dois dias antes da data da pulverização, coleta-se uma amostra dos sacos de arroz com o fungo, para formar amostras menores. Para tanto, desta amostra se coleta alíquotas de 1 g que são transferidas em tubos de ensaio contendo nove mL de solução de Tween 80. Após vigorosa agitação em agitador elétrico de tubo para separar os conídios do arroz e desagregar as cadeias de conídios, faz-se a contagem em câmara de Neubauer para determinação da quantidade de conídios por grama de arroz.
- Estas mesmas suspensões são usadas para determinação da viabilidade dos conídios, segundo metodologia descrita por Marques et al. (2004).
- No dia da pulverização, os sacos de estocagem do fungo são retirados do freezer e colocados em geladeira para descongelar. Cerca de 3 a 4 horas antes da pulverização o arroz de cada saco (1 kg) é transferido para um saco de plástico com capacidade para cinco litros. Estes sacos recebem três litros de solução aquosa de Tween 80® a 0,1% (v/v), sendo, em seguida, submetidos a uma vigorosa manipulação externa para separação dos conídios do arroz e desagregação das cadeias de conídios (Figura 9.1). Logo após, a suspensão obtida é coada em pano fino de algodão para evitar o entupimento do bico do pulverizador durante a aplicação (Figura 9.2).
- As suspensões de cada saco de arroz são misturadas e diluídas em água para obtenção da suspensão conidial a ser pulverizada na pastagem (Figura 9.3). Coleta-se, então, uma alíquota da suspensão para determinar a sua concentração em câmara

de Neubauer e, concomitantemente, para avaliação da atividade do fungo “in vitro”. Essa verificação é importante na determinação de eventual necessidade de correção da quantidade de conídios a ser pulverizada.

### Aplicação da suspensão

- São utilizados em média cinco a seis quilogramas de arroz com o fungo, para produzir 400 L de suspensão conidial, que é a quantidade suficiente para pulverizar em média 66,7 mL de suspensão por metro quadrado de pastagem.

**FIGURA 9.1.** Remoção dos conídios de *Metarhizium anisopliae* do arroz.  
Foto: Marcos Valério Garcia.



**FIGURA 9.2.** Coagem da suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* em tecido de algodão.  
Foto: Marcos Valério Garcia.



- Em pastagens nas quais é possível o uso de trator a aplicação é realizada com pulverizador de barra, com bico tipo cônico, a 50 cm de altura do solo (Figura 9.4). É recomendável que as pulverizações sejam efetuadas a partir das 17 horas, em dias nublados, ou no início da manhã. Durante o horário de verão pulverizar depois das 18 horas. A aplicação também pode ser feita por aviões agrícolas, quando a pastagem for muito extensa e/ou não permitir o uso de tratores.



**FIGURA 9.3.** Acondicionamento da suspensão de *Metarhizium anisopliae* para transportar até o local da pulverização.  
Foto: Marcos Valério Garcia.



**FIGURA 9.4.** Aplicação da suspensão conidial de *Metarhizium anisopliae* em pastagem de *Brachiaria decumbens*, com pulverizador de barra.  
Foto: Marcos Valério Garcia.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ALMENARA, D. P.; NEVES, M. R. C.; KAMITANI, F. L.; WINTER, C. E. Entomopathogenic nematodes: two sides of a symbiosis. **Revista da Biologia**, v. 6b, p. 1-6, 2011.
- ARANTES, G. J.; MARQUES, A. O.; HONER, M. R. O carrapato bovino, *Boophilus microplus*, no município de Uberlândia, MG: Análise de sua resistência contra carrapaticidas comerciais. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 4, n. 2, p. 89-93, 1995.
- BASSO, L. M. S.; MONTEIRO, A. C.; BELO, M. A. A.; SOARES, V. E.; GARCIA, M. V.; MOCHI, D. A. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesquisa agropecuária brasileira**, Brasília, v. 40, n. 6, p. 595-600, jun. 2005.
- BITTENCOURT, V. R. E. P.; MASCARENHAS, A. G.; FACCINI, J. L. H. The penetration of the fungus *Metarhizium anisopliae* on *Boophilus microplus* in experimental conditions. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 29, n. 2, p. 351-354, 1999.
- BRAGA, G. U. L.; RANGEL, D. E. N.; FLINT, S. D.; MILLER, C. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Damage and recovery from UV-B exposure in conidia of the entomopathogens *Verticillium lecanii* and *Aphanocladium album*. **Mycologia**, v. 94, n. 6, p. 912-920, 2002.
- CAMARGO, M. G.; MARCIANO, A. F.; SÁ, F. A.; PERINOTTO, W. M. S.; QUINELATO, S.; GÔLO, O. S.; ANGELO, I. C.; PRATA, M. C. A.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Commercial formulation of *Metarhizium anisopliae* for the control of *Rhipicephalus microplus* in a pen study. **Veterinary Parasitology**, v. 205, n. 1-2, p. 271-276, 2014.
- FARIA, M. R.; WRAIGHT, S. P. Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. **Biological Control**, v. 43, n. 3, p. 237-256, 2007.
- FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 300-305, 2012.
- FURLONG, J.; PRATA, J. R. S. **Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas**. Embrapa Gado de Leite, 2000, 2p. (Sustentabilidade da Atividade Leiteira, 34).
- GARCIA, M. V.; MONTEIRO, A. C.; SZABÓ, M. P. J.; MOCHI, D. A.; SIMI, L. D.; CARVALHO, W. M.; TSURUTA, A. S.; BARBOSA, J. C. Effect of *Metarhizium anisopliae* fungus on off-host *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from tick-infested pasture under cattle grazing in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 181, n. 2-4, p. 267-273, 2011.
- GÔLO, P. S.; ANGELO, I. C.; CAMARGO, M. G.; PERINOTTO, W. M. S.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Effects of destruxin A on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 20, n. 4, p. 338-341, 2011.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R.; BARROS, A. T.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H.; LEÓN, A. A.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. **Medicinal chemistry**, v. 5, n. 7, p. 326-333, 2015.
- LOPES, R. B.; ALVES, S. B.; PADULLA, L. F. L.; PÉREZ, C. A. Eficiência de formulações de *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* para o controle de ninfas de *Amblyomma cajennense* (Fabricius, 1787). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, Jaboticabal, v. 16, n. 1, p. 27-31, 2007.
- LEITE, J. G.; BATISTA FILHO, A.; ALMEIDA, J. E. M.; ALVES, S. B. **Produção de fungos entomopatogênicos**. 1. Ed. Ribeirão Preto: Sene Pinto, 2003, v. 1, 92p.
- MARQUES, R. P.; MONTEIRO, A. C.; PEREIRA, G. T. Crescimento, esporulação e viabilidade de fungos entomopatogênicos em meios contendo diferentes concentrações do óleo Nim (*Azadirachta indica*). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n.6, p.1675-1680, 2004.
- MONTEIRO, C. M. O.; ARAÚJO, L. X.; MATOS, R. S.; GÔLO, O. S.; ANGELO, I. C.; PERINOTTO, W. M. S.; RODRIGUES, C. A. C.; FURLONG, J.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; PRATA, M. C. A. Association between entomopathogenic nematodes and fungi for control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Parasitology Research**, v. 112, n. 10, p. 3645-3651, 2013.

- OLIVO, C. J.; CARVALHO, N. M.; SILVA, J. H. S.; VOGEL, F. F.; MASSARIOL, P.; MEINERZ, G.; MOREL, C. A. A. F.; VIAU, L. V. Óleo de citronela no controle de carrapatos bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n. 2, p. 406-410, mar.-abr. 2008.
- PAL, S.; LEGER, R. J. S.; WU, L. P. Fungal peptide destruxin A plays a specific role in suppressing the innate immune response in *Drosophila melanogaster*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 12, p. 8969-8977, 2007.
- QUINELATO, S.; GOLO, P. S.; PERINOTTO, W. M. S.; SÁ F. A.; CAMARGO, M. G.; ANGELO, I. C.; MORAES, A. M. L.; BITTENCOURT, V. R. E. P. Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* s.l. isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. **Veterinary Parasitology**, v. 190, n. 3-4, p. 556-565, 2012.
- RANGEL, D. E. N.; BRAGA, G. U. L.; FLINT, S. D.; ANDERSON, A. J.; ROBERTS, D. W. Variations in UV-B tolerance and germination speed of *Metarhizium anisopliae* conidia produced on artificial and natural substrates. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 87, n. 1, p. 77-83, 2004.
- RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALLANGOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R. S. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 128-36, 2014.
- SAMISH, M.; ROT, A.; MENT, D.; BAREL, S.; GLAZER, I.; GINDIN, G. Efficacy of the entomopathogenic fungus *Metarhizium brunneum* in controlling the tick *Rhipicephalus annulatus* under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 206, n. 3-4, p. 258-266, 2014.
- SAUERESSIG, T. M. **Estudo da fase não parasitária do carrapato de bovinos em pastagens cultivadas e nativa no Distrito Federal**. Planaltina: Embrapa Cerrados, 1994. 15p. (Boletim de Pesquisa, 37).
- SUN, M.; REN, Q.; GUAN, G.; LI, Y.; HAN, X.; MA, C.; YIN, H.; LUO, J. Effectiveness of *Beauveria bassiana sensu lato* strains for biological control against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in China. **Parasitology International**, v. 62, n. 5, 412-415, 2013.
- WEBSTER, A.; RECK, J.; SANTI, L.; SOUZA, U. A.; DALL'AGNOL, B.; KLAFKE, G. M.; BEYS-DA-SILVA, W.; MARTINS, J. R.; SCHRANK, A. Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 3-4, 302-308, 2015.
- WHO – World Health Organization, 1965. Technical Report Series No. 296, pp. 29.



**Protocolos  
sobre bioensaios  
para diagnóstico  
da resistência de  
*Rhipicephalus  
microplus* aos  
acaricidas**

*Marcos Valério Garcia  
Leandro de Oliveira Souza Higa  
Jacqueline Cavalcante Barros  
Renato Andreotti*





## INTRODUÇÃO

Mundialmente presente nos rebanhos bovinos, o carrapato-do-boi (*Rhipicephalus microplus*) detém grande importância para a pecuária nacional e também mundial. No presente capítulo, teve-se como objetivo principal mostrar os protocolos laboratoriais utilizados para diagnosticar a resistência deste carrapato aos acaricidas de contato.

O carrapato *R. microplus* se destaca como um dos principais ectoparasitas causadores de perdas significativas na pecuária nacional e de muitos outros países. Existe uma estimativa de cálculo no Brasil onde os danos econômicos, tanto de forma direta quanto indiretamente relacionados ao parasitismo pelo carrapato-do-boi, somam um prejuízo no entorno de 3,24 bilhões de dólares ao ano (GRISI et al., 2014).

Sabidamente este parasita necessita de apenas um hospedeiro para realizar seu ciclo de vida parasitária (monoxeno), sendo este hospedeiro preferencialmente o gado bovino (ROCHA, 1984). Por meio do processo de hematofagia podem inocular, por processo natural, juntamente com a sua saliva, diferentes patógenos causadores de doenças aos bovinos. Um exemplo clássico disso é a infecção por bactérias *Babesia bovis*, *B. bigemina* e pelo protozoário *Anaplasma marginale*, que são os agentes responsáveis pela enfermidade denominada Tristeza Parasitaria Bovina (TPB) (GUGLIELMONE et al., 2006). Estas enfermidades já são bem definidas e descritas, sendo de fácil tratamento quando a doença é diagnosticada logo no início.

