DIEGO GARCIA RAMIREZ

***Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae): Estudos morfológicos de larvas e adultos, ciclo biológico em condições laboratoriais e investigação e diagnóstico de *Rickettsia* spp.**

SÃO PAULO

2012

DIEGO GARCIA RAMIREZ

***Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae): Estudos morfológicos de larvas e adultos, ciclo biológico em condições laboratoriais e investigação e diagnóstico de *Rickettsia* spp.**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Departamento:

Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal

Área de concentração:

Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses

Orientador :

Profª. Drª. Darci Moraes Barros Battesti

São Paulo

2012

Autorizo a reprodução parcial ou total desta obra, para fins acadêmicos, desde que citada a fonte.

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO-NA-PUBLICAÇÃO

(Biblioteca Virginie Buff D'Ápice da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da
Universidade de São Paulo)

T.2734
FMVZ

Ramirez, Diego Garcia

Ornithodoros brasiliensis (Acari: Argasidae): Estudos morfológicos de larvas e adultos, ciclo biológico em condições laboratoriais e investigação e diagnóstico de *Rickettsia* spp. / Diego Garcia Ramirez. -- 2012.
71 f. : il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, São Paulo, 2012.

Programa de Pós-Graduação: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Área de concentração: Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses.

Orientador: Profa. Dra. Darci Moraes Barros Battesti.

1. *Ornithodoros brasiliensis*. 2. Descrição de larva. 3. Redescrição de adultos. 4. Ciclo biológico. 5. Infecção por *Rickettsia* spp. I. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

Comissão de Ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado "*Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae): estudos morfológicos de larvas e adultos, do ciclo biológico em condições laboratoriais e investigação e diagnóstico de *Rickettsia spp.*", protocolado sob o nº 1976/2010, utilizando 20 (vinte) cobaios, sob a responsabilidade da Profa. Dra. Solange Maria Gennari, está de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da "Comissão de Ética no uso de animais" da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e foi aprovado em reunião de 29/09/2010.

We certify that the Research "*Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae): morphological studies of larvae and adults, life cycle in laboratory conditions and investigation and diagnosis of *Rickettsia spp.*", protocol number 1976/2010, utilizing 20 (twenty) guinea pig, under the responsibility Profa. Dra. Solange Maria Gennari, agree with Ethical Principles in Animal Research adopted by "Ethic Committee in the use of animals" of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of University of São Paulo and was approved in the meeting of day 09/29/2010.

São Paulo, 07 de abril de 2011.

Profa. Dra. Denise Tabacchi Fantoni
Presidente

FOLHA DE AVALIAÇÃO

Nome: RAMIREZ, Diego Garcia

Título: *Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae): Estudos morfológicos de larvas e adultos, ciclo biológico em condições laboratoriais e investigação e diagnóstico de *Rickettsia* spp.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Ciências

Data: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Julgamento _____

Agradecimentos

Sou profundamente grato ao Instituto Butantan, pelas oportunidades que me foram dadas, como bolsista PAP-Fundap do Laboratório de Parasitologia e pela orientação recebida durante o estágio, que me despertou para a pesquisa científica. Consequentemente, me motivou a continuar os estudos acadêmicos, cuja primeira etapa ora se conclui.

Ao Curso de Pós-Graduação “Epidemiologia Experimental Aplicada às Zoonoses” do Departamento de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP, que possibilitou o credenciamento da orientadora e o desenvolvimento do mestrado.

Aos amigos e colegas de ambas as instituições que não só me deram apoio emocional, mas também suporte técnico/científico para a conclusão deste trabalho.

Aos Mestres que me proporcionaram conhecimento, influenciando toda a minha vida como pessoa e não apenas como profissional em formação.

Ao “Labcarrapatos” onde enfrentei meus maiores desafios e encontrei as melhores soluções.

À CAPES pela concessão da bolsa de mestrado.

RESUMO

RAMIREZ, D. G. ***Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae): Estudos morfológicos de larvas e adultos, ciclo biológico em condições laboratoriais e investigação e diagnóstico de *Rickettsia* spp.** [*Ornithodoros brasiliensis*: Morphological studies of larva and adults, life cycle in laboratory conditions, and investigation and diagnosis of *Rickettsia* spp.] 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Ornithodoros brasiliensis Aragão é um carrapato endêmico do Brasil, restrito às regiões serranas e frias do estado do Rio Grande do Sul. É uma espécie bastante agressiva aos humanos, causando febre, muita dor e intensa resposta inflamatória no local da picada. O ciclo biológico de *O. brasiliensis* (ovo a adulto, única geração) realizado nos anos 50, utilizando ratos brancos como hospedeiros, levou um total de 103 e 184 dias de amplitude, com máximo de 7 ínstaes ninfais observados e com emergência de adultos a partir de N4, estando os machos em maior proporção. Os hospedeiros apresentaram febre e uma bactéria espiroqueta denominada *Borrelia brasiliensis* foi descrita de esfregaços sanguíneos desses animais. Porém as borrelías não puderam ser cultivadas por muito tempo, e acabaram desaparecendo. Houve um silêncio de mais de 50 anos sobre relatos de ocorrência de *O. brasiliensis*, deixando inclusive dúvidas se a espécie estava extinta de fato. No entanto, há cerca de quatro anos, alguns espécimes de carrapatos da mesma localidade foram coletados e identificados como *O. brasiliensis*. O presente trabalho teve por objetivos estudar a morfologia e a biologia de *O. brasiliensis*, em condições de laboratório, bem como investigar a presença de bactérias do gênero *Rickettsia* em espécimes coletados. Ninfas e adultos foram alimentados em cobaias de laboratório e as fêmeas acasaladas realizaram posturas que resultaram nas gerações sucessivas. A larva e os adultos foram descritos e redescritos, e comparados com as espécies próximas, *O. rostratus* e *O. turicata*. Análises moleculares de uma porção do gene 16S rDNA mitocondrial foram comparadas com as sequências depositadas no GenBank e apresentaram valores de máximo bootstrap de 100% para ambas, *O. rostratus* e *O. turicata*. O ciclo biológico completo (ovo a ovo) de *O. brasiliensis* foi obtido entre 215,4 e 195 dias, em média, para duas gerações consecutivas, respectivamente. Os períodos médios de pré-oviposição, oviposição e incubação dos ovos (em dias), para a geração F1 foram $76,7 \pm 27,01$

(31-117); $15,55 \pm 5,36$ (10-24); $10,6 \pm 4,5$ (3-19) e para geração F2 foram $54,1 \pm 8,7$ (40-65), $15,8 \pm 8,9$ (7-36); 15,4. Os períodos médios de pré-ecdise larval foram de $12,5 \pm 1,8$ (10-15), considerando as duas gerações. A larva não se alimenta, enquanto que há um repasto sanguíneo para cada instar ninfal, antes de cada muda. Um total de 5 instares ninfais foi observado, sendo que os períodos médios de pré-ecdise para os instares N1, N2, N3, N4 e N5, respectivamente para as duas gerações foram de $33,3 \pm 4$ (32-45), $38,6 \pm 2,5$ (36-47), $31,1 \pm 3,4$ (28-42), $34,8 \pm 3,3$ (31-43), $37,2 \pm 2,4$ (35-41) e $32,5 \pm 3,3$ (29-40), $37,5 \pm 2,5$ (34-44), $34,6 \pm 3,2$ (31-37), $36,5 \pm 2,5$ (34-42), $32,5 \pm 0,7$ (32-33). Os períodos médios de alimentação para os instares ninfais, foram semelhantes nas duas gerações, sendo de $28,62 \pm 3,67$ (25,2 – 35,1) minutos. Adultos alimentam-se repetidas vezes, e as posturas sempre são precedidas de repasto sanguíneo, embora somente dois ciclos gonotróficos foram observados. O primeiro ciclo gonotrófico apresentou maior número de ovos depositados, com $139 \pm 13,8$ (53 – 197) em relação ao segundo $73,8 \pm 10,6$ (53 – 123). A investigação da presença de riquetsia foi avaliada em 107 espécimes recentemente coletados, evidenciando um total de 12 exemplares positivos. O produto amplificado pela PCR foi sequenciado e as análises moleculares apresentaram homologia de 98% com sequências disponibilizadas no Genbank, correspondentes a uma espécie asiática denominada RDa420 (AF497584) e outra brasileira, *Rickettsia bellii* (DQ865204) .