Neste contexto, Labruna et al. (2005) relatam que esses carrapatos também podem acometer diversos outros hospedeiros, seja acidental ou até naturalmente. Dentre eles podem ser destacados os cervídeos e os canídeos, entre outros (Figura 10.1).

Em se tratando do Brasil, sabe-se (dados não publicados) que cervídeos, quando em cativeiro, são bons hospedeiros, capazes de manter uma população deste carrapato. Tal situação também ocorre quando cervídeos de vida livre convivem com bovinos na mesma área de pastagem, sofrendo também com infestações de *R. microplus*.

**FIGURA 10.1.** Cervo em cativeiro com infestação de *Rhipicephalus microplus* (Foto cedida por Matias Pablo Juan Szabó e José Mauricio Duarte Barbante).



Outros animais que podem ser parasitados pelo carrapato-do-boi são os ovinos deslanados. Um estudo conduzido por Garcia et al. (2015), com ovinos deslanados, demonstrou a capacidade dos mesmos em manter pelo menos três gerações dos carrapatos na pastagem, apresentando, porém, declínio gradativo do número de indivíduos. É necessário, no entanto, mais estudos nessa área, pois existe um questionamento sobre a capacidade dessas espécies de hospedeiros secundários ou acidentais serem mantenedores de uma população do carrapato *R. microplus* em condições naturais no Brasil (Figura 10.2).

O que se pode afirmar categoricamente é que este ectoparasita é de grande interesse para a cadeia produtiva bovina e o mesmo representa, conforme colocado anteriormente, uma grande preocupação, pois os gastos relacionados com o controle e tratamentos de doenças por eles transmitidos são elevados.

A problemática maior é que atualmente, no Brasil, não existe uma política pública específica para o controle e venda de produtos acaricidas. Praticamente tudo o que se faz nessa área é movido, na maioria das vezes, somente por interesse comercial, acarretando uma sequência de erros e fracassos na tentativa de se controlar esses carrapatos.

Devido a essa realidade, o controle deste carrapato está cada vez mais difícil, levando em conta que não somente no Brasil, mas também no mundo, o carrapato *R. microplus* apresenta a capacidade de se tornar resistente aos acaricidas. A resistência pode ser proveniente de fatores genéticos previamente estabelecidos ou até mesmo por pressão de seleção, a qual pode ser exercida por tratamentos realizados com produtos em dosagens acima ou abaixo do recomendado pelo fabricante, sendo estes os principais fatores que contribuem para a seleção de cepas de carrapatos resistentes (FURLONG; PRATA, 2003). Uma vez resistentes estes ectoparasitas vão repassar aos seus descendentes toda carga genética relacionada à capacidade de resistência aos acaricidas que foram empregados na tentativa de controle.

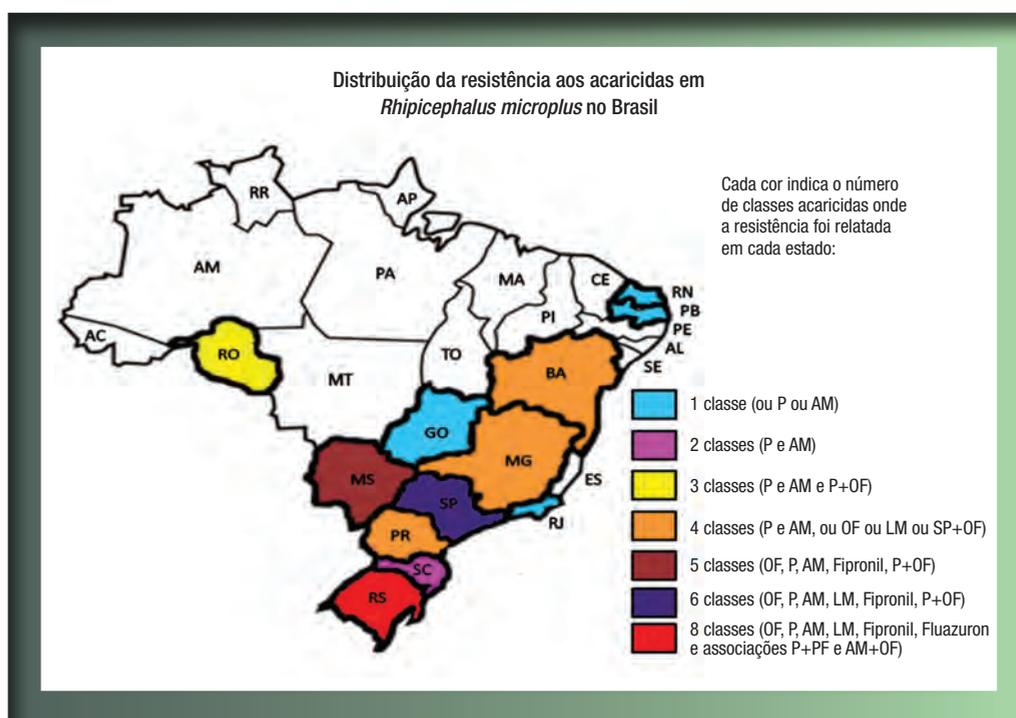


**FIGURA 10.2.** Ovino deslanado, da raça Santa Inês, naturalmente infestado por *Rhipicephalus microplus*.

Foto: Jaqueline Matias.

Diante dessa realidade, Higa et al. (2015) relataram que a propagação de populações de carrapatos resistentes às bases químicas disponibilizadas comercialmente para o emprego do controle do *R. microplus* no Brasil, já se encontra presente em diversos estados (Figura 10.3). Ainda com relação ao mapa da figura 10.3, foi adicionado o relato de resistência à ivermectina no estado de São Paulo (CRUZ et al., 2015), cujo os autores relataram também a presença de resistência nos estados de Minas Gerais e Paraná. Também já está comprovada a triste realidade de que alguns estados apresentam populações de carrapatos multirresistentes (RECK et al., 2014).

Tal fato, realmente preocupante, faz com que exista uma maior necessidade por parte dos produtores e órgãos competentes de se criar uma política nacional de monitoramento da resistência do carrapato bovino frente aos acaricidas disponíveis no país, tornando assim uma realidade a prática do controle verdadeiramente efetivo deste carrapato. Com esse intuito é que a Embrapa Gado de Corte disponibiliza para toda a



**FIGURA 10.3.** Mapa do Brasil no qual são indicadas as localidades aonde existem problemas com resistência do carrapato-do-boi aos acaricidas. Siglas: AM: amitraz; P: Piretroide; OF: Organofosforado; LM: Lactona Macroicíclica. Modificado de Higa et al. (2015).

sociedade um serviço de monitoramento da resistência nas populações de carrapatos nas propriedades, não só do estado de Mato Grosso do Sul, mas também para interessados de qualquer outra procedência dentro do País.

De forma prática, rápida e gratuita, são realizados testes (biocarrapaticidogramas, toxicológicos, ou bioensaios) que visam diagnosticar a resistência dos carrapatos às diversas bases acaricidas existentes. Os resultados obtidos por estes testes permitem ao produtor maior segurança sobre qual acaricida deve ser adquirido para alcançar um controle com maior eficiência do carrapato-do-boi.

Neste documento são relatadas algumas técnicas já padronizadas e reconhecidas pela FAO (DRUMMOND et al., 1973), comumente utilizadas (protocolos) para o emprego do reconhecimento da resistência do carrapato frente aos acaricidas.

No site da Embrapa Gado de Corte (<https://www.embrapa.br/gado-de-corte>) encontram-se disponíveis as informações necessárias para a coleta e envio de carrapatos, bem como o questionário a ser preenchido com informações da área de coleta e sobre os animais nos quais os carrapatos foram colhidos. Além disso, no mesmo acesso acima mencionado, é possível visitar o Museu Virtual do Carrapato, com imagens e informações sobre as espécies presentes em Mato Grosso do Sul e, também, em outros estados brasileiros.

### **CICLO DE VIDA DO CARRAPATO-DO-BOI**

Como já foi anteriormente mencionado, este carrapato apresenta ciclo de vida monoxeno, ou seja, precisa somente de um hospedeiro para cumprir seu ciclo de vida parasitária (Figura 10.4). É importante conhecer o ciclo de vida do carrapato *R. microplus* para podermos entender as estratégias de controle. O primeiro passo nesse processo de tomada de decisão para o controle deve levar em conta a sazonalidade de ocorrência e outros detalhes sobre a biologia da espécie em questão, e se existem ou não relatos na região sobre populações de carrapatos resistentes aos acaricidas de contato.

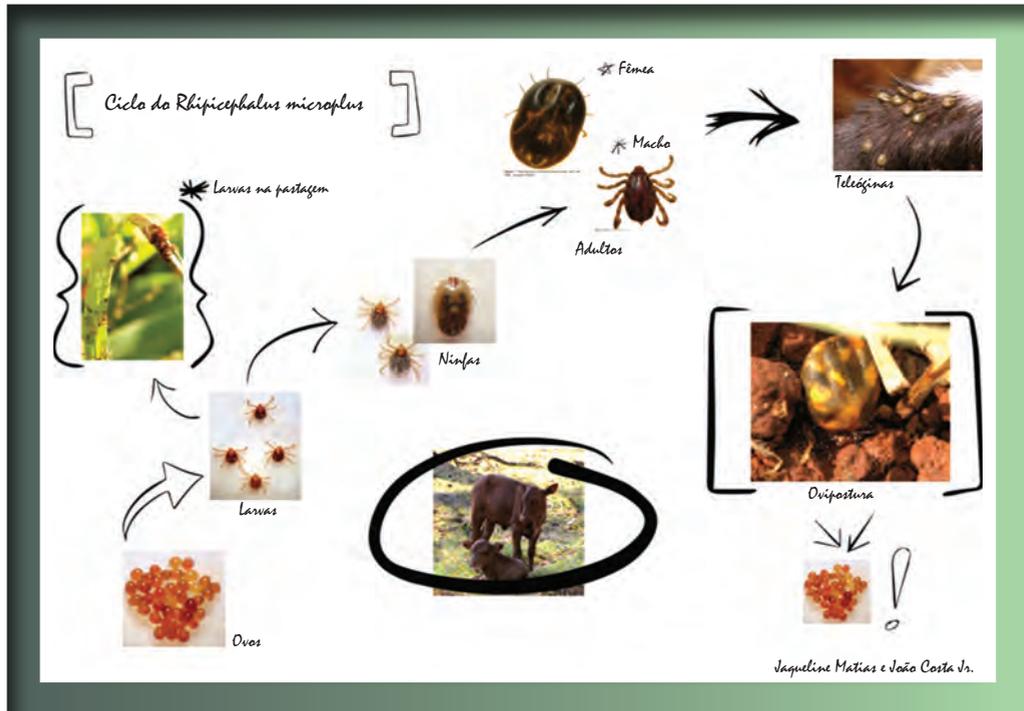
Os adultos, machos e fêmeas, acasalam sobre o bovino, e as fêmeas (teleóginas) comecem então o processo de alimentação e ingurgitamento com sangue.