Palavras-chave: *Ornithodoros brasiliensis*, descrição de larva, redescricao de adultos, ciclo biológico, infecção por *Rickettsia*

ABSTRACT

RAMIREZ, D. G. ***Ornithodoros brasiliensis*: Morphological studies of larva and adults, life cycle in laboratory conditions, and investigation and diagnosis of *Rickettsia* spp.** [*Ornithodoros brasiliensis* (Acari: Argasidae): Estudos morfológicos de larvas e adultos, ciclo biológico em condições laboratoriais, e investigação e diagnóstico de *Rickettsia* spp.] 2012. 71 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

Ornithodoros brasiliensis Aragão is an endemic tick to Brazil, restricted to the highlands and cold regions of the state of Rio Grande do Sul. This species is very aggressive to humans, causing fever, great pain and intense inflammatory response at the site of the bite. The life cycle of *O. brasiliensis* (egg to adult, single generation) previously performed (studied during 50') using white mice as host, spent a total of 103 and 184 days of amplitude, with maximum 7 nymphal instars observed, with adult emerging from N4, and males in greater proportion. The hosts had fever and spirochete bacteria called *Borrelia brasiliensis* was described from blood of the animals used. Nevertheless borrelias could not be cultivated for a long time, and they eventually disappeared. A silence of more than 50 years on reports of occurrence of *O. brasiliensis*, left doubts about whether the species was extinct. However, about four years ago, some specimens of ticks were collected in the same locality and identified as *O. brasiliensis*. This work aimed to study the morphology and biology of *O. brasiliensis*, under laboratory conditions, and investigate the presence of bacteria of the genus *Rickettsia* in the collected ticks. Nymphs and adults were fed on laboratory guinea pigs, and mated females laid eggs that resulted in the successive generations. The larvae and adults have been described and redescribed, respectively, and compared with the closely related species, *O. rostratus* and *O. turicata*. Molecular analyzes of a portion of the mitochondrial 16S rDNA gene was compared with the sequences deposited in GenBank, showing maximum bootstrap values out of 100% for both *O. rostratus* and *O. turicata*. In this study, the complete life cycle (egg to egg) of *O. brasiliensis* was obtained between 215,4 and 195 days, on average, for the two generations studied, respectively. The average periods of preoviposition, oviposition and incubation of the eggs to the F1 generation were $76,7 \pm 27,01$ (31-117), $15,55 \pm 5,36$ (10-24), and to F2 were $54,1 \pm 8,7$ (40-65), $15,8 \pm 8,9$

(7-36). The averaging periods to the preecdysis of the larvae were $12,5 \pm 1,8$ (10-15), considering the two generations. The larva does not feed, while for the nymphs there is a blood meal for each instar, before each molt. A total of five nymphal instars was observed, and the average periods of pre-molt instars for N1, N2, N3, N4 and N5, for two generations, respectively, were $33,3 \pm 4$ (32-45), $38,6 \pm 2,5$ (36-47), $31,1 \pm 3,4$ (28-42), $34,8 \pm 3,3$ (31-43), $37,2 \pm 2,4$ (35-41) and $32,5 \pm 3,3$ (29-40), $37,5 \pm 2,5$ (34-44), $34,6 \pm 3,2$ (31-37), $36,5 \pm 2,5$ (34-42), $32,5 \pm 0,7$ (32-33). The average feeding time of nymphal instars, were similar in the two generations, being $28,62 \pm 3,67$ (25,2 – 35,1) minutes. Adults fed repeatedly, and the postures were always preceded by blood meal, although only two gonotrophic cycles have been observed. The first gonotrophic cycle presented higher average number of eggs deposited $139 \pm 13,8$ (53-197) that the second $73,8 \pm 10,6$ (53 – 123). The investigation to the presence of rickettsia was performed in 109 recently collected ticks, showing a total of 12 positive specimens. The amplified PCR product was sequenced and molecular analyzes showed 98% homology with sequences available in Genbank, corresponding to an Asian species named RDa420 (AF497584) e another Brazilian strain named *Rickettsia bellii* (DQ865204).

Keywords: *Ornithodoros brasiliensis*, description of larva, redescription of adults, life cycle, infection with *Rickettsia*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros biológicos de Fêmeas.....	41
---	----

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Adulto do gênero <i>Ornithodoros</i> . a) Dorsal; b) Lateral e ventral; c) Ventral, anterior; d) Lateral anterior; e) Capítulo, ventral; f) perna I; g) Perna IV.	28
Figura 2 - Caracteres taxonômicos de larvas de <i>Ornithodoros</i> sp.: a, b, c, d) Placas dorsais; e,f, g) Dentição e formato do hipostômio; h, i, j) Orgão de Haller.....	29
Figura 3 – a) Poços de placa de cultura, contendo os espécimes em areia autoclavada e algodão umedecido; b) ovos em placa de Petri com areia autoclavada.	33

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Parâmetros biológicos dos instares ninfas I – V, das gerações F1 e F2.....	39
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS, SIMBOLOS E SIGLAS

B.O.D.	estufa Biológica com Demanda de Oxigênio
F1	primeira Geração
F2	segunda Geração
IPO	índice de produção de ovos
IEN	índice de eficiência nutricional
N1	Ninfa em primeiro instar
N2	Ninfa em segundo instar
N3	Ninfa em terceiro instar
N4	Ninfa em quarto instar
N5	Ninfa em quinto instar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 SITUAÇÕES TAXONÔMICAS.....	19
2.1.1. Lista de espécies de argasidae que ocorrem no brasil (em ordem alfabética)	21
2.2. CICLO BIOLÓGICO	22
2.3 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE	23
3 OBJETIVOS.....	25
3.1 OBJETIVO GERAL	25
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 ORIGEM DOS CARRAPATOS.....	26
4.2 ESTUDOS MORFOLÓGICOS.....	26
4.2.1 MICROSCOPIA ÓPTICA	26
4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura.....	27
4.2.3 Diagnose do gênero.....	27
4.3 ESTUDOS MOLECULARES	30
4.4 CICLO BIOLÓGICO	31
4.4.1 Obtenção da colônia de laboratório.....	31
4.4.2 Parâmetros biológicos	31
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4.6 INVESTIGAÇÃO E DIAGNÓSTICO DE RICKETTSIA	34
5 RESULTADOS	36
5.1 CAPÍTULO 1: DESCRIÇÃO DA LARVA E REDESCRIÇÃO DE ADULTOS DE <i>Ornithodoros brasiliensis</i> ARAGÃO (ACARI: ARGASIDAE) E DESIGNAÇÃO DE NEÓTIPO	36
5.2. CAPÍTULO 2: CICLO BIOLÓGICO DE <i>Ornithodoros brasiliensis</i> ARAGÃO (ACARI: ARGASIDAE) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE <i>RICKETTSIA</i> EM CARRAPATOS COLETADOS.	36

5.2.1. Parâmetros das ninfas da geração f1.....	37
5.2.2. Parâmetros das ninfas da geração f2.....	38
5.2.3. Parâmetros dos adultos da geração f1	41
5.2.4. Parâmetros dos adultos da geração f2	42
6. PESQUISA DE <i>RICKETTSIA</i>	44
7 DISCUSSÃO	45
7.1 SITUAÇÃO TAXONÔMICA	45
7.2 CICLO BIOLÓGICO E INVESTIGAÇÃO DE <i>RICKETTSIA</i>	46
8 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
ANEXO.....	70

1 INTRODUÇÃO

Os carrapatos formam um grupo de grande importância médica e veterinária, por seu comportamento hematofágico e por serem importantes veiculadores de uma variedade de agentes patogênicos. Podem causar irritação por sua picada ou ainda levar a perda de sangue exagerada devido às grandes infestações, resultando na queda de produção e elevados custos para o seu controle (GUIMARÃES et al., 2001; DANTAS TORRES et al., 2009).

São artrópodes pertencentes à subclasse Acari da classe Arachnida, ordem Ixodida, que se subdivide em três famílias: Ixodidae, Argasidae e Nuttalliellidae. As duas primeiras ocorrem em todos os continentes, mas a última é restrita ao continente africano. Distinguem-se dos demais ácaros pela presença de hipostômio denticulado (maioria) e de uma estrutura quimiorreceptora localizada no tarso do primeiro par de pernas, denominada órgão de Haller (SONNENSHINE, 1991).

Os representantes da família Ixodidae são popularmente conhecidos como “carrapatos-duros” pela presença de um escudo dorsal fortemente esclerotizado no idiossoma, observável em todos os estágios biológicos ativos, sendo completo nos machos, mas pequeno e restrito à porção anterior nas fêmeas e nos estágios imaturos. Já os argasídeos são chamados “carrapatos-moles” pela ausência de escudo em praticamente todas as espécies. Em Nuttalliellidae, família representada por uma única espécie, as características morfológicas são intermediárias entre as duas anteriores (BARROS-BATTESTI et al., 2006).

Os carrapatos argasídeos apresentam desenvolvimento característico multi-hospedeiro, alimentando-se no mesmo animal várias vezes ou em vários animais, da mesma espécie ou não, durante seu ciclo de vida. Seu habitat pode estar intimamente associado ao homem e animais domésticos, sendo encontrados em porões, estábulos, galinheiros e camas rústicas. Todavia, vivem também em ambientes como tocas, buracos, cavernas, ninhos de aves silvestres e marinhas, solo solto, casca de árvores, entre outros substratos (ARAGÃO, 1936).

Com relação à transmissão de patógenos, diferentes características biológicas e fisiológicas, assim como a interação entre elas, permite aos argasídeos agirem como reservatórios de uma infinidade de agentes infecciosos. Esses microrganismos podem ser transmitidos aos hospedeiros suscetíveis semanas ou

meses após o contato com o carrapato originalmente infectado. Porém, o confinamento em ambientes restritos pode variar drasticamente o comportamento parasito-hospedeiro, modificando a capacidade vetorial em manter e transmitir tais agentes (HOSKINS; CUPP, 1988).

A espécie *O. brasiliensis* é restrita às regiões serranas e frias do estado do Rio Grande do Sul (ARAGÃO, 1923), vivendo em locais com cerca de 1100 metros de altitude. Houve um silêncio de mais de 50 anos sobre relatos de ocorrência desta espécie, deixando inclusive dúvidas se estava extinta. No entanto, há cerca de quatro anos, alguns espécimes de *O. brasiliensis* foram coletados em São Francisco de Paula, RS, no solo solto de um porão de uma residência da zona rural, onde as pessoas picadas queixaram-se de muita febre e feridas na pele (MARTINS et al., 2008).

Morfológicamente, adultos de *O. brasiliensis* são próximos a *Ornithodoros turicata* (Dugès, 1876) e à *Ornithodoros rostratus* Aragão, 1911. A primeira é de distribuição neártica enquanto que a segunda é neotropical. Devido ao hábito de se enterrarem, são popularmente conhecidas como “carrapato-de-chão” ou “ground tick”.

Outros espécimes de *O. brasiliensis* em diferentes estágios de desenvolvimento foram posteriormente encontrados em solo solto de porões de outras propriedades, ou ainda sob galpões de diversos materiais. Esses locais são normalmente utilizados por vários animais domésticos e silvestres como refúgio e proteção, especialmente por conta do frio severo. Trata-se de um carrapato bastante agressivo aos humanos, causando febre, muita dor e intensa resposta inflamatória no local da picada (MARTINS et al., 2011).

Isto permitiu que fosse realizada, durante a vigência deste estudo, a redescritção dos adultos e a primeira descrição das larvas (BARROS-BATTESTI et al., 2012), visto que até então, o que se tinha era uma descrição superficial e com poucos caracteres de distinção com a espécie próxima *O. rostratus*.

Os adultos de *O. brasiliensis* foram alimentados em cobaias e as fêmeas acasaladas realizaram posturas que resultaram nas gerações sucessivas.

Assim esta dissertação compreendeu estudos morfológicos de larva e adultos de *O. brasiliensis*, e biológicos, bem como investigação da presença de infecção por *Rickettsia* em espécimes coletados. Para tanto, o trabalho foi dividido em 2 capítulos:

Capítulo 1 – Descrição da larva e redescrição de adultos de *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae) e designação de neótipo.

Capítulo 2 – Ciclo biológico de *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae) em condições de laboratório e investigação da presença de *Rickettsia* em carrapatos coletados.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 SITUAÇÕES TAXONÔMICAS

A classificação dos argasídeos sempre foi bastante controversa já que muitos problemas taxonômicos sem solução já haviam sido abordados desde o início do século passado, principalmente pela falta de boas descrições e adequados caracteres genéricos (COOLEY; KOHLS, 1944).

Neumann (1896) fez uma primeira revisão da família, apresentando os caracteres dos gêneros *Argas* Latreille, 1796 e *Ornithodoros* Koch, 1844. Para *Argas*, as seguintes espécies foram incluídas: *A. reflexus* (Fabricius, 1794); *A. persicus* (Oken, 1818); *A. americanus* Packard 1872 (sin. *A. persicus*); *A. hermanni* Audouin, 1827; *A. magnus* Neumann, 1896; *A. sanchezi* Dugès, 1891; *A. vespertilionis* (Latreille, 1796); *A. forskaeli* (Audouin, 1827) (nom. nud.); *A. miniatus* Koch, 1844; *A. mauritanus* Guérin-Mèneville, 1844 (sin. *A. persicus*) e *A. trogluoides* Gervais (nom. nud.). Para o gênero *Ornithodoros*, as espécies reconhecidas eram *O. savignyi* (Audouin, 1827); *O. coriaceus* Koch, 1844; *O. turicata* (Dugès, 1876); *O. talaje* (Guérin-Mèneville, 1849); *O. erraticus* (Lucas, 1849); *O. tholozani* (Laboulbène & Mégnin, 1882); *O. rudis* Karsch, 1880; *O. miliaris* Karsch, 1880 (sin. *O. tholozani*); *O. reticulatus* (Gervais, 1849) (nom. nud.) e *Ornithodoros megnini* (Dugès, 1884) (= *Otobius* Banks, 1912).

Neumann (1901) apresentou chaves de identificação para as espécies de *Argas* e *Ornithodoros* que, naquela época, reuniam cerca de 8 e 11 espécies, respectivamente. Os gêneros *Otobius* e *Antricola* foram adicionados posteriormente por Banks (1912) e Cooley e Kohls (1942), respectivamente.

Segundo Cooley e Kohls (1944), em 1908 cerca de 20 espécies de argasídeos eram conhecidas no mundo todo, mas, na revisão proposta por estes autores para os argasídeos americanos, foram incluídas aproximadamente 25 novas espécies.

Embora Aragão (1908, 1911, 1923, 1931, 1936) e Aragão e Fonseca (1961) tenham contribuído de maneira fundamental para o conhecimento das espécies de carrapatos do Brasil, as descrições de argasídeos foram restritas a duas espécies apenas, *O. rostratus* Aragão, 1911 e *O. brasiliensis* Aragão, 1923.

No caso de outras espécies citadas para o território brasileiro, como *O. nattereri* Warburton, 1927 e *O. jul* Schulze, 1940, ambas foram descritas de espécimes adultos e ninfas, nunca mais encontrados (DANTAS-TORRES; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2009). Outras, como é o caso de *O. capensis*, *O. rudis*, Os tipos foram depositados em Viena e em Berlim, respectivamente, não havendo representantes nas coleções nacionais.

Matheson (1935) descreveu *O. dunni* de larvas coletadas em morcegos do Panamá e Cooley e Kohls (1944) redescreveram a espécie e mencionaram o Brasil na área de distribuição. Estes autores reportaram que receberam uma fêmea de *O. dunni*, coletada em junho de 1941 de um oco de árvore, da Ilha de Marajó, Belém, Estado do Pará. Aragão e Fonseca (1961) reportaram esta espécie entre os argasídeos brasileiros que, na ocasião, a lista já contava com 8 espécies.

Clifford et al. (1964) fizeram uma revisão da família, acrescentando diagnoses para todos os subgêneros válidos até então e reconheceram 3 gêneros para a subfamília Ornithodorinae (*Ornithodoros*, *Otobius* e *Antricola*).

Fairchild et al. (1965) sinonimizaram *O. dunni* com *O. hasei* (Schulze, 1935) e a sinonímia foi mantida por Kohls et al. (1965) que propuseram uma chave para larvas de argasídeos do Hemisfério Oeste.

Kohls et al. (1969) fizeram a descrição de 8 novas espécies, dentre as quais, *O. setosus*, cujos espécimes tipos foram obtidos de morcegos coletados em Piedras Novas, Rondônia, Brasil, e também da Venezuela e do México.

Jones e Clifford (1972) descreveram 7 novas espécies para algumas regiões da Venezuela e Nicarágua aprimorando a chave para larvas proposta por Kohls et al. (1965).

Após um intervalo de mais de 30 anos, foram descritas 3 espécies de *Antricola* para o Brasil (ESTRADA-PEÑA et al., 2004), onde o gênero foi citado pela primeira vez. Os autores propuseram uma chave para adultos das 17 espécies conhecidas.

A fauna mundial de argasídeos compreende hoje aproximadamente 200 espécies reconhecidas (LABRUNA et al., 2008, LABRUNA; VENZAL, 2009, NAVA; GUGLIELMONE; MANGOLD, 2009, NAVA et al., 2010; GUGLIELMONE et al. 2010, BARROS-BATTESTI et al., 2011, DANTAS-TORRES et al. 2012).

Para a Região Neotropical são reconhecidas 85 espécies, incluídas nos gêneros: *Antricola* Cooley & Kohls, 1942 (17 espécies); *Argas* Latreille, 1795 (12

espécie); *Nothoaspis* Keirans & Clifford, 1975 (2 espécies); *Ornithodoros* Koch, 1844 (53 espécies) e *Otobius* Banks, 1912 (1 espécie). No Brasil, até o momento são conhecidas 21 espécies de argasídeos: *Ornithodoros* (16 espécies), *Antricola* (3 espécies), *Argas* (1 espécie) e *Nothoaspis* (1 espécie) (DANTAS-TORRES; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2009, LABRUNA; VENZAL, 2009, NAVA et al. 2010, DANTAS-TORRES et al. 2012), não havendo registro para *Otobius*. Este último gênero, representado pela espécie *O. megnini* (Dugès, 1883), já foi referido para o Norte do Brasil nos anos 70 porém não se estabeleceu (DANTAS-TORRES; ONOFRIO; BARROS-BATTESTI, 2009).

2.1.1. Lista de espécies de argasidae que ocorrem no brasil (em ordem alfabética)¹

Antricola delacruz Estrada-Peña, Barros-Battesti, Venzal, 2004

Antricola guglielmonei Estrada-Peña, Barros-Battesti, Venzal, 2004

Antricola inexpectata Estrada-Peña, Barros-Battesti, Venzal, 2004

Argas miniatus Koch, 1844

Nothoaspis amazoniensis Nava, Venzal, Labruna, 2010

Ornithodoros brasiliensis Aragão, 1923

²*Ornithodoros capensis* Neumann 1901

Ornithodoros cavernicolous Dantas-Torres, Venzal, Labruna, 2012

Ornithodoros fonsecai (Labruna, Venzal, 2009)

Ornithodoros hasei (Schulze, 1935)

Ornithodoros jul Schulze, 1940

³*Ornithodoros kohlsi* Guglielmone, Keirans, 2002

Ornithodoros marinkellei Kohls, Clifford, Jones, 1969

Ornithodoros mimon Kohls, Clifford, Jones, 1969

Ornithodoros nattereri Warburton, 1927

¹ Lista baseada em Cooley e Kohls (1944), Aragão e Fonseca (1961) e Dantas-Torres et al. (2012).