As teleóginas, ao ingerir sangue, armazenam alimento adequado e suficiente para a produção dos ovos. Uma vez repletas, tendo aumentado cerca de duzentas vezes o seu peso, se desprendem do animal. Isso ocorre, de preferência, nas primeiras horas da manhã.

A partir daí inicia-se a fase de vida livre do carrapato que é chamada de “fase não parasitária”, uma vez que a mesma se desenvolve fora do bovino. No chão, a teleógina procura um lugar úmido e abrigado do sol. Ali ela começa a fazer a digestão dos componentes do sangue ingerido, no intuito de obter matéria-prima (energia) para a formação dos ovos.

Cada fêmea, em condições normais, transforma 52% do seu peso em ovos, o que equivale a aproximadamente 3.000 ovos. Esses ovos, por sua vez, se desenvolvem e originam larvas, popularmente conhecidas como “micuins”.

As larvas, logo após a eclosão, ficam no chão, próximas às cascas dos ovos, por um período de dois a três dias, aguardando o endurecimento da sua cutícula ou carapaça. Depois, mantendo-se agrupadas, sobem no primeiro talo de planta que encontram, permanecendo juntas e formando “bolinhos”, à espera da passagem de seus hospedeiros.



**FIGURA 10.4.** Ciclo de vida do carrapato-do-boi, *Rhipicephalus microplus*.

Atraídas pelo gás carbônico da respiração dos animais ou pelo deslocamento do ar, percebem a aproximação de hospedeiros, preferencialmente bovinos, nos quais tratam de subir e fixar-se. Começa aí, então, a chamada “fase parasitária” do ciclo de vida do carrapato.

Uma vez no hospedeiro as larvas procuram se aderir ao mesmo pela introdução de seu aparelho fixador. Ao se alimentarem passam a crescer, e em um período aproximado de 5 a 7 dias realizam a muda de larva para ninfa, a qual, após 10 a 15 dias, vai passar à fase adulta sexuada.

A partir do 18º dia as primeiras fêmeas, fecundadas e ingurgitadas, começam a desprender-se do hospedeiro. A maioria delas tende a cair durante o 22º dia de parasitismo, podendo esse período estender-se até o 25º dia.

### **0 TRATAMENTO CARRAPATICIDA**

O tratamento carrapaticida necessita de procedimentos básicos na sua ação técnica, tais como:

- Usar somente produtos que realmente são carrapaticidas e aprovados pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA);

- Sempre utilizar a dose recomendada pelo fabricante;
- Toda extensão corporal do bovino deve ficar molhada com a calda (solução que contém o carrapaticida);
- Usar sempre equipamentos de proteção individual (EPIs) quando for pulverizar os animais, para evitar intoxicação.

Mesmo assim, não é possível confiar no sucesso do tratamento com determinado acaricida caso não se conheça o grau de resistência dos carrapatos, para ter certeza da eficácia do produto que se for usar.

## **O CONTROLE ESTRATÉGICO**

Além do uso de produtos químicos, neste caso carrapaticidas adequados ao controle de carrapatos, é fundamental a sua aplicação de forma estratégica para obter êxito no controle. Para estabelecer o controle estratégico do carrapato-do-boi é importante considerar os pontos a seguir:

- Recomenda-se uma série de cinco ou seis tratamentos com intervalos de 21 dias, no final do período seco do ano;
- Escolher o carrapaticida mais eficiente para combater os carrapatos da propriedade (teste carrapaticida);
- Um tratamento é bem feito, quando o produto é utilizado na dose recomendada, bem misturado, e molhando todo o corpo do animal.

Considerar a avaliação dos carrapaticidas disponíveis no comércio frente a uma determinada população de carrapatos é importante, e saber como realizar os testes é o que será mostrado a seguir.

## **PROTOSCOLOS EXPERIMENTAIS PARA TESTES DE SENSIBILIDADE DOS CARRAPATOS AOS CARRAPATICIDAS**

A escolha de um carrapaticida que realmente combata os carrapatos nos bovinos é a principal preocupação dos produtores. Esta escolha deve ser feita por meio de testes específicos, uma vez que, embora os carrapatos sejam da mesma espécie, cada propriedade possui uma população diferente de carrapatos, selecionada de acordo com os produtos químicos com os quais já teve contato.

### **Procedimentos necessários para coleta e envio dos carrapatos**

- Separar do rebanho no mínimo um animal e deixa-lo sem tratar com carrapaticida por aproximadamente 25 dias, caso o produto usado nos bovinos no último tratamento tenha sido de contato (banho ou aspersão). Caso o carrapaticida em uso for sistêmico, do tipo “*pour on*” ou injetável, os animais devem ficar sem novo tratamento por 35 dias, e em casos como o fluazuron, esperar acima de 40 dias, conforme indicação dos fabricantes. Este cuidado é necessário para que os carrapatos que forem colhidos para o teste não contenham resíduo de carrapaticidas;
- Coletar uma quantidade razoável de fêmeas de carrapato (200 ou mais), bem grandes (repletas de sangue/ingurgitadas), conhecidas popularmente como “mamonas” ou “jabuticabas”. A melhor hora para coleta é no período da manhã, ocasião na qual

- os animais possuem a maior infestação por este tipo de carrapato, e há menor estresse (quando há maior umidade e a temperatura está mais amena);
- Acondicionar os carrapatos em potes de plástico ou caixinhas de papelão com tampa, fazendo orifícios pequeninos que permitam a entrada de ar. Tomar cuidado com o tamanho dos orifícios para evitar a fuga dos carrapatos;
  - Identificar o material, informando nome do proprietário, propriedade, município da propriedade, endereço e telefone para envio dos resultados e, se possível, endereço eletrônico;
  - É muito importante que os carrapatos coletados sejam enviados no mesmo dia da coleta, de preferência no início da semana (segunda à quarta). Quando isso não for possível, pode ser feito no dia seguinte, mantendo os carrapatos, até serem enviados, devidamente acondicionados na parte inferior da geladeira. Se as teleóginas chegarem com início da postura é possível realizar apenas o teste com as larvas posteriormente, e não mais com as próprias teleóginas (para avaliar efeito sobre a postura);
  - O resultado parcial do melhor carrapaticida a utilizar pode ser conhecido depois de decorridos 10 dias após o teste. O resultado final será entregue entre 35 a 40 dias e estes resultados são válidos apenas para as amostras de carrapato da propriedade onde foi realizada a coleta;
  - O ideal é que o teste seja realizado anualmente, de preferência antes da época da implantação de um controle estratégico, para se conhecer o melhor produto a ser utilizado;
  - Os três procedimentos básicos para manter os carrapatos sob controle, reduzindo os prejuízos causados por estes parasitas são: o conhecimento prévio do carrapaticida mais adequado para uma determinada população de carrapatos, a melhor época para se combater o carrapato, e como preparar e aplicar o carrapaticida de forma correta.

### Recebimento e preparo das amostras (laboratório)

Ao chegarem ao laboratório, os carrapatos são banhados com água corrente para retirar resíduos e/ou sujeiras. Em seguida, as teleóginas são secas sobre bandejas cobertas de papel absorvente. Ali se inicia a escolha dos indivíduos maiores, em melhor estado de integridade física, que demonstram maior capacidade de mobilidade e coloração característica, ou seja, os carrapatos mais saudáveis.

Para cada princípio ativo a ser testado, utiliza-se um grupo de contendo 10 teleóginas, acondicionadas em placas de Petri. Sempre os testes são acompanhados de um grupo controle (com dez teleóginas), que servirá como referência quando comparado aos grupos tratados, ou seja, se o produto testado é eficaz ou não. Todos os grupos são pesados em balança analítica para efeito de homogeneidade no peso entre os tratamentos. Isso constitui fato importante, pois o peso das fêmeas está diretamente relacionado à produção de ovos e, conseqüentemente, ao número potencial de larvas (que irá depender, também, do índice de eclodibilidade).

### Produtos (bases químicas) utilizados

As bases químicas a serem utilizadas nos testes aqui apresentados referem-se a produtos que agem por contato, e incluem piretróides, organofosforados, amidínicos e as-

sociações entre piretroides e organofosforados. Todos os produtos que contêm as bases citadas encontram-se disponíveis no mercado com diferentes nomes comerciais.

### **Escolha do teste a ser realizado com as amostras**

Normalmente, costuma-se adotar no laboratório dois principais testes de sensibilidade dos carrapatos aos carrapaticidas. Estes testes são conhecidos como Teste de Imersão de Adultos (TIA) e Teste de Pacote de Larvas (TPL). No entanto, existem outros testes que podem ser realizados, os quais serão abordados mais adiante.

### **TESTE DE IMERSÃO DE ADULTOS (TIA)**

Para uso neste teste, para cada produto a ser testado, são preparadas 200 mL de solução em frascos (Figura 10.5) contendo o acaricida, na diluição recomendada pelo fabricante. Cada grupo de teleóginas é submerso nas respectivas diluições por cinco minutos.

Posteriormente, as teleóginas são retiradas da solução e o excesso de líquido é retirado com o auxílio de papel filtro. Em seguida as mesmas são acondicionadas em placas de Petri, fixadas dorsalmente em fita dupla face e mantidas por 14 dias à estufa (tipo BOD) em temperatura de 28°C e com umidade relativa de 80% (UR) (DRUMMOND et al., 1973).

Encerrada a oviposição, as massas de ovos são transferidas para seringas vedadas com algodão (“cotton plug”), e mantidas em BOD, nas mesmas condições acima descritas, por mais 10 dias. Os parâmetros reprodutivos (peso das fêmeas ingurgitadas, peso da massa de ovos e a taxa de eclodibilidade são analisados segundo a “Eficiência Acaricida” (EA) descrita por Drummond et al. (1973). O produto acaricida é considerado eficiente quando  $EA \geq 95\%$ .



**FIGURA 10.5.** Teste Biocarrapaticidograma – Teste de Imersão de Adultos (TIA).  
*Foto: Leandro de Oliveira Souza Higa.*

ER – Eficiência Reprodutiva;  
 PMO – Peso da massa de ovos;  
 PFI – Peso da fêmea ingurgitada;  
 Eclo – Eclodibilidade.

$$ER = (PMO/PFI) \times \%Eclo \times 20.000^*$$

\*Um grama de ovos de *R. microplus* corresponde a 20.000 larvas.

### TESTE DE PACOTE DE LARVAS (TPL)

O teste TPL é executado de acordo com o protocolo proposto pela FAO (2004), conforme descrito por Stone; Haydock (1962). Papéis filtro recortados em formato de quadrado são impregnados com 700 µL da respectiva diluição comercial de cada produto a ser testado (Figura 10.6).

Após a impregnação, os papéis são secos em temperatura ambiente por 24 horas. Decorrido esse período, aproximadamente 100 larvas de *R. microplus* são liberadas, com o auxílio de um pincel, nos pacotes montados com o papel impregnado pelas diluições a serem testadas e, então, fechados com presilhas (Figura 10.7) e acondicionados em estufa tipo BOD. Após 24 horas determina-se o percentual de mortalidade com base na relação entre larvas vivas e mortas, cujo resultado compõe um dos itens considerados no cálculo da eficácia do respectivo produto, que é obtida a partir da seguinte fórmula:

$$\text{Mortalidade corrigida (\%)} = \frac{(\% \text{ mortalidade tratamento} - \% \text{ mortalidade controle})}{100 - \% \text{ mortalidade controle}} \times 100$$

**FIGURA 10.6.** Impregnação dos papéis, com os diferentes acaricidas para o Teste de Pacote de Larvas (TPL).  
 Foto: Vinícius da Silva Rodrigues.