² Não há registro claro para o Brasil e ocorre em aves marinhas de várias regiões do mundo. Além disso, não foi considerada válida por Aragão e Fonseca (1961), e está como “provisoriamente aceita” por Dantas-Torres et al. (2009).

³ Exemplares depositados na Coleção Acarológica do Instituto Butantan (D.M. Barros-Battesti com. pes.).

Ornithodoros rondoniensis (Labruna, Terassini, Camargo, Brandão, Ribeiro, Estrada-Peña, 2008)

Ornithodoros rostratus Aragão, 1911

Ornithodoros rudis Karsch, 1880

Ornithodoros setosus Kohls, Clifford, Jones, 1969

Ornithodoros stageri Cooley, Kohls, 1941

Ornithodoros talaje (Guérin-Méneville, 1849)

2.2. CICLO BIOLÓGICO

Brumpt (1915) descreveu superficialmente o ciclo de *O. rostratus* utilizando cães domésticos como hospedeiros. A mesma espécie foi novamente estudada por Guglielmone e Hadani (1980) que usaram cobaia para alimentação dos carrapatos.

Segundo Balashov (1972), os machos de argasídeos emergem, proporcionalmente, antes das fêmeas e este modelo é bastante comum aos representantes do gênero *Ornithodoros*, com raras exceções. Conforme este autor, as fêmeas de argasídeos podem acasalar e realizar posturas muitas vezes durante sua vida (ciclos gonotróficos), geralmente precedidas de alimentação. Em alguns casos, um acasalamento pode ser suficiente para mais de uma postura, desde que a fêmea tenha realizado repasto sanguíneo. Por outro lado, o período de pré-oviposição no primeiro ciclo gonotrófico é geralmente superior aos dos ciclos posteriores, mas a quantidade de ovos é menor.

Khalil e Hoogstraal (1981) relataram que o tempo de pré-postura é mais longo porque a fêmea jovem ainda está madurecendo e desenvolvendo o aparelho reprodutivo (genitália), consumindo e desviando parte do sangue ingerido no primeiro repasto sanguíneo para isto. Nos ciclos gonotróficos subsequentes o repasto sanguíneo é direcionado para a produção dos ovos.

Segundo Hoogstraal e Aeschlimann (1982) os argasídeos têm um padrão de vida que envolve múltiplos hospedeiros, já que cada ínstar ninfal parasita o animal disponível. A rápida alimentação do estágio larva (algumas horas apenas) e os longos períodos de pré-ecdise é típica de espécies que parasitam preferencialmente mamíferos terrestres (Hoogstraal, 1985). Entre as espécies que possuem este tipo de comportamento, o autor citou, entre outras, *O. rostratus*.

Hoogstraal (1985), Oliver (1989) e Sonenshine (1991) mencionaram que *O. megnini* é exceção porque se trata de um carrapato de um único hospedeiro, e além disso, os carrapatos adultos não se alimentam.

Need et al. (1992) fizeram um estudo sobre resposta celular da picada de *O. talaje* em roedores de laboratório e para tanto obtiveram algumas informações sobre os aspectos biológicos da espécie.

Schumaker e Barros (1995) acompanharam a biologia de *O. talaje* em laboratório utilizando ave doméstica para alimentação de todos os estágios. Embora os autores tenham tentado alimentar as larvas em roedores, o sucesso de recuperação de espécimes ingurgitados foi muito baixo. Aves domésticas foram usadas por Schumaker et al. (1997) para manter a espécie peruana *O. amblus* Chamberlain, 1920, cuja biologia foi também estudada.

Venzal e Estrada-Peña (2006) avaliaram aspectos biológicos da fase parasitária de larvas de *O. rostratus* utilizando coelhos como hospedeiros.

Com exceção de espécies que parasitam animais domésticos, *O. talaje* e *O. mimon* (LANDULFO et. al., 2012) e, mais recentemente, de *O. rostratus* (JLH Faccini, comunicação pessoal), o ciclo de vida de poucos argasídeos foram reportados na literatura, embora alguns resumos de congresso eventualmente tenham sido publicados em anais.

2.3 IMPORTÂNCIA EM SAÚDE

No Brasil, os primeiros relatos foram os feitos por Aragão (1916) sobre *Ornithodoros rostratus*, no qual o autor relatou a permanência dos carrapatos enterrados no chão, saindo periodicamente para picar pessoas ou qualquer animal que estivesse disponível. Ainda reportou o surgimento de úlceras e de uma picada bastante dolorosa, não havendo diagnóstico ou confirmação de qualquer patógeno nos esfregaços de sangue de animais de laboratório testados pelo autor.

Na década de 30, surgiram os primeiros registros do parasitismo humano pelo carrapato *Ornithodoros brasiliensis* em áreas rurais pobres do Rio Grande do Sul (Di Primio, 1937). Este autor relatou a ocorrência de reações severas no local da picada, com intenso prurido e manifestações clínicas gerais e febre. Segundo sua avaliação, considerou este carrapato, ao qual chamou “bicho mouro” como de grande importância epidemiológica.

Anos mais tarde, Davis (1952), ao estudar sua biologia em condições de laboratório, descobriu uma bactéria espiroqueta a qual denominou *Borrelia brasiliense*. A borrelia foi obtida do sangue dos roedores que apresentaram febre. As bactérias foram mantidas em várias passagens nos hospedeiros, mas ao final não puderam ser cultivadas por muito tempo, e acabaram desaparecendo. Até hoje não se sabe ao certo se a borrelia foi de fato a responsável pela febre causada nos roedores.

O gênero *Ornithodoros* possui diversas espécies envolvidas na transmissão de microrganismos patogênicos, principalmente organismos bacterianos do gênero *Borrelia* (HOOGSTRAAL, 1985). Em relação ao parasitismo em humanos, Estrada-Peña e Jongejan (1999) relacionaram 22 espécies. Aquelas listadas como as mais frequentes foram *O. moubata* (Murray, 1877), *O. parkeri* Cooley, 1936, *O. hermsi*, *O. capensis*, *O. kelleyi* e *O. erraticus* (HOOGSTRAAL et al., 1976, VARGAS, 1984, ESTRADA-PEÑA; JONGEJAN, 1999).

Novos relatos de caso de severas reações locais e sistêmicas por múltiplas picadas por *O. brasiliensis* em humanos, e de paralisia induzida pelo parasitismo maciço em cães, foram descritas (MARTINS et al., 2011 e RECK et al., 2011).

Embora não tenha sido detectada a presença de patógenos em *O. fonsecai* e *O. mimon*, ambas as espécies são agressivas aos humanos e causam lesões severas no local da picada (LABRUNA et al., 2008, LANDULFO et al., 2012).

O último e mais recente trabalho relata o encontro de uma espécie de *Coxiella* em espécimes de *O. rostratus*, provenientes do estado do Mato Grosso do Sul, diagnosticado através de técnicas moleculares (ALMEIDA et al., 2012). No entanto, os autores comentaram que a bactéria é possivelmente um endossimbionte.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a morfologia de larvas e adultos de *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, bem como o ciclo biológico da espécie em condições laboratoriais e investigar a presença de *Rickettsia* spp. nos carrapatos provenientes da natureza.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever morfologicamente os estágios de larva e redescrever adultos de *O.brasiliensis*
- Estudar o ciclo biológico de *O. brasiliensis* por pelo menos duas gerações em condições laboratoriais.
- Investigar a infecção natural de *O.brasiliensis* por bactérias do gênero *Rickettsia*.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 ORIGEM DOS CARRAPATOS

Adultos e ninfas de *O. brasiliensis* foram obtidos de porões de residências nas áreas rurais do município de São Francisco de Paula, RS (29° 20' 00" S; 48° 30' 21" W), em 2008. Após alimentação (conforme descrito no subitem 4.4.1) as fêmeas fizeram posturas de ovos que deram origem às gerações sucessivas. Uma parte das larvas foi fixada em álcool 80% para os estudos taxonômicos. Outra parte foi preparada para as análises moleculares e uma terceira amostra foi mantida para obtenção da colônia.

4.2 ESTUDOS MORFOLÓGICOS

Para comparação morfológica com *O. brasiliensis*, o material de *O. turicata* depositado na coleção do IBU (IBSP 1061, 2 fêmeas, Texas, EUA, número 5 da Coleção de Matheson, 1937), bem como exemplares adultos de dois lotes de *O. rudis* (IBSP 1062, do Panamá e IBSP 4960, do Paraguai) e de 24 lotes de *O. rostratus* de diferentes regiões brasileiras, foram examinados.

4.2.1 MICROSCOPIA ÓPTICA

Somente as larvas foram preparadas em lâminas para os estudos morfológicos. Os adultos não requerem preparo prévio.

As larvas foram colocadas em ácido láctico puro para a clarificação e, quando necessário, o meio foi aquecido a 50-60°C, para acelerar o processo. Após clarificados, os exemplares foram transferidos para uma solução alcoólica de fenol conhecida como solução alcoólica saturada de fenol (aos poucos foi adicionado álcool absoluto aos cristais de fenol, até que todos os cristais ficassem totalmente dissolvidos). Nessa solução, o processo de clarificação se conclui ao mesmo tempo em que ocorreu a desidratação do material. Em seguida, os carrapatos foram lavados em álcool puro e posteriormente colocados em creosoto de faia. Depois de 24 horas, cada exemplar foi montado em meio de Hoyer entre lâmina e lamínula.

As medidas das larvas foram obtidas em microscópio óptico da marca Zeiss, modelo MC 80 DX. Todas as medidas foram dadas em mm, seguidas pela média, desvio padrão e amplitude. Os adultos foram todos medidos em microscópio estereoscópico, modelo Leica MZ 12.

4.2.2 Microscopia eletrônica de varredura

Cinco larvas, 2 fêmeas e 2 machos de *O. brasiliensis* foram limpos em água destilada e detergente em 3 etapas com 2 minutos de intervalo entre elas: 10 minutos em água com detergente; 6 minutos somente em água destilada e 3 minutos em água destilada. Dois exemplares adultos de *O. rostratus* foram igualmente preparados. O aparelho utilizado para limpeza é da marca UNIQUE (Modelo USC 700, 40 kHz).

Os exemplares foram desidratados em séries alcoólicas crescentes, colocados em acetona e, após o ponto crítico, metalizados com ouro, para microscopia eletrônica de varredura. As imagens foram obtidas em microscópio eletrônico de varredura da marca Zeiss, modelo Leo 440, no Museu de Zoologia da USP.

4.2.3 Diagnose do gênero

A descrição dos principais caracteres morfológicos comuns aos representantes do gênero *Ornithodoros* (Figuras 1 e 2), e de valor taxonômico na separação de espécies, foi adaptada de Kohls et al. (1944).

Diagnose de Adultos (Figura 1 a-g) - tegumento mamilado (excessão, espécies do grupo *Subparmatus*) e com presença de discos na maioria; capuz, camerostômio e olhos presentes ou ausentes; bochechas presentes ou ausentes; placas dorsais ausentes (exceto no grupo *Subparmatus*); presença ou ausência de protuberâncias dorsais nos tarsos.

Diagnose de Larvas (Figura 2 a-j) - placa dorsal (ausente em poucas espécies) com diferentes formatos, variando desde triangular e piriforme até subretangular; hipostômio pontiagudo no ápice (especialmente nas espécies associadas a

morcegos) ou com ápice arredondado (especialmente naquelas espécies que vivem no solo); fórmula dentária variável de 2/2 a 4/4 (Figura 2 e-g); 1 par de glândulas coxais que se abrem ventralmente e posteriores ao 1º. par de pernas; órgão de Haller com a cápsula em forma de fenda transversal (Figura 2 h-j).

Figura 1 – Adulto do gênero *Ornithodoros*. a) Dorsal; b) Lateral e ventral; c) Ventral, anterior; d) Lateral anterior; e) Capítulo, ventral; f) perna I; g) Perna IV.

Adaptado de Cooley e Kohls (1944).

Figura 2 - Caracteres taxonômicos de larvas de *Ornithodoros* sp.: a, b, c, d) Placas dorsais; e, f, g) Dentição e formato do hipostômio; h, i, j) Orgão de Haller.

Fonte: Barros-Battesti et al. (artigo em preparação).

4.3 ESTUDOS MOLECULARES

Os espécimes de *O. brasiliensis* foram processados para extração de DNA usando o kit comercial DNEasy Tissue kit (Qiagen®), seguindo as recomendações do fabricante, com algumas modificações de acordo com Desloire et al. (2006). Um fragmento de ~400-pb do gene 16S rDNA mitocondrial foi obtido como proposto por Mangold et al. (1998) usando um par de oligonucleotídeos amplificadores de alta sensibilidade “primers”: 16S + 1 (5'-CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG-3'); 16S – 1 (5'-CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T- 3') (BLACK; PIESMAN, 1994). O produto amplificado foi purificado com o ExoSAP-IT (USB Corporation®) e sequenciado usando o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer).

A sequência do 16S rDNA (426bp) de *O. brasiliensis* (GU198363) foi alinhada com sequências previamente determinadas para outros argasídeos, que estão disponíveis no banco de genes “Genbank”: *Argas reflexus* (AF001401), *A. monachus* Keirans, Radovsky, Clifford (EU283344), *A. monolakensis* Schwan, Corwin, Brown (L34305), *A. neghmei* Kohls, Hoogstraal (DQ295781), *Ornithodoros coriaceus* (AY668970), *O. gurneyi* Warburton (AY436767), *O. parkeri* Cooley (EU009925), *O. turicata* (L34327), *O. rostratus* (DQ295780), *O. porcinus* Walton (L34329), *O. moubata* (Murray) (L34328), *O. fonsecai* (GQ120967), *O. mimon* (GU198362), *O. rondoniensis* (EU090907), *Antricola guglielmonei* (EU090905) e *A. mexicanus* Hoffmann (L34323).

As análises filogenéticas foram realizadas por máxima parcimônia (MP) e métodos Bayesianos (B). As árvores de MP foram preparadas pelo programa PAUP* v. 4.0b10 (SWOFFORD, 2002) e para as inferências Bayesianas utilizou-se o programa “MrBayes” v.3.1.2 (RONQUIST; HUELSENBECK, 2003) modelo GTR. As primeiras 100 mil árvores de um total de um milhão de combinações foram descartadas e os valores das probabilidades foram calculados pelo consenso de no mínimo 3 amostras. A espécie *Ixodes holocyclus* Neumann (AB051844) foi usada como grupo externo “outgroup”.

4.4 CICLO BIOLÓGICO

4.4.1 Obtenção da colônia de laboratório

Carrapatos adultos e imaturos, em diferentes instares ninfais, foram coletados em porões de residências nas áreas rurais do município de São Francisco de Paula, RS (29° 20' 00" S; 48° 30' 21" W), e enviados vivos ao Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan. Uma vez no laboratório, eles foram alimentados em cobaias e em coelhos (no interior de câmaras de contenção) para se observar qual o melhor hospedeiro experimental. Aquelas fêmeas alimentadas em cobaias fizeram posturas melhores (aproximadamente 50 ovos a mais) do que as alimentadas em coelhos. Dessa forma, as cobaias foram utilizadas como hospedeiros para alimentação de todos os estágios das duas gerações estudadas.

Após alimentação, os espécimes foram inicialmente mantidos em estufa B.O.D (estufa Biológica com Demanda de Oxigênio), à 27°C $\pm$ 1°C e 90% de umidade. Porém, verificou-se alta mortalidade e as poucas posturas resultaram em ovos inférteis. Assim, os espécimes foram retirados da estufa e deixados em temperatura ambiente. Isto ocorreu durante o verão e novamente as posturas foram inviáveis, pois todos os ovos fungaram.

As temperaturas médias registradas na região serrana do estado do Rio Grande do Sul, local de ocorrência de *O. brasiliensis*, são muito menores do que a média na cidade de São Paulo, onde foi desenvolvido este experimento. Por esta razão, optou-se por manter os carrapatos em estufa B.O.D. na temperatura de 20°C $\pm$ 1°C e 90% de umidade, disponibilizado pelo Laboratório de Parasitologia do Instituto Butantan. Observou-se uma sensível diminuição na mortalidade dos espécimes e todas as posturas obtidas foram viáveis. Essa foi então a temperatura padrão adotada na condução do presente estudo.

4.4.2 Parâmetros biológicos

O ciclo biológico de *Ornithodoros brasiliensis* foi acompanhado por duas gerações (larva a larva) utilizando cobaias *Cavia porcellus* L. (Rodentia: Caviidae) como hospedeiros para todos os estágios de *O. brasiliensis*.

Os animais foram fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan, mediante autorização cedida pelo Conselho de Ética para Uso e Experimentação Animal do IBU sob o número 076110, e Comissão de Ética no Uso de Animais da FMVZ/USP sob número 1976/2010.

Os hospedeiros de laboratório não tiveram contato prévio com carrapatos ou produtos carrapaticidas, e cada animal foi infestado uma única vez na etapa de alimentação, sendo posteriormente eutanasiados. Este procedimento minimizou as chances de desenvolvimento da resistência do hospedeiro ao carrapato, que poderiam interferir na ingestão normal de sangue e, conseqüentemente, alterar parâmetros biológicos a serem estudados.

As cobaias foram tricotomizadas na região do dorso, para facilitar a fixação dos carrapatos e sua visualização, sendo então anestesiadas com anestésico injetável intramuscular (Vetanarcol®), composto por cloridrato de Ketamina, na dosagem de 100 a 200 mg/Kg.

A anestesia se fez necessária para obtenção dos dados relativos aos períodos de pré-alimentação e alimentação, já que estes dados são coletados durante o repasto sanguíneo, e não seriam possíveis sem a imobilização do hospedeiro. Além disso, os animais sofrem menos estresse justamente pelo efeito da anestesia, que dura aproximadamente 1 hora, não sofrendo o prurido causado pela picada.