**FIGURA 10.7.** Pacote impregnado com acaricida contendo as larvas aprisionadas em seu interior.

Foto: Marcos Valério Garcia.

### TESTE DE IMERSÃO DE LARVAS (TIL)

Outro teste que pode ser utilizado para monitorar a eficácia dos carrapaticidas em larvas é o Teste de Imersão de Larvas, desenvolvido por Shaw (1966). Segundo Sabatini et al. (2001), as soluções dos produtos a serem testados são preparadas de acordo com as recomendações do fabricante e, com o auxílio de um pincel, aproximadamente 100 larvas são imersas nessas soluções por um período de 10 minutos. Em seguida são retiradas, secas em papel filtro e depositadas em um pacote semelhante ao apresentado pelo protocolo do teste TPL. Após 24 horas os pacotes são abertos e realiza-se a contagem de larvas vivas e mortas.

### TESTE DE PACOTE DE NINFAS

Esse teste foi realizado com ninfas do carrapato *Amblyomma sculptum*. Esta espécie de carrapato acomete equídeos e animais silvestres, mas pode também vir a se tornar um problema na pecuária. Esta preocupação procede em função de relatos do que vem ocorrendo em outros países, que mencionam infestações mistas entre *R. microplus* e carrapatos do gênero *Amblyomma*. Considerando-se que carrapatos do gênero *Amblyomma* e o carrapato-do-boi apresentam ciclos de vida distintos, caso isso também aconteça no Brasil, o combate a estes parasitas se tornaria mais difícil e oneroso do que é neste momento. Inclusive, não há como prever os efeitos e possíveis necessidades de ajustes no controle estratégico atualmente preconizado.

Diante disso, existe uma real preocupação em também monitorar a resistência desses ectoparasitas frente a determinados acaricidas. Para tanto, fez-se a adaptação da metodologia do Teste de Pacote de Larvas (TPL), mudando somente o número de carrapatos (ninfas) a serem desafiados aos acaricidas.

## OUTROS MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO DE RESISTÊNCIA

Além do método de detecção fenotípico (TIA e TPL), a resistência dos carrapatos aos acaricidas pode ser diagnosticada também por métodos bioquímicos e moleculares. Em relação às demais bases químicas, os organofosforados e piretroides possuem uma maior resolução quanto ao entendimento do funcionamento de seus mecanismos de ação (ABBAS et al., 2014; GUERRERO et al., 2012).

O mecanismo de ação da classe dos organofosforados está correlacionado ao aumento na atividade da acetilcolinesterase (AChE), pois Baxter; Barker (1998) observaram um aumento na atividade desta enzima em carrapatos resistentes ao acaricida. Pruet; Pound (2006) aperfeiçoaram o método de extração da AChE, sendo a enzima obtida do singânglio de machos e fêmeas por meio de sonicação. Essa metodologia permite a reprodução dos procedimentos por outros pesquisadores para o diagnóstico da resistência aos fosforados e constitui também uma técnica mais refinada com resultados mais seguros.

A técnica consiste em três passos: Extração do Singânglio; Protocolo Padrão de Acetilcolina; Inibição da Atividade Esterásica.

### Extração do singânglio

- Retirar o singânglio de carrapatos adultos (machos e fêmeas) por meio de dissecação;
- Alocar o material em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL contendo 100 µl de tampão de extração (10 mM de fosfato de sódio, pH 6,5, 1 mM EDTA e 0,5% Triton X-100);
- Os singânglios são rompidos por maceração com auxílio de cadinho e pistilo;
- A amostra extraída descansa uma hora à temperatura de 4°C;
- Sobrenadante contendo a acetilcolina extraída é coletado e em seguida centrifugado (14.400 rpm × g durante 15 minutos);
- A sonicação do singânglio é realizada com o aparelho sonicador (aparelho que causa o rompimento das células ou a homogeneização de líquidos não compatíveis), utilizando uma sonda microtip 2 milímetros;
- O tempo de sonicação ótima é de 4 ciclos com pulsos de 3 segundos e um intervalo de 5 segundos entre os pulsos (PRUETT; POUND, 2006);
- Após o processo de sonicação, a amostra é centrifugada por uma hora a 4°C.

### Protocolo para dosar acetilcolina (AChE)

O protocolo para avaliação de atividade esterásica foi descrito por Ellman et al. (1961), sendo utilizado com modificações (substrato: acetilcolina iodada) no estudo de Pruet; Pound (2006):

- Utilizar o substrato acetilcolina iodada em microplacas. A solução do substrato (0,12 mM) deve ser preparada em tampão de fosfato de sódio 50 mM, pH 7,5, contendo 0,32 mM de reagente “Ellman’s”, ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico).

O ensaio padrão para a atividade da AChE é composto por 20 µl de extrato de AChE e de 180 µl de solução de substrato. A taxa de reação é monitorada a 30 °C durante uma hora, medindo a absorbância a 405 nm a intervalos de 10 minutos, seguido de 5 segundos em agitador. A atividade da AChE é apresentada na forma de declínio da taxa de reação criada pelo aumento da absorbância ao longo do tempo.

A análise da distribuição normal dos dados para *R. microplus* pode ser alcançada com análise de variância unilateral (ANOVA) e o teste comparativo pode ser feito por meio do teste Tukey.

### **Protocolo para dosar inibição de atividade de AChE em amostras de *R. microplus***

As formas de oxon do parathion, coumaphós, e diazinon (paraoxon, coroxon e diazoxon, respectivamente)  $2,5 \times 10^{-5}$  M foram usados em experimentos de inibição de organofosforados (OF).

Pode ser utilizado singânglio único de diferentes cepas para extrair AChE. O extrato do AChE é colocado em placas de microtitulação. Os inibidores respectivos dos OF são adicionados em concentrações conhecidas e em igual volume, e incubados por 10 minutos em temperatura ambiente. Na sequência, o período de incubação, 180  $\mu$ l de substrato padrão para AChE é adicionado nos poços e a reação é monitorada nas mesmas condições que é feita para dosar a atividade de AChE. Ao controle de AChE sem os inibidores, é adicionado 25  $\mu$ l de 50 mM de tampão fosfato de sódio, pH 7,5. O efeito de inibição é expresso em percentagem (%) de atividade de AChE no tempo de 30 minutos para leitura [ $(\Delta$  absorbância da reação de inibição/ $\Delta$  absorbância da reação de não inibição) x 100].

---

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ABBAS, R. Z.; ZAMAN, M. A.; COLWELL, D. D.; GILLEARD, J.; IQBAL, Z. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. **Veterinary Parasitology**, v. 203, n. 1-2, p. 6-20, 2014.
- BAXTER, G. D.; BARKER, S. C. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick *Boophilus microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v. 28, n. 8, p. 581-589, 1998.
- CRUZ, B. C.; LOPES, W. D. Z.; MACIEL, W. G.; FELIPELLI, G.; FÁVERO, F. C.; TEIXEIRA, W. F. P.; CARVALHO, R. S.; RUIVO, M. A.; COLLI, M. H. A.; SAKAMOTO, C. A. M.; COSTA, A. J.; OLIVEIRA, G. P. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin (200, 500 and 630  $\mu$ g/kg) in field studies in Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 207, n. 3-4, p. 309-317, 2015.
- DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.
- FAO. **Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants – Guidelines, Module 1 – Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention**. Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, Rome, p. 25–77, 2004.
- FURLONG, J.; PRATA, J. R. S. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Embrapa Gado de Leite, 2000, 2p. (Sustentabilidade da Atividade Leiteira, 34).
- GARCIA, M. V.; ANDREOTTI, R.; REIS, F. A.; AGUIRRE, A. A. R.; BARROS, J. C.; MATIAS, J.; KOLLER, W. W. Contributions of the hair sheep breed Santa Ines as a maintenance host for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 515, 2014.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. S.; BARROS, A. T. M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; DE LEÓN, A. A. P.; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.
- GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2012.

- GUGLIELMONE, A. A.; SZABÓ, M. P. J.; MARTINS, J. R. S.; ESTRADA-PEÑA, A. **Diversidade e importância de carrapatos na sanidade animal**. In: BARROS-BATTESTI, D. M. B.; ARZUA, M.; BECHARA, G. H. (Eds.). Carrapatos de importância médico veterinária da região neotropical: Um guia ilustrado para identificação de espécies. Vox/ICTTD-3/Butantan, São Paulo/BR, p. 115-138, 2006.
- HIGA, L. O. S.; GARCIA, M. V.; BARROS, J. C.; KOLLER, W. W.; ANDREOTTI, R. Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. **Medicinal chemistry**, v. 5, n. 7, p. 326-333, 2015.
- LABRUNA, M. B., R. S.; JORGE, D. A.; SANA, A. T.; JACOMO, C. K.; KASHIVAKURA, M. M.; FURTADO, C.; FERRO, S. A.; PEREZ, L.; SILVEIRA, T. S.; SANTOS JR, T. S.; MARQUES, S. R.; MORATO, R. G.; NAVA, A.; ADANIA, C. H.; TEIXEIRA, R. H.; GOMES, A. A.; CONFORTI, V. A.; AZEVEDO, F. C.; PRADA, C. S.; SILVA, J. C.; BATISTA, A. F.; MARVULO, M. F.; MORATO, R. L.; ALHO, C. J.; PINTER, A.; FERREIRA, P. M.; FERREIRA, F.; BARROS-BATTESTI, D. M. Ticks (Acari: Ixodidae) on wild carnivores in Brazil. **Experimental Applied Acarology**, 36, n. 1-2, p. 149-163, 2005.
- PRUETT, J. H.; POUND, J. M. Biochemical diagnosis of organophosphate-insensitivity with neural acetyl cholinesterase extracted by sonication from the adult tick synganglion. **Veterinary Parasitology**, v. 135, n. 3-4, p. 355-363, 2006.
- RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'ANGOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, p. 128-36, 2014.
- ROCHA, U.F. **Biologia e controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini)**. Jaboticabal: UNESP, 1984. 35p. (Boletim Técnico UNESP, 3).
- SABATINI, G. A.; KEMP, D. H.; HUGHES, S.; NARI, A.; HANSEN, J. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 53-62, 2001.
- SHAW, R. D. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum. **Bulletin of Entomological Research**, v. 56, n. 3, p. 398-405, 1966.
- STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can). **Bulletin of Entomological Research**, v. 53, n. 3, p. 563-578, 1962.



CAPÍTULO

11



## Procedimentos para o controle do carrapato-do-boi em dez passos

*Renato Andreotti  
Wilson Werner Koller  
Marcos Valério Garcia*





## INTRODUÇÃO

O livro *Carrapatos: Protocolos e Técnicas para Estudo* não poderia ser dado por “finalizado” sem falar, no seu último capítulo, sobre orientações para o controle do carrapato-do-boi (*Rhipicephalus microplus*). Isso é fundamental, haja vista a crescente importância de se produzir leite e carne em condições adequadas de consumo – com qualidade e segurança alimentar –, protegendo, além disso, o meio ambiente.