O número de carrapatos colocados em cada cobaia em uma infestação foi de até 80 exemplares, quando no estágio de ninfa de instar 1 a 4 (N1-N4), de menor tamanho, e de até 20 exemplares quando no estágio adulto ou ninfas no instar 5 (N5). Ao longo do presente experimento, um total de 20 cobaias foi empregado para a alimentação de todos os estágios ativos de *O. brasiliensis*.

As ninfas e os adultos foram acondicionados em placas de cultura de células com tampa, modelo de 6 poços, preenchidos com uma camada de areia autoclavada (em quantidade suficiente para permitir aos carrapatos se enterrarem) e com algodão estéril embebido em água para manter a umidade (Figura 3 a). Os espécimes eram retirados das estufas B.O.D. apenas na ocasião das alimentações, as quais foram realizadas no biotério do Laboratório de Parasitologia do IBU, local onde foram mantidas as cobaias empregadas neste experimento.

Na observação dos períodos de mudas das ninfas, as exuvias foram contadas e recolhidas diariamente, e os carrapatos recém-mudados transferidos para outra

placa. Os espécimes de cada instar ninfal foram mantidos juntos, mas a partir do terceiro instar, quando os exemplares alcançam tamanho maior, foi necessário dividi-los em dois ou mais poços da placa.

As fêmeas foram mantidas individualmente em poços identificados, para a observação da postura e contagem dos ovos. Estes foram contados diariamente, e transferidos para placas de Petri com pouca areia e algodão umedecido, para facilitar a observação da eclosão das larvas (Figura 3 b).

O período de jejum dos carrapatos (desde a ecdise até o momento de contato com o hospedeiro) foi estipulado entre 35 a 45 dias, aproximadamente, para cada instar ninfal e adultos.

Os adultos foram alimentados em casais e, imediatamente após o completo repasto sanguíneo, foram transferidos para placas de Petri e deixados para a cópula, permanecendo juntos por alguns dias.

Os pesos das fêmeas antes e depois do repasto sanguíneo, bem como das massas de ovos, foram obtidos em balança de precisão de quatro dígitos.

Figura 3 – a) Poços de placa de cultura, contendo os espécimes em areia autoclavada e algodão umedecido; b) ovos em placa de Petri com areia autoclavada.

Fonte: autor

Os índices de produção de ovos e de eficiência nutricional, respectivamente, IPO e IEN, foram calculados pela fórmula de Bennett (1974), expressa abaixo:

$$\text{IPO} = \text{peso da massa de ovos} / \text{peso da fêmea ingurgitada} \times 100$$

$$\text{IEN} = \text{peso da massa de ovos} / \text{peso da fêmea ingurgitada} - \text{peso residual} \times 100$$

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os parâmetros biológicos possíveis de comparação foram analisados estatisticamente conforme a normalidade dos dados, ou seja, para os dados que seguem uma distribuição normal, foram empregados testes paramétricos, como *test-t*. Testes não-paramétricos, como *Mann-Whitney*, foram implicados na análise para aqueles dados que possuem distribuição não normal ou livre.

4.6 INVESTIGAÇÃO E DIAGNÓSTICO DE RICKETTSIA

Para os estudos visando à investigação da presença de bactérias do gênero *Rickettsia* nos carrapatos, aproximadamente uma centena de exemplares de *O. brasiliensis* coletados em São Francisco de Paula foram congelados e posteriormente processados individualmente.

O DNA total foi extraído utilizando-se o Kit “DNEasy Tissue Kit” (Qiagen®), observando-se o protocolo para isolamento de DNA de insetos, fornecido pelo fabricante. As amostras foram eluídas em 70 µl de solução tampão TE, e congeladas à temperatura de -20 graus.

A presença de *Rickettsia* spp. nas amostras foi avaliada através da amplificação de um fragmento de 401 pb do gene citrato sintase (*gltA*), presente em todas as espécies de *Rickettsia*, utilizando-se um par de oligonucleotídeos iniciadores “primers”, denominados de CS-62 (GCA AGT ATC GGT GAG GAT GTA AT) e CS-462 (CTT CCT TAA AAT TCA ATA AAT CAG GAT G) (LABRUNA et al., 2004).

As amostras positivas foram submetidas à nova reação em cadeia da polimerase (PCR), que amplifica um fragmento de 532 pb apenas das riquetsias pertencentes ao Grupo da Febre Maculosa (GFM).

O gene *ompA* foi utilizado para a confirmação da infecção por *Rickettsia* spp. empregando-se o par de oligonucleotídeos iniciadores (REGNERY et al., 1991):

Rr190.70 (ATGGCGAATATTTCTCCAAAA) e

Rr190.602 (AGTGCAGCATTCGCTCCCCCT)

Em ambas as reações, foram utilizados controle negativo, composto de água miliq livre de DNA e controle positivo (DNA de *Rickettsia parkeri*, cepa NOD). O volume total para na reação de PCR foi de 50 µl por tubo de amostra, sendo 45 µl de mix e 5 µl de DNA. O mix para a reação de PCR contém 25,2 µl de água; 5 µl de

Dntp; 8 µl buffer; 1,5 µl de MgCl₂; 2,5 µl *primer* forward; 2,5 µl *primer* reverse; 0.3 µl Taq DNA polimerase.

A quantidade dos reagentes foi multiplicada de acordo com o número de amostras amplificadas em cada reação. A amplificação foi visualizada em gel de agarose a 1,5 %, utilizando 10 µl de produto de PCR e, posteriormente, foi corada em brometo de etídio.

A fim de minimizar o achado de falsos negativos na triagem feita para *Rickettsias* pela PCR do gene *gltA*, as amostras negativas foram submetidas a nova reação que amplifica um fragmento de 460 pb do gene 16s rRNA de carrapatos (MANGOLD, 1998), utilizando-se o par de *primers* 16s +1 (5'-CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG-3') e 16s -1 (5' -CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T-3').

As amostras positivas foram então purificadas com o produto comercial ExoSAP-IT (USB Corporation®) seguindo instruções do fabricante (3 µl de ExoSAP e 7,5 µl de DNA amplificado).

Para a reação de sequenciamento, foi utilizado o kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer), de acordo com especificações do fabricante, em sequenciador automático ABI 377 (Applied Biosystem, Foster, CA), disponível na FMVZ/USP.

5 RESULTADOS

5.1 CAPÍTULO 1: DESCRIÇÃO DA LARVA E REDESCRIÇÃO DE ADULTOS DE *Ornithodoros brasiliensis* ARAGÃO (ACARI: ARGASIDAE) E DESIGNAÇÃO DE NEÓTIPO

Os resultados deste capítulo foram publicados na Zootaxa e o artigo está apresentado no Anexo 1.

5.2. CAPÍTULO 2: CICLO BIOLÓGICO DE *Ornithodoros brasiliensis* ARAGÃO (ACARI: ARGASIDAE) EM CONDIÇÕES DE LABORATÓRIO E INVESTIGAÇÃO DA PRESENÇA DE *RICKETTSIA* EM CARRAPATOS COLETADOS.

Uma fêmea oriunda do campo realizou postura de 125 ovos, os quais foram viáveis em sua totalidade, dando origem à geração F1. As larvas que eclodiram mudaram para o primeiro instar ninfal (N1) em cerca de 10 dias nas duas gerações. A espécie *O. brasiliensis* apresentou um total de 5 instares ninfais (Quadro 1), com adultos emergindo a partir do terceiro instar em F1 e F2 (Tabela 1). Os parâmetros biológicos para cada instar ninfal estão descritos abaixo.

5.2.1. Parâmetros das ninfas da geração f1

Os dados relativos às ninfas da geração F1 encontram-se reunidos no Quadro 1

As 125 ninfas de primeiro instar (N1) permaneceram em jejum por 35 a 45 dias (tempo pré-estipulado para todos os instares ninfais e adultos), sendo então colocadas nos hospedeiros. Os tempos de pré-fixação e alimentação das N1 variaram de 1 a 7 minutos (média = $2,5 \pm 1,7$) e de 17 a 41 minutos (média = $26,7 \pm 7$), respectivamente. Todas as N1 se alimentaram, porém 9 exemplares morreram antes da muda enquanto que 116 (93%) realizaram ecdise para o instar seguinte (N2). O tempo de pré-ecdise variou de 32 a 45 dias (média = $33,3 \pm 4$), e o intervalo de mudas (primeira a última muda) foi de 13 dias.

As 116 ninfas de 2º instar (N2) foram alimentadas após o período de jejum, conforme descrito acima. Os tempos médios de pré-fixação e alimentação observados variou de 1 a 4 minutos (média = $1,7 \pm 1$) e 15 a 39 minutos (média = $26,1 \pm 7$) respectivamente. Do total, 114 (98%) realizaram ecdise para o instar seguinte (N3) e 2 exemplares morreram antes da muda. O tempo médio de pré-ecdise foi de 36 a 47 dias (média = $33,3 \pm 4$) e o intervalo de muda foi de 11 dias (Tabela 1).