**Observação:** As informações abaixo podem ser encontradas no site “Controle do carrapato”, em <http://cloud.cnpqc.embrapa.br/controle-do-carrapato-ms/>

O carrapato-dos-bovinos, conforme apresentado nos capítulos anteriores, causa grandes prejuízos econômicos à cadeia produtiva de bovinos no Brasil. O que geralmente acontece na prática, na luta para evitar os danos causados por este ectoparasita, é o controle baseado no uso de carrapaticidas quando o gado se apresenta altamente infestado por carrapatos já na metade final da fase parasitária. Neste momento, a maior parte dos danos se torna irreversível, contudo, deve-se considerar o efeito desse tratamento quanto ao impacto positivo que causa reduzindo infestações posteriores.

Aqui queremos mostrar que a ação baseada no conhecimento da biologia do parasita resultará em melhor controle, menor custo, retardamento no avanço da seleção para resistência e menor impacto no ambiente pela redução da quantidade de acaricidas utilizada no controle desta praga. As formas mais adequadas com relação às estratégias atualmente indicadas pela pesquisa para o seu controle são apresentadas no presente capítulo.

Este carrapato, por se alimentar de sangue, necessita obrigatoriamente passar uma fase de sua vida no hospedeiro, preferencialmente sobre os bovinos. As fêmeas são as principais consumidoras de sangue durante a fase de vida parasitária, e representam a maior parte do problema, causando espoliação nos animais por ingerir uma grande quantidade de sangue (0,5 a 3,0 mL durante a sua vida). Esse valor, multiplicado pelo número de parasitas sobre cada animal, permite estimar o total de sangue que o animal perde durante cada infestação.

Os carrapatos inoculam substâncias nos animais, pela saliva, imunomodulando o hospedeiro e podendo transmitir, entre outros, os agentes da Tristeza Parasitária Bovina – TPB (*Babesia bovis*, *B. bigemina* e *Anaplasma marginale*).

Os orifícios no couro causados pelos carrapatos, além de desvalorizar o produto, também podem favorecer a penetração de larvas de moscas causadoras das bicheiras (miíases). Além disso, durante hematofagia, caso estiver portando agentes patogênicos, o carrapato pode transmitir estes patógenos. A soma dos prejuízos anuais que pode causar à pecuária brasileira, incluindo tanto os danos diretos quanto os custos para o seu controle, tem sido estimada em mais de três bilhões de dólares (GRISI et al., 2014).

Nos Estados da Região Sul, e demais regiões do País com grandes altitudes (clima temperado), podem ocorrer até três gerações anuais do carrapato. Este fato promove a instabilidade enzoótica para a TPB naquelas regiões. Nos demais estados do país podem ocorrer quatro gerações, de modo que o carrapato ocorre em qualquer época do ano.

Por todos esses fatores o carrapato tem sido incriminado, economicamente, como o mais importante parasita de bovinos do país, particularmente em raças taurinas ou seus cruzamentos.

Como principal ferramenta de controle permanece o uso de produtos carrapaticidas aplicados sobre os animais, os quais, em geral, não são empregados da forma recomendada.

Esse procedimento tem, então, levado a um conjunto de consequências, como, por exemplo, a contaminação do ambiente, das pessoas que aplicam o carrapaticida e dos produtos de origem animal. A mencionada prática também acarreta um controle com baixa eficácia e facilita a seleção de carrapatos resistentes às bases químicas utilizadas no manejo, com crescente aumento dos prejuízos econômicos assim resultantes.

Para um controle mais eficiente devemos considerar alguns aspectos, entre os quais, conhecer o ciclo de vida do carrapato e suas relações com as variações do meio ambiente, principalmente com respeito à temperatura e umidade; a dinâmica populacional, especialmente a sazonalidade, para identificar quando a população de carrapato está na fase mais vulnerável ao controle. Considerar o grau de sangue europeu dos animais, associado com o tipo e o manejo da pastagem, bem como, a lotação estabelecida.

A ideia neste capítulo, no sentido de organizar as ações de controle, foi pensar em passos a serem dados segundo uma ordem cronológica, para programar o controle estratégico do carrapato. Estes passos serão detalhados a seguir:

### ***1. Escolher o produto adequado ao combate da população de carrapatos de cada propriedade***



#### **Use o produto adequado**

Cada produtor deve conhecer o produto ideal para o controle do carrapato na sua propriedade. O teste pode ser realizado na Embrapa Gado de Corte.

Para determinar o produto carrapaticida mais adequado ou eficiente a ser utilizado em determinada propriedade deve-se realizar um teste, denominado de bioensaio. Estes testes servem para comparar a eficácia entre os produtos carrapaticidas pertencentes às diferentes famílias ou grupos químicos, sendo que, no caso de produtos destinados ao controle de carrapatos, para estes testes devem ser empregados aqueles que agem por “contato”.

Tal recomendação se baseia no fato de que produtos “sistêmicos” somente entram em contato com os carrapatos por meio da ingestão de sangue, sem que se tenha controle sobre a concentração necessária para matar os carrapatos. Os bioensaios utilizando produtos que agem por via sistêmica (injetável, *pour on* ou ministrados por via oral) são realizados em geral somente na pesquisa.

Assim, pelo uso de testes de bioensaio ou carrapaticidogramas, podem ser esclarecidas quaisquer dúvidas sobre a eficiência de determinado carrapaticida, bem como, ser determinado o produto mais eficiente para a população de carrapatos a tratar, evitando-se, com isso, a troca constante e indiscriminada de produtos.

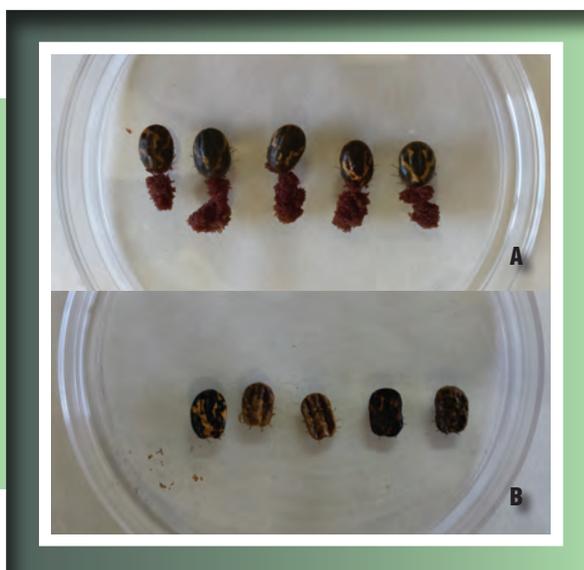
Na elaboração do teste, preparam-se soluções para banho (um litro é o suficiente), conforme a dose recomendada pelo fabricante, para cada produto a ser testado, utilizando-se para isso seringas plásticas de cinco ou 10 mL, copos plásticos descartáveis, ou vidros limpos, rotulados com os nomes dos produtos testados.

Outro frasco descartável deve ser utilizado com água, como grupo controle ou comparativo. É muito importante a leitura atenta da bula de cada produto para que seja seguida a recomendação de dose preconizada pelo fabricante, e a utilização de seringa plástica graduada para medir o pequeno volume do carrapaticida a ser utilizado. Cada produto deve ter o seu próprio kit: seringa, frasco para a solução carrapaticida, etc., perfeitamente identificados. Os kits não devem de modo nenhum entrar em contato ou serem usados para os demais.

Para cada produto a ser testado devem ser utilizados pelo menos dez carrapatos grandes (fêmeas ingurgitadas), que serão mergulhados em cada produto já diluído, além de outros dez carrapatos para mergulhar na água (que é o tratamento usado para comparação ou controle). O ideal é que seja colhido um número grande de carrapatos e, depois, selecionados para o teste aqueles que apresentarem maior desenvolvimento, formando grupos o mais homogêneos possível.

Cada grupo de dez carrapatos deve ser colocado no recipiente com a solução para pulverização, após homogeneização, de forma que os carrapatos fiquem perfeitamente submersos. O grupo controle é colocado no recipiente com água. Depois de cinco minutos, os carrapatos são retirados destes recipientes e secos com um pedaço de papel higiênico com o cuidado de não causar danos aos carrapatos. Em seguida cada grupo é colocado em outro recipiente limpo, com identificação do respectivo tratamento.

**FIGURA 11.1. (A)** Fêmea ovipondo em condições normais. **(B)** Fêmea que recebeu tratamento carrapaticida sem oviposição.



Os recipientes devem, então, ser colocados num lugar abrigado do sol. Em regiões e épocas com umidade do ar muito baixa, pode ser colocado um chumaço de algodão embebido em água no recipiente de modo a manter úmido o ambiente.

Em sete a dez dias pode-se avaliar o resultado parcial, ou seja, efeito adulticida (número de adultos mortos). O teste somente será válido caso os carrapatos do grupo controle tiverem realizado postura, indicando que o ambiente do teste está em boas condições para os carrapatos. A temperatura do ambiente e a umidade têm influência sobre o tempo de postura e as demais fases de vida dos carrapatos. Em condições de baixa temperatura pode, por exemplo, levar mais tempo para iniciar a postura e também para que se complete o desenvolvimento embrionário, ou seja, a incubação (período entre a postura até o início de eclosão das larvas).

A maioria dos carrapatos do grupo controle realizará a postura de grande quantidade de ovos, marrons, brilhantes e aderidos uns aos outros, formando uma massa de ovos. Em relação aos carrapatos submetidos aos carrapaticidas, podem ocorrer duas situações:

- Na primeira, o produto, sendo eficiente, ou seja, não existindo resistência, a maioria dos carrapatos morre antes de começar a postura ou realiza a postura de poucos ovos, porém de cor escura, secos e separados uns dos outros. Desses ovos não nascerão larvas e, desta forma, o produto é considerado eficiente. Se o produto escolhido no teste for aplicado no rebanho e não acontecer o controle, isso indica, necessariamente, que o problema pode estar no preparo e/ou na maneira que a solução carrapaticida foi aplicada.
- Na segunda situação, quando o produto for ineficiente, ou seja, existindo resistência dos carrapatos, a maioria dos carrapatos não morrerá. Isso indica a presença de resistência dos carrapatos àquele determinado carrapaticida. Quanto maior a quantidade de ovos e quanto mais o aspecto destes se aproximar daquele dos ovos do grupo controle, maior é o nível de resistência a este produto na população de carrapatos testada.

A escolha final do carrapaticida é baseada no produto que apresente melhor eficácia nos resultados do teste. Melhor do que isso é fazer o teste laboratorial, onde é possível conhecer qual a porcentagem de eficiência de cada produto comercial testado. Os procedimentos de como enviar os carrapatos para o teste e do protocolo a ser realizado em laboratório estão descritos no capítulo 10.

## 2. Aplicar na época adequada



### Qual a melhor época para controlar o carrapato?

No final do período da seca, quando os carrapatos estão em menor número nas pastagens. Utilizando de 5 a 6 banhos com intervalo de 21 dias.

Sobre o animal, geralmente, existem populações em diferentes estádios de desenvolvimento, sendo que sempre haverá indivíduos se despreendendo entre os intervalos de tratamentos, assegurando, desse modo, as reinfestações. Por isso, é importante sempre realizar o tratamento contra carrapatos quando estes ainda não estiverem totalmente ingurgitados, com objetivo de evitar que os carrapatos caiam no solo em condições de realizar a postura e possam, assim, garantir a manutenção da população no ambiente.

O controle do carrapato-do-boi deve ser realizado de maneira técnica, e sempre considerando os requisitos necessários para a obtenção de sucesso. É importante realizar a aplicação do produto de forma adequada à população de carrapatos do rebanho, ou seja, no momento apropriado; da maneira correta e no menor número de vezes possível.

Recomenda-se iniciar o controle no final da época desfavorável ao carrapato no campo, quando existem baixas populações de larvas, e a isso é o que se chama de “controle estratégico”. É importante lembrar que todas as larvas precisam subir no bovino para se desenvolver. Num período de baixas populações de larvas nas pastagens, poderemos realizar aplicações de carrapaticidas nos animais para combater as formas que estão chegando e aquelas em desenvolvimento no hospedeiro. Devemos observar intervalos de aplicação menores que o período necessário para o desenvolvimento final das fêmeas para a produção de ovos que irão reinfestar as pastagens, conforme citados mais adiante.

Assim sendo, por controle estratégico entende-se a adoção de banhos ou tratamentos com carrapaticidas em períodos desfavoráveis ao desenvolvimento do carrapato na pastagem. Como essas condições variam de região para região no país, então o controle estratégico deve ser regionalizado.

O sistema estratégico convencional é realizado com uma série de cinco ou seis banhos ou tratamentos com carrapaticida de contato com intervalos de 21 dias ou menos; ou três a quatro aplicações de carrapaticida “*pour on*” também de contato, no dorso do animal, em intervalos de no máximo 30 dias, conforme o período útil de ação de cada produto. Esse intervalo de 30 dias é, também, aconselhado na utilização de produtos injetáveis, ou “*pour on*”, de Lactonas Macrocíclicas (ex. avermectinas), com o cuidado de observar o período de carência dos produtos aplicados, principalmente em vacas em lactação, por causa dos resíduos no leite e carne destinados ao consumo.

O Brasil-Central se caracteriza por ter um clima com duas fases bem distintas. Uma época de chuvas, durante os meses de outubro a abril abrangendo a primavera e o verão, e a época de seca, que compreende os meses de abril a setembro, representando o outono e inverno.

Durante a época das águas, a temperatura e a umidade são favoráveis ao desenvolvimento das fases do carrapato na pastagem, e desde o momento da postura até a eclosão das larvas o processo é rápido, comparando-se com o que acontece na época da seca.

Na época da seca, após a eclosão, as larvas procuram se proteger ficando no lado inferior da folha ou descendo um pouco na planta, uma vez que o ambiente onde se encontram na pastagem é seco, afetando negativamente a sobrevivência das larvas.

O ambiente seco e com baixas temperaturas, como nas regiões com altitude elevada e no Sul do país, contribuem para uma alta mortalidade das larvas, logo após a eclosão. Estrategicamente, o final do período seco do ano é uma situação adequada para combater o carrapato.

É importante lembrar que é necessário ajustar a época de controle estratégico do carrapato em situações de microrregiões específicas.

No início do período das chuvas o ciclo biológico se acelera e é possível perceber um aumento significativo na população de carrapatos nos animais em comparação com aquela observada durante o período seco, justificando, assim, que seja iniciado o controle estratégico antes que a população de carrapato aumente.

O combate a essas populações enquanto ainda estiverem em baixos níveis, em resposta às condições menos favoráveis de desenvolvimento e sobrevivência de ovos e larvas do carrapato, impedirá o surgimento de altas infestações comuns no verão.

A principal regra é combater o carrapato em qualquer região quando a população de carrapato na pastagem está no final do seu período desfavorável. Assim, para o controle estratégico, cada produtor deve, com a ajuda de um veterinário, identificar quando isso acontece na sua região atuando, desta forma, estrategicamente.

### **3. Aplicar seguindo a recomendação do fabricante**



#### **Siga as instruções do produto**

Siga a bula do produto rigorosamente, principalmente quanto à homogeneização, dosagem, período de descarte do leite e permissão para uso em vacas lactantes.

A diluição incorreta e a aplicação inadequada do produto podem ser os responsáveis pela baixa eficiência do produto.

A concentração indicada nas recomendações do fabricante é a mínima necessária para obter um bom controle da população de carrapatos. A utilização de dose inferior às recomendadas, assim como de produto vencido ou armazenado em condições inadequadas, possibilita acelerar a resistência ao tratamento com o carrapaticida.

Os carrapaticidas “de contato”, como o próprio nome diz, necessitam ter contato com os carrapatos no mínimo nas quantidades recomendadas pelos fabricantes; serem muito bem misturados e aplicados com pressão suficiente para penetrar entre os pelos, além de molhar completamente o animal, que deve ser tratado individualmente.

### **4. Segurança do operador**



#### **Cuide-se**

No preparo e aplicação do produto utilize máscara, luvas, roupa adequada e banhe os animais a favor do vento para evitar intoxicação.

A aplicação da calda deve invariavelmente ser a favor do vento, para proteção do aplicador, o qual, desde o início do preparo da solução deverá estar protegido com macacão, botas, luvas e máscara, para evitar o contato com o produto químico.

Os carrapaticidas são venenos que atuam principalmente no sistema nervoso central, causando alergias, intoxicações, malformações de órgãos fetais e podem deflagrar o surgimento de processos tumorais.

Geralmente, as pessoas que têm contato com parasiticidas são as mesmas na propriedade, e como o fazem com frequência, tendem a diminuir o cuidado no manuseio com essas substâncias tóxicas.

É importante que as pessoas que trabalham com carrapaticidas sejam devidamente instruídas, tanto sobre os perigos dessa tarefa, quanto sobre os cuidados para proteger-se ao máximo. Além disso, devem ainda ter conhecimento suficiente sobre os sintomas mais comuns que sinalizam uma possibilidade de intoxicação e a necessidade de procurar imediatamente a assistência médica.

### 5. A forma correta de aplicação de carrapaticidas



#### Aplicação correta

O banho deve ser dado com o animal contido, no sentido contrário ao dos pelos, com pressão adequada e em toda a superfície do corpo, incluindo cara, orelhas e entre as pernas. Evite dias de chuva e horários de sol forte. Em caso de tratamento *pour-on* (na linha do dorso), avalie o peso de cada animal para aplicação da quantidade correta do produto, de acordo com as recomendações da bula.

Os produtos carrapaticidas, aplicados por imersão ou aspersão, atuam por contato, intoxicando os carrapatos molhados pelo produto diluído na água. Os carrapatos grandes são mais facilmente visualizados nos lugares em que os animais não conseguem lambe-los, como tábua do pescoço, orelhas, entre as pernas e axilas. Nas outras partes do corpo podem ser observados carrapatos pequenos recém-chegados, sendo que aqueles que sobreviverem à autolimpeza feita pelo próprio hospedeiro, se não tratados, se desenvolverão até carrapatos adultos.

Após o banho, o animal deve ter sido completamente molhado, pois os carrapatos pequenos, localizados debaixo dos pelos de partes do corpo onde não são vistos com facilidade, representam uma parcela importante da população que parasita os animais, e só morrerão se forem alcançados pela quantidade necessária de carrapaticida. Em média, para banhar adequadamente um animal adulto, são necessários quatro a cinco litros de solução carrapaticida.

A camada de pelos exerce uma proteção natural do couro e, além disso, a gordura do pelo prejudica a penetração da solução, fazendo com que esta escorra pela pelagem, sem atingir o couro onde os carrapatos se encontram. Em função disso, é muito importante que a pressão de aspersão seja tal que produza pequenas gotículas de solução com capacidade para penetrar entre os pelos e chegar até o couro. Gotas grandes, com maior peso e menor pressão, tendem a escorrer sobre os pelos sem penetrar até o couro.

Os carrapaticidas em determinadas condições podem intoxicar e matar os animais como, por exemplo, alguns produtos que não podem ser aplicados em bezerros até quatro meses de idade, e outros sobre animais em avançado estado de gestação ou em lactação.

Animais em final de gestação devem ser manejados separadamente dos demais, e de forma a não lhes causar apertos no curral e no brete, evitando-se possibilidades de aborto. Também, em função do estresse que os animais sofrem quando da aplicação destes produtos, eles devem ser banhados ou tratados preferencialmente cedo pela manhã ou no final da tarde – nunca nos períodos mais quentes do dia e ou imediatamente após esforço físico.

Em dias de chuva pode-se adiar para o dia seguinte, ou deixar os animais já tratados sob uma cobertura protegidos da chuva. O tempo necessário para a ação do produto por contato é de no mínimo de duas horas após o tratamento. Após esse período o produto já pode ser lavado pela água da chuva sem comprometer o tratamento realizado.

Todo carrapaticida de contato atua de forma imediata e, após o tratamento, as larvas do ambiente começam a subir novamente nos animais, devendo ser mortas no próximo tratamento estratégico antes da sua queda, de modo a não permitir que realizem nova postura.

Recorrendo-se ao sistema estratégico, que envolve ações integradas com outras práticas de manejo relacionadas aos animais e também à pastagem é que se pode alcançar a diminuição da população de carrapatos e dos prejuízos que causa.

O processo do banho por aspersão inicia-se pelo preparo da solução para pulverização com a quantidade de carrapaticida indicada pelo fabricante, a qual deve ser adicionada a uma pequena quantidade de água (calda). Somente depois de a calda estar misturada homogeneamente, adiciona-se o volume de água necessário para completar a quantidade total da solução a ser preparada. A solução final também deve ser muito bem misturada para se obter uma diluição homogênea.

A aplicação do carrapaticida deve ser feita com o animal contido, um animal por vez. O equipamento deve ser prático, o mais confortável que se dispôr, e capaz de possibilitar um banho com pressão forte o suficiente para pulverizar a solução carrapaticida na forma de uma nuvem de gotículas, para que cheguem até o couro do animal.

São diversos os equipamentos utilizados na aplicação de carrapaticida, tais como, o pulverizador costal; a bomba de pistão manual; os vários tipos de adaptação de bombas d'água elétricas e a câmara atomizadora. Como regra geral, a escolha do tipo de equipamento a ser utilizado depende do tamanho do rebanho. Independentemente do tipo de equipamento, o seu uso deve seguir as recomendações descritas, capazes de permitir uma pulverização correta.

A câmara atomizadora, com seu túnel repleto de bicos aspersores é a maneira mais prática de aplicação de carrapaticida pelo método de aspersão em rebanhos médios ou grandes.

Com relação ao banheiro de imersão, é importante que as instruções referentes às cargas e recargas dos carrapaticidas, prescritas pelos fabricantes, sejam rigorosamente obedecidas. Sempre deve ser feita uma pré-diluição do produto a ser utilizado, antes da colocação no banheiro. Esta pode ser feita em recipiente plástico exclusivo para esta finalidade. A análise periódica da concentração da calda do banheiro é uma importante recomendação a ser adotada.