As 114 N3 foram alimentadas (respeitando-se os 35-45 dias de jejum). Os tempos médios de pré-fixação e alimentação variaram de 1 a 2 minutos (média= $1,3 \pm 0,4$) e 18 a 39 minutos (média= $25,9 \pm 6$), respectivamente. Sete exemplares (6%) morreram antes da muda e 57 (53,2%) mudaram para N4, havendo a emergência concomitante de adultos, sendo 23 machos (21,4%) e 27 fêmeas (25,2%). O período médio de pré-ecdise foi de 28 a 42 dias ($31,1 \pm 3,4$) e o intervalo de mudas durou 14 dias.

As 57 ninfas N4 foram então alimentadas, mas 3 morreram sem efetuar ecdise. Os tempos médios de pré-fixação e alimentação foram de 1 a 15 minutos (média = $3,5 \pm 3,5$) e 17 a 46 minutos (média= $26,7 \pm 7$), respectivamente. O tempo médio de pré-muda foi de 31 a 43 dias (média= $34,8 \pm 3,3$) e o intervalo de muda foi de 12 dias para este instar. Das 54 que se alimentaram, 7 mudaram para o 5ª instar (13%), e o restante mudou para 15 machos (27%) e 32 fêmeas (56%).

As 7 N5 alimentadas originaram 6 fêmeas, representando 85,7% do total. Uma morreu antes de completar ecdise. Os tempos de pré-fixação e alimentação foram de 2 a 5 minutos (média= $3,7 \pm 1,4$) e 23 a 48 minutos ($35,1 \pm 9$). O tempo médio de pré-muda foi de 35 a 41 dias ($37,2 \pm 2,4$) e o intervalo de muda 6 dias.

A geração F1 originou 45 machos e 65 fêmeas, totalizando 110 espécimes adultos. Deste total, 9 fêmeas e 9 machos foram escolhidos aleatoriamente, para obtenção dos parâmetros de adultos, dando continuidade à próxima geração (F2).

5.2.2. Parâmetros das ninfas da geração f2

Os dados relativos às ninfas da segunda geração estão apresentados na Tabela 1.

Para o estudo da geração F2, 137 larvas obtidas da postura de uma fêmea (F1) mudaram para ninfas de 1º instar (N1).

Respeitado o tempo de jejum, todas as 137 N1 foram alimentadas. Destas, 122 (89%) realizaram ecdise para o instar seguinte (N2), com mortalidade de 15 (11%) exemplares. O período de pré-fixação das N1 variou de 1 a 4 minutos (média = $1,8 \pm 1$), enquanto que o tempo de alimentação foi de 16 a 40 minutos (média = $25,2 \pm 7$). Estes parâmetros não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) entre as gerações F1 e F2.

O período de pré-ecdise ninfal (de N1 para N2) variou de 29 a 40 dias (média = $32,5 \pm 3,3$), havendo diferença estatística significativa ($p < 0,05$) neste parâmetro entre as duas gerações. O intervalo de mudas foi de 11 dias.

Todas as 122 ninfas de 2º instar (N2) foram alimentadas e realizaram ecdise para N3. Os tempos de pré-fixação e alimentação foram de 1 a 2 minutos (média = $1,2 \pm 0,4$) e 17 a 49 minutos (média = 26 ± 8). Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) neste parâmetro entre as gerações F1 e F2. O tempo de pré-ecdise ninfal foi de 34 a 44 dias (média = $37,5 \pm 2,5$). Os testes estatísticos apontaram diferença significativa ($p < 0,05$) entre as gerações. O intervalo de mudas foi de 10 dias.

As 122 N3 foram alimentadas, e 5 (4%) espécimes morreram sem completar a ecdise. Vinte e nove (23,7%) mudaram para ninfas de 4º instar (N4), havendo a emergência de adultos, sendo 34 machos (27,8%) e 54 fêmeas (44,2%). Os tempos médios de pré-fixação e alimentação foram 1 a 2 minutos (média = $1,2 \pm 0,4$) e 17 a 49 minutos (média = $28,5 \pm 8$), respectivamente. Não houve diferença estatística significativa ($p > 0,005$) entre F1 e F2. O período médio de pré-ecdise foi de 31 a 37 dias ($34,6 \pm 3,2$), havendo diferença significativa ($p < 0,005$) entre as gerações. O intervalo de mudas foi de 12 dias.

As 29 ninfas N4 foram então alimentadas, e 3 (10%) morreram sem concluir a ecdise. Duas (7%) mudaram para o 5ª instar ninfal (N5) e o restante mudou para 7 machos (24%) e 18 fêmeas (62%).

Os tempos médios de pré-fixação e alimentação foram de 1 a 6 minutos (média = $3,2 \pm 1,4$) e de 19 a 54 minutos (média = $30,2 \pm 9$), respectivamente. Não houve diferença significativa entre as gerações. O tempo médio de pré-muda foi de 34 a 42 dias ($36,5 \pm 2,5$), havendo diferença estatística significativa entre as gerações. O intervalo de mudas foi de 19 dias.

As 2 ninfas de 5^o instar (N5) foram então alimentadas, dando origem a 2 fêmeas. O tempo de pré-fixação foi de 3 minutos, e o de alimentação foi de 31 e 39 minutos (média= 35 ± 6). O tempo médio de pré-mudas foi de 32 a 33 dias (média= $32,5 \pm 0,7$), e o período de mudas de 1 dia.

A geração F2 originou 41 machos e 88 fêmeas, totalizando 129 espécimes adultos. Deste total, 8 fêmeas e 8 machos foram escolhidos aleatoriamente, para obtenção dos parâmetros de adultos da segunda geração.

Quadro 1 – Parâmetros biológicos dos instares ninfas I – V, das gerações F1 e F2.

Instar Ninfal	Geração	Pré-alimentação (min.) (amplitude) N	Alimentação (min.) (amplitude) N	Pré-ecdise (dias) (amplitude) N	Muda (dias) (amplitude) N	Ecdise (%) N	Muda dos adultos
Ninfa 1	F1	$2,5 \pm 1,7$ (1 - 7) 30	$26,7^a \pm 7$ (17 - 41) 30	$33,3^a \pm 4$ (32 - 45) 116	13	93% (116) 125	-
	F2	$1,8 \pm 1$ (1 - 4) 30	$25,2^a \pm 7$ (16 - 40) 30	$32,5^b \pm 3,3$ (29 - 40) 122	11	89% (122) 137	-
Ninfa 2	F1	$1,7 \pm 1$ (1 - 4) 30	$26,1^a \pm 7$ (15 - 39) 30	$38,6^a \pm 2,5$ (36 - 47) 114	11	98% (114) 116	-
	F2	$1,2 \pm 0,4$ (1 - 2) 30	$26^a \pm 8$ (17 - 49) 30	$37,5^b \pm 2,5$ (34 - 44) 122	10	100% (122)	-
Ninfa 3	F1	$1,3 \pm 0,4$ (1 - 2) 30	$25,9^a \pm 6$ (18 - 39) 30	$31,1^a \pm 3,4$ (28 - 42) 104	14	91% (107) 114	23 ♂ e 27 ♀
	F2	$1,2 \pm 0,4$ (1 - 2) 30	$28,5^a \pm 8$ (17 - 49) 30	$34,6^b \pm 3,2$ (31 - 37) 117	12	96% (117) 122	34 ♂ e 54 ♀
Ninfa 4	F1	$3,5 \pm 3,5$ (1 - 15) 30	$26,7^a \pm 7$ (17 - 46) 30	$34,8^a \pm 3,3$ (31 - 43) 54	12	95% (54) 57	15 ♂ e 32 ♀
	F2	$3,2 \pm 1,4$ (1 - 6) 29	$30,2^b \pm 9$ (19 - 54) 29	$36,5^b \pm 2,5$ (34 - 42) 29	8	93% (27) 29	7 ♂ e 18 ♀
Ninfa 5	F1	$3,7 \pm 1,4$ (2 - 5) 7	$35,1 \pm 9$ (23 - 48) 7	$37,2^a \pm 2,4$ (35 - 41) 6	6	86% (6) 7	6 ♀
	F2	3 ± 0 (3 - 3) 2	35 ± 6 (31 - 39) 2	$32,5^b \pm 0,7$ (32 - 33) 2	2	100% (2)	2 ♀

a: Valores das colunas (comparação entre N1 e N2), seguidos de letras iguais não difere entre si pelo teste Teste t $p > 0,05$

5.2.3. Parâmetros dos adultos da geração f1

Os dados relativos aos adultos da geração F1 encontram-se reunidos na Tabela 2.

Os parâmetros biológicos foram coletados apenas das fêmeas, já que parte dos machos não se alimentou. Em algumas fêmeas, a postura dos ovos não ocorreu de forma contínua do primeiro ao último dia, havendo pequenas interrupções de um há até alguns dias.

No total, 9 fêmeas oriundas das ninfas da primeira geração (F1) foram escolhidas aleatoriamente para a observação dos parâmetros biológicos.