## 6. Redução dos carrapatos livres na pastagem



### Reduza a população de carrapatos nas pastagens

Os animais recém tratados devem retornar às pastagens infestadas para que funcionem como “aspiradores” dos carrapatos que lá estão à espera do hospedeiro. Os carrapatos que subirem nos animais serão mortos quando entrarem em contato com o produto. Os que conseguirem sobreviver serão combatidos no próximo banho.

Na fase não parasitária a fêmea ingurgitada procura um lugar úmido e abrigado do sol. Ali ela aguarda completar a maturação dos ovos e, então, realiza a postura, colocando em torno de 3.000 ovos por fêmea. Estes ovos, após completarem o período embrionário originam larvas que infestam as pastagens.

As larvas, logo após a eclosão, ficam no chão por um período de dois a três dias, próximas às cascas de onde saíram, aguardando o endurecimento da cutícula ou carapaça. Depois, mantendo-se agrupadas, sobem no primeiro talo de planta que encontram, permanecendo juntas e formando bolinhos, à espera da passagem de seus hospedeiros. Atraídas pelo gás carbônico da respiração dos animais, ou pelo deslocamento do ar, percebem a aproximação de hospedeiros, preferencialmente bovinos, nos quais tratam de subir e fixar-se. Começa então a chamada “fase parasitária” do ciclo de vida do carrapato.

## 7. Atenção especial aos animais sempre mais infestados que os demais



### Dê mais atenção aos animais de “sangue doce”

Os bovinos mais infestados, conhecidos como animais de “sangue doce” são os responsáveis pela recontaminação da pastagem. Eles devem ser identificados e tratados com mais frequência.

Após a série de banhos ou tratamentos, os animais terão poucos carrapatos por muitos meses, e não necessitarão de novas aplicações. Em geral, após a aplicação dos banhos ou tratamentos estratégicos, poucos animais no rebanho sempre carregarão a maioria dos carrapatos (popularmente conhecidos como “animais de sangue doce”).

Apenas esses animais devem ser tratados, esporadicamente, caso se perceba neles populações médias acima de 25 fêmeas ingurgitadas em um dos lados do corpo dos animais.

O não tratamento dos animais restantes permitirá o desenvolvimento neles de poucos carrapatos, os quais, sem contato com o carrapaticida, terão maior chance de

retardar o aparecimento da resistência na população ao produto químico (tática do refúgio). No ano seguinte o sistema estratégico deve ser novamente estendido a todo rebanho.

### 8. Controle preventivo ao introduzir animais no rebanho



#### **Controle a introdução de animais**

Os animais recém adquiridos devem ser tratados no local de origem. Isolados por 30 dias antes de sua incorporação ao rebanho.

A introdução de animais portando carrapatos leva a um aumento de carrapatos na propriedade, tanto por si só, quanto pelo fato de poderem trazer carrapatos portadores de resistência a outras bases químicas de carrapaticidas. Podem, portanto, gerar um leque maior de resistência nas populações de carrapatos pela introdução de novos genes aliados à resistência, aumentando sensivelmente o problema de controle do carrapato.

### 9. Evitar infestações mistas



#### **Evite infestações mistas**

Equinos e bovinos devem ser mantidos em pastos separados, pois os bovinos também podem ser infestados pelos “carrapatos de cavalo” cujo controle é diferente.

Manter diferentes espécies animais compartilhando um mesmo espaço ou pastagem pode acarretar novos problemas, conforme já foi tratado no capítulo 10. Animais que, quando criados isoladamente, não apresentavam infestações por este parasita, como era o caso de ovinos deslanados, podem sofrer com o parasitismo quando criados juntos com bovinos. Há, também, uma preocupação quando cavalos e bovinos são mantidos juntos, pois o carrapato comum em cavalos é de outro gênero, *Amblyomma sculptum*, que em alguns países têm representantes – outras espécies, passando, também para os bovinos. Caso isso vier acontecer no Brasil o controle estratégico atualmente preconizado terá que ser revisto para alcançar ambas as espécies em questão. Como medida preventiva a medida inteligente e urgente é que se passe a monitorar também desde já a resistência desta espécie frente aos acaricidas.

## 10. Avaliar anualmente o desempenho do produto



### **Avalie anualmente o desempenho do produto**

O teste de sensibilidade dos carrapatos aos carrapaticidas deve ser repetido anualmente. Troque o carrapaticida por outro de mecanismo de ação diferente, no máximo a cada dois anos, de acordo com os resultados do novo teste.

Recomenda-se que, anualmente, ou sempre que se suspeitar de falhas após a aplicação carrapaticida, que sejam colhidas amostras de carrapatos adultos e enviadas para laboratórios capacitados para a realização de testes. Estes testes irão propiciar informações para um diagnóstico detalhado da situação de resistência na propriedade.

Produtos não recomendados para animais, como formulações caseiras feitas, entre outros, com produtos destinados a pragas agrícolas, não devem jamais ser empregados. Além de possibilitarem resultados insatisfatórios no controle do parasita, podem causar sérias intoxicações nos animais.

Os períodos de carência de cada produto para posterior utilização do leite e carne devem ser respeitados, para garantir segurança alimentar. Cuidado especial deve ser tomado quando se for adquirir o produto a utilizar, pois existem no mercado diferentes produtos com o mesmo nome comercial, os quais podem ou não ser aplicados em animais em lactação, dependendo da forma de aplicação (por exemplo, “*pour on*” ou “injetáveis”).

Ainda, quando da aquisição de carrapaticidas, tendo sido orientados a mudar a base química do produto, é preciso uma verificação cuidadosa sobre isso, pois apenas trocar de nome comercial não significa trocar a base química. Tal cuidado é necessário porque para cada base química existe uma gama variada de marcas comerciais, e a resistência tem apenas a ver com as bases químicas e suas associações e não com as diferentes formulações comerciais.



# GLOSSÁRIO





**Abrasão:** Efoladura, escoriação.

**Absorbância:** Medida da capacidade de um meio absorver a luz que o atravessa. Capacidade intrínseca dos materiais em absorver radiações em frequência específica.

**Acaricidas:** Produto que elimina ácaros.

**Acetilcolina:** Molécula neurotransmissora que atua na passagem do impulso nervoso dos neurônios para as células musculares.

**Acetilcolinesterase:** (acetilcolina + esterase) – enzima que acelera a hidrólise de acetilcolina.

**Ácido nucleico:** Molécula biológica composta por uma longa cadeia de nucleotídeos. O DNA é formado por adenina, guanina, citosina e timina; o RNA é formado por adenina, guanina, citosina e uracila. Em ambos os casos os nucleotídeos se repetem aleatoriamente milhares de vezes.

**Agentes patogênicos:** Agente biológico, capaz de produzir infecção ou doença infecciosa.

**Algoritmo:** Qualquer forma de resolver um problema de forma procedural a partir de padrões e regras.

**Âncora GPI (glicosilfosfatidilinositol):** Substância feita para ancorar uma proteína no lado externo da membrana citoplasmática de uma célula.

**Antígeno:** Qualquer partícula ou molécula capaz de desencadear resposta imune humoral via linfócitos T, sinalizando os linfócitos B.

**Arbovírus (de “arthropod borne virus”):** são vírus que podem ser transmitidos ao homem por vetores artrópodes.

**Autotomia:** Capacidade que alguns animais possuem de liberar partes do corpo.

**Biocarrapaticidogramas:** Bioensaios ou teste toxicológico utilizado especificamente em carrapatos para determinar a eficácia de uma substância ou droga.

**Bioensaios:** Teste experimental ou ensaio realizado na determinação do poder ativo relativo de uma substância ou droga, em animais, pela comparação de seu efeito com outro produzido por um preparado-padrão.

**BOD:** Demanda bioquímica de oxigênio (Biochemical Oxygen Demand).

**Boleto:** Articulação volumosa e arredondada dos membros dos equinos.

**Cachimbo ou pito:** Instrumento de madeira ou metal utilizado para a contenção de equídeos.

**Cadinho:** Vaso de material resistente ao fogo geralmente com o formato de um tronco de cone, para fundir ou calcinar minérios e minerais (esp. metais) ou para realizar certas operações químicas ou fisioquímicas que exigem altas temperaturas; crisol.

**Câmara de Neubauer:** Lâmina de vidro utilizada na microscopia para determinar a quantidade de células, que possui a superfície demarcada por pequenas áreas de igual tamanho para evitar erros de contagem.

**Cambão:** Peça comprido de madeira que se amarra por uma das extremidades ao pescoço de um animal, dificultando-lhe o movimento.

**Carapaça/cutícula:** Revestimento córneo, quitinoso ou calcário, que protege o corpo ou parte do corpo de diversos animais.

**cDNA:** DNA complementar.

**Células competentes:** Aquelas que apresentam um estado fisiológico que as tornam capazes de receber DNA exógeno.

**Cepa:** Palavra empregada na biologia para designar descendentes de um mesmo ancestral.

**Cernelha:** Região localizada entre os ossos do ombro e a base do pescoço dos animais.

**Conídios:** São esporos (unidades) assexuados característicos dos fungos.

**Contenção química:** Uso de medicamentos com o propósito de aliviar ou manejar sintomas ou comportamentos.

**Cromatografia:** Técnica quantitativa que tem por finalidade geral duas utilizações, a de identificação de substâncias e de separação-purificação de misturas, utilizando propriedades como solubilidade, tamanho e massa. Para o processo de separação de misturas, há duas fases: uma estacionária, tendo um material poroso como um filtro, e outra que é móvel como um líquido ou um gás, que ajuda na separação da mistura. Os constituintes dessas misturas interagem com as fases através de forças intermoleculares e iônicas, fazendo a separação. A mistura pode ser separada em várias partes distintas ou ainda ser purificada, eliminando-se as substâncias indesejáveis.

**Decúbito dorsal:** Posição do corpo do animal quando está deitado com o dorso voltado para baixo.

**Decúbito lateral:** Posição do corpo do animal quando está deitado de lado.

**DEPC:** Dicarbonato de dietila – inativador de enzimas RNase.

**Destruxina:** Metabólito produzido por fungo.

**Dissecação:** Isolar, por corte ou separação, para estudo, um órgão ou uma parte do corpo.

**Divertículo nasal:** Região dorsal cega da narina dos equinos.

**Doença infecciosa:** Efeito debilitante da infecção de um hospedeiro por um agente infeccioso.

**Eclodibilidade:** Variável utilizada para avaliar a quantidade ou percentual de larvas eclodidas.

**Eclosão:** Representa o fim do processo embrionário, onde, a larva rompe o ovo e “nasce”.

**Ectoparasitas:** Parasitas que vivem no exterior do corpo do hospedeiro.

**EDTA:** Ácido etilenodiamino tetra-acético. Age como agente quelante (função tamponante).

**Epítipo:** Menor porção de um antígeno capaz de desencadear resposta imune. É esta região que se liga nos receptores celulares e anticorpos. Podem ser lineares ou conformacionais. O primeiro é constituído por uma sequência única de aminoácidos, geralmente exposto à superfície da proteína; o segundo é constituído por uma sequência de aminoácidos não contínua na estrutura primária, porém, são próximas quando a estrutura terciária do antígeno é formada.

**Escápula:** Osso par plano que se situa lateralmente no terço cranial do tronco, em direção caudo-cranial, e dorso-ventralmente é fixado através de músculos.

**Esporos:** Unidade celular capaz de germinar e dar origem a um novo organismo.

**Esterases:** Grupo de enzimas capazes de hidrolisar compostos contendo ligações do tipo éster. Estão envolvidas com a resistência metabólica a inseticidas frequentemente a piretróides, organofosforados e carbamatos.

**Estolão:** tipo de caule que cresce paralelamente ao solo.

**Exsicata:** Amostra de planta prensada e em seguida seca numa estufa (herborizada), fixada em uma cartolina de tamanho padrão acompanhada de uma etiqueta ou rótulo contendo informações sobre o vegetal e o local de coleta, preparadas para fins de estudos botânicos e preservação. Exsicatas são normalmente guardadas num balão herbário, sempre que possível a exsicata deve apresentar flores.

**Extrato bruto:** Extrato bruto é uma preparação concentrada de tecidos vegetais (flores, frutos, folhas e ou planta inteira) com o qual se fará análise ou preparação com finalidades farmacêuticas. Desta preparação, se faz a remoção dos componentes ativos da droga com solventes adequados, evaporando todo ou quase todo o solvente, e ajustando a massa residual na forma de óleo ou em pó, com padrões estabelecidos.

**Extrusão:** Saída do patógeno do corpo do hospedeiro.

**Fitoterapia:** Fitoterapia (do grego *therapeia* = tratamento e *phyton* = vegetal) é a terapêutica caracterizada pelo uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal. Os medicamentos fitoterápicos são preparações elaboradas por técnicas da farmacognosia.

**Formato FASTA:** Um formato compacto onde os nucleotídeos ou aminoácidos são postos em sequência, formando linhas quando maior que 80 unidades. O formato sempre inicia com o sinal de >, seguido por um código identificador, seguido abaixo pela sequência do gene ou proteína.

**Formiga:** Instrumento metálico que é colocado entre as narinas dos bovinos, utilizado para a contenção dos mesmos.

**Fotoperíodo:** Incidência e quantidade de luz disponível no ambiente num determinado tempo.

**Fungos entomopatogênicos:** Fungos patógenos utilizados no controle microbiano e de pragas.

**Gel de eletroforese:** Processo de separação de moléculas pela migração através de um material semi-sólido (gel), sob a influência de um campo elétrico.

**Genomas:** Quando se diz genoma de um determinado organismo, significa que este possui todo seu código genético conhecido e depositado em algum banco de dados biológicos.

**Hélice Transmembrana:** Região de uma proteína anfipática (regiões hidrofílicas e hidrofóbicas dentro de uma mesma proteína) em forma de alfa-hélice que atravessa a membrana de bicamada lipídica de uma célula.

- Hematofagia:** Ingestão de sangue como hábito alimentar.
- Heterotérmicos:** Seres incapazes de controlar a temperatura corporal por processos internos.
- Heteróximo:** Que necessita de dois ou mais hospedeiros para completar seu ciclo de vida.
- Hipostômio:** Parte do aparelho bucal dos carrapatos que é introduzida na pele dos animais. É a extensão mediano-ventral da base do capítulo, situando-se entre os palpos. O hipostômio, ventralmente, é revestido por dentes recurvos, os quais geralmente estão dispostos em fileiras arranjadas em duas colunas.
- Hospedeiro:** É um organismo que abriga outro em seu interior ou o carrega sobre si, seja este um parasita, um comensal ou um mutualista.
- IFN-c:** Gene interferon gama.
- In Silico:** Qualquer análise ou ensaio realizado baseado em simulações computacionais.
- Infecção:** Penetração e desenvolvimento ou multiplicação de um agente etiológico no organismo humano ou animal, podendo ser vírus, bactéria, protozoário, helminto, etc.
- Ingurgitamento:** Ato de ingurgitar, ou seja, da ingestão de grande quantidade de alimento.
- Isotiocianato de guanidina:** Agente caotrópico utilizado como desnaturante na purificação e extração de ácidos nucleicos e proteínas.
- Jarrete:** Região do membro posterior relacionada aos ossos do tarso.
- Laceração:** Dilaceração; ferimento que rasga, despedaça ou dilacera.
- Liofilização:** Desidratação de substâncias realizada em baixas temperaturas, que pode ser utilizada em conservação de alimentos, fármacos, etc.
- Maceração:** Operação que consiste em empapar algo em um líquido para extrair os produtos solúveis.
- Manotadas:** Método de defesa empregado pelos equinos, nos quais esses usam o membro anterior para bater ou golpear quem esteja na frente.
- Metabólitos secundários:** São compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução dos organismos. Ao contrário dos metabólitos primários, a ausência dos metabólitos secundários não resulta na morte imediata dos organismos, entretanto, têm frequentemente um papel importante na defesa das plantas contra agentes agressores.
- Metacarpo:** Ossos do membro torácico ou anterior (canela). Situados entre ossos do carpo e falanges.
- Micro arranjos:** Técnica experimental que detecta os níveis de expressão de transcritos em larga escala.
- Microclima:** Condições climáticas de uma superfície ou região, realmente pequenos.
- Microrganismos patogênicos:** Organismos microscópicos capazes de produzir infecção ou doença infecciosa.
- Micuíns:** Nome popular dado às formas juvenis (larvas e ninfas) de carrapatos.

- Monoxeno:** Carrapatos que utilizam um único hospedeiro para todos os estádios evolutivos.
- MOPS:** Ácido 3-[N-morfolino]propano-ácido sulfônico. Tampão geralmente utilizado em eletroforese de gel de agarose para RNA.
- Mortalidade:** Relação entre o número de mortes por um período de tempo, e a população total de uma entidade geográfica.
- mRN:** RNA mensageiro.
- Muda/ecdise:** Processo de eliminação e troca do exoesqueleto.
- Multirresistente:** Organismo resistente à várias drogas.
- Nematoides:** São organismos (vermes) geralmente cilíndricos, esguios e alongados que podem ser importantes agentes no controle biológico (= nematódeos).
- Nucleotídeo:** Composto formado por três componentes; um açúcar (ribose ou desoxirribose), fosfato, e uma base nitrogenada.
- Oviposição:** Ato de expelir os ovos que é realizado por fêmeas de animais invertebrados (= ovoposição).
- Parasitismo:** No decorrer do processo evolutivo, a convivência oportunística íntima e frequente, no mesmo biótopo, entre determinados grupos de seres vivos, conduziu a um tipo de relação simbiótica obrigatória entre dois organismos heteroespecíficos (parasito e hospedeiro), caracterizada pela dependência metabólica unilateral, permanente ou temporária, do parasito. Alguns grupos de parasitos, intrinsecamente e/ou por causas variadas relacionadas ao hospedeiro, vieram a constituir-se nos organismos denominados de patógenos.
- Patógenos:** Agentes biológicos com capacidade de infectar e causar doenças.
- Pavilhão auricular:** Orelha.
- Peçonhenta:** Diz-se de animal que tem peçonha (veneno).
- Peia:** Peça de corda utilizado para contenção dos animais.
- Períneo:** Região que constitui a base do púbis, onde estão situados os órgãos genitais e o ânus.
- Pistilo:** Objeto geralmente de porcelana utilizado na maceração de tecidos.
- Plasmídeo:** Pequeno pedaço de DNA encontrado fora do cromossomo e capaz de se autorreplicar. Constitui a principal ferramenta para a inserção de novas informações genéticas em microrganismos e plantas.
- Primers:** São fitas de DNA, com mais ou menos 20 pares de bases (A, T, C, G) que se ligam por complementaridade ao início da sequência de DNA que se quer multiplicar.
- Proteomas:** É todo o conjunto de proteínas que pode ser encontrado em determinada célula, tecido, organismo ou fluidos destes, ou mesmo na interface de interação parasito-hospedeiro.
- Reação em cadeia da polimerase (PCR):** Metodologia que permite a multiplicação (ou amplificação) de sequências específicas de DNA em equipamentos conhecidos como termocicladores.

**Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR):** É uma reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase.

**Regiões Intrinsecamente Desordenadas:** Regiões de uma determinada proteína que não possuem sua estrutura terciária bem definida, sendo constantemente dobradas desordenadamente. É uma característica peculiar que depende das características de certos aminoácidos em uma sequência peptídica.

**Resistência química:** Habilidade de uma cepa de um parasita sobreviver e/ou multiplicar apesar de administração e absorção de uma droga dada em doses iguais ou maiores que a usualmente recomendada, mas dentro dos limites de tolerância do sujeito.

**Rifle pneumático:** Rifle utilizado para arremessar o dardo contendo o anestésico o qual é disparado por força de ar comprimido.

**RNA:** Ácido ribonucleico.

**RNA later:** Um reagente de armazenamento de tecido para estabilizar e proteger o RNA celular.

**Sazonalidade:** Evento ou situação que ocorre em determinada estação ou época do ano.

**Sedação:** Aplicação de sedativo visando aliviar sensação física de dor.

**Sequenciamento:** Processo de determinação da ordem sequencial de nucleotídeos de uma molécula de DNA ou RNA, ou de aminoácidos de uma proteína.

**Singânglio:** Corresponde a massa nervosa central dos ácaros, de onde partem os nervos para várias partes do corpo.

**Sobrenadante:** Material que se mantém em suspensão em uma solução.

**Sonificação:** Técnica que utiliza energia das ondas sonoras geradas a partir de processador ultrassônico que age na conformação da célula/sistema químico.

**Teleógina:** (*téleo* = completa; *gyné* = fêmea) – para os carrapatos, é a referência à fêmea repleta ou cheia de sangue (ingurgitada), antes, e mesmo depois, que se desprenda do hospedeiro.

**Transcriptase reversa:** Enzima DNA polimerase dependente de RNA que catalisa a síntese de DNA em um molde de RNA.

**Transcriptoma:** Conjunto completo de transcritos (RNAs mensageiros, RNAs ribossômicos, RNAs transportadores e os microRNAs).

**Transmissão por coalimentação:** Ocorre quando o agente patógeno é transmitido, através da saliva, entre dois artrópodes que se alimentam de um mesmo hospedeiro.

**Transmissão transestadial:** Ocorre quando há a infecção em um estádio e há transmissão no estádio seguinte.

**Transmissão transovariana:** Capacidade de o agente patogênico ser transmitido para ovos e larvas.

**Tween 80:** Líquido, oleoso, límpido, de cor amarela ou marrom clara, que é usado como dispersante e solubilizante.

**Vacinologia Reversa:** Procedimento de busca por antígenos candidatos à vacina partindo da análise do genoma, transcriptoma ou proteoma de um determinado organis-

mo, passando por simulações computacionais de interação das proteínas alvo com o sistema imune do hospedeiro antes dos ensaios em animais e humanos.

**Venopunção:** Introdução de uma agulha numa veia para injetar medicamentos ou para extrair sangue.

**vetor pGEM®:** Sistema adequado para clonagem de produtos da PCR.

**Vetores:** São seres vivos que veiculam o agente desde o reservatório até o hospedeiro potencial.

**Virulência:** É a capacidade de um agente biológico em infectar outros organismos e causar danos.

**Zarabatana:** Canudo comprido pelo qual se arremessam, com sopro, setas, dardos e outros projéteis.

**Zoonose:** Doenças e ou infecções transmitidas para o homem através dos animais.