O peso médio de pré-alimentação e pós-alimentação das fêmeas foi de $39,3\text{mg} \pm 14,7$ (25,8 - 61,4) e $223,8\text{mg} \pm 100,3$ (124,4 - 362,2), respectivamente. Os tempos de pré-postura e de postura dos ovos variou de 31 a 117 dias (média= $76,7 \pm 27,1$) e 10 a 24 dias (média= $15,5 \pm 5,36$). Em algumas fêmeas, a postura dos ovos não ocorreu de forma contínua, ocorrendo pequenas interrupções de 1 há até alguns dias. O número de ovos variou de 53 a 197 (média= $129,2 \pm 54,4$) e o peso médio da massa de ovos $86,4\text{mg} \pm 42,2$ (33,8 - 152,2). O período de incubação dos ovos variou de 16 a 31 dias (média= $25,7 \pm 4,86$), com uma média de eclosão dos ovos de $78,6\% \pm 17,9$ (41 - 94). Os índices médios de Produção de Ovos (IPO) e de Eficiência Nutricional (IEN) foram de $38,2 \pm 10,8$ (24 - 58,7) e $68,3 \pm 24$ e $57,8 \pm 10,2$ (42 - 72).

Uma fêmea morreu alguns dias após completar a oviposição..

Para a avaliação dos parâmetros biológicos no 2º ciclo gonotrófico, 8 fêmeas foram novamente alimentadas entre 35 a 45 dias e separadas em 2 grupos; 5 foram novamente reunidas em casais, e 3 foram mantidas sem a presença do macho. No grupo de fêmeas sem a cópula, não houve nova postura de ovos, enquanto que das fêmeas que voltaram a acasalar, 4 espécimes fizeram novas posturas. Os parâmetros do 2º ciclo gonotrófico da 1ª geração (F1) são expostos a seguir:

O peso médio de pré-alimentação e pós-alimentação das fêmeas foi de $67,7\text{mg} \pm 22,1$ (46,8 - 86,2) e $272\text{mg} \pm 117,6$ (183,7 - 442,5), respectivamente. Após a alimentação, os tempos de pré-postura e de postura dos ovos variou de 70 a 73 dias (média= $71,5 \pm 1,3$) e 15 a 28 dias (média= $22,5 \pm 5,45$). O número de ovos por fêmea foi de 53 a 123 (média= 81 ± 33). Nenhum dos parâmetros acima apresentou diferença significativa nos testes estatísticos com os adultos do 1º ciclo gonotrófico.

O peso médio da massa de ovos foi de $39\text{mg} \pm 14,8$ (28,2 – 60,4), e o período de incubação dos ovos variou de 29 a 38 dias (média= $33,5 \pm 3,69$), apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) com igual parâmetro em F1. A média de eclosão de larvas foi de $56,6\% \pm 17,9$ (32 – 75). As médias do Índice de Produção de Ovos (IPO) foram de $16,6 \pm 9,5$ (2 – 29) e o de Eficiência Nutricional (IEN) $68,3 \pm 24$ (46,5 – 124,7). Ambas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) no teste estatístico, comparadas com o 1º ciclo gonotrófico.

Tabela 1 – Parâmetros biológicos de Fêmeas

	F1		F2	
ciclo gonotrófico	1	2	1	2
nº de fêmeas	9	4	8	3
Peso antes da alimentação (mg)	$39,03^a \pm 14,7$ (25,8-61,4)	$67,07^a \pm 22,1$ (46,8-86,2)	$39,15^a \pm 11$ (29-61,4)	$50,3^a \pm 7,81$ (45,3-59,3)
Peso pós-alimentação (mg)	$223,8^a \pm 100,3$ (124,4-362,2)	$272,1^a \pm 117,6$ (183,7-442,5)	$224,1^a \pm 7$ (118,6-291,2)	$210,67^a \pm 18,90$ (161,1-272,5)
Tempo médio pré-postura (dias)	$76,7^a \pm 27$ (31-117)	$71,5^a \pm 1,3$ (70-73)	$54,1^a \pm 8,7$ (40-65)	$72,6^b \pm 2$ (71-75)
Tempo médio de postura (dias)	$15,5^a \pm 5,36$ (10-24)	$22,5^a \pm 5,45$ (15-28)	$15,8^a \pm 8,9$ (7-36)	$9^a \pm 9,5$ (3-20)
Número médio de ovos	$129,2^a \pm 54,47$ (53-197)	81 ± 33^a (53-123)	$148,87^b \pm 28,69$ (96-179)	$66,33^a \pm 17,1$ (55-86)
Peso massa de ovos (mg)	$86,04^b \pm 42,2$ (33,8-152,2)	$39^a \pm 14,8$ (28,2-60,4)	$99,8^b \pm 11$ (89-115)	$34,4^a \pm 12,5$ (22-47)
IPO (%)	$38,2^b \pm 10,8$ (24-58,7)	$30,9^a \pm 22,8$ (14,6-63,7)	$48,6^b \pm 14,3$ (36-75)	$17,2^a \pm 5$ (11-21)
IEN (%)	$57,8^b \pm 10,2$ (42-72)	$21,5^a \pm 8,8$ (10,6-31)	$63,8^b \pm 18$ (47,7-94,9)	$28^a \pm 6,3$ (22-27,5)
Período de Incubação	$25,7 \pm 4,8$ (16-31)	$33,5 \pm 3,69$ (29-38)	$26,7 \pm 3,54$ (23-33)	$24,3 \pm 8$ (15-30)
Porcentagem de eclosão (%)	$78,64^b \pm 17,91$ (41-94)	$56^a \pm 17,91$ (32-75)	$78,71^a \pm 12,96$ (63-96)	$64,66^a \pm 43,84$ (15-98)

a: valores nas linhas (comparação entre ciclo gonotróficos), seguidos de letras iguais não diferem entre si pelo teste Test-t: $p > 0,05$

5.2.4. Parâmetros dos adultos da geração f2

Os dados relativos aos adultos da segunda geração (F2) encontram-se reunidos na Tabela 2.

Um total de 8 fêmeas originadas das ninfas da geração F2 foram escolhidas aleatoriamente e seus parâmetros biológicos acompanhados.

O peso médio inicial das fêmeas, antes da alimentação, foi de $39\text{mg} \pm 11$ (29 – 61,4), e pós-alimentação 224 ± 75 (118,6 – 291,2). Os tempos médios de pré-postura e de postura foram de $54 \pm 8,7$ dias (40 – 65) e $15,8 \pm 8,9$ dias (7-36), respectivamente. O número médio de ovos foi de $148,8 \pm 28,6$ (96 – 179), e o peso médio dos ovos variou de $99,8\text{mg} \pm 11$ (89 – 115). Assim como observado na geração anterior (F1), as fêmeas fizeram pequenas interrupções durante a postura, de 1 dia ou mais, retomando em seguida. O período de incubação variou de 23 a 33

dias (média= $26,7 \pm 3,5$), e as médias de eclosão dos ovos foram de $78,7 \pm 12$ (63 – 96). Os Índices de Produção de Ovos (IPO) e Eficiência Nutricional tiveram média de $48,6 \pm 14,3$ (36 – 75) e $63,8 \pm 18$ (47,7 – 94), respectivamente.

Uma fêmea morreu alguns dias após completar a oviposição.

Os parâmetros biológicos das fêmeas no 2º ciclo gonotrófico foram estudados utilizando-se 7 fêmeas alimentadas entre 35 a 45 de jejum, divididas em 2 grupos; 3 não foram colocadas na presença de machos, e 4 foram dispostas em casais logo após o repasto. As fêmeas que não tiveram contato com machos após alimentação não realizaram postura, e 3 exemplares do segundo grupo realizaram nova postura. Os parâmetros observados seguem abaixo:

Os pesos pré-alimentação e pós-alimentação foram de $50,3\text{mg} \pm 7,8$ (45,3 – 59,3) e $210,6\text{mg} \pm 18,9$ (161 – 272,5), respectivamente. Não tiveram diferença significativa ($p < 0,05$) com iguais parâmetros do 1º ciclo gonotrófico. O tempo médio de pré-postura foi de $72,6 \pm 2$ (71 – 75) dias, apresentando diferença significativa ($p < 0,05$) com o mesmo parâmetro no ciclo anterior. O tempo médio de postura variou de $9 \pm 9,5$ (3 – 20). O número de ovos foi de 55 a 86 (média= $66,3 \pm 17$), e o peso médio das massas de ovos $34,4\text{mg} \pm 12,5$ (22-47). O período de incubação foi de $24,3 \pm 8$ (15 – 30), e a taxa média de eclosão dos ovos foi $64,6 \pm 43,8$ (15 – 98).

6. PESQUISA DE *RICKETTSIA*

No total, 107 carrapatos foram testados para a presença de DNA de *Rickettsia* pela técnica da PCR, e destes, 12 foram positivos para o gene *gltA*., sendo então submetidas à nova PCR para o gene *ompA*, onde todos foram negativos.

Quatro amostras foram submetidas ao sequenciamento gênico, para análises de homologia com o banco de dados do GenBank. O pareamento pelo Blast apresentou similaridade de 98% com 2 cepas de *Rickettsia*, a primeira denominada RDa420 (AF497584) oriunda de *Dermacentor auratus* do Vietnã., e uma cepa brasileira de *Rickettsia bellii* (DQ865204) isolada de *Haemaphysalis justakochi*, do Estado de São Paulo.

7 DISCUSSÃO

7.1 SITUAÇÃO TAXONÔMICA

A maioria das espécies conhecidas para o Brasil (associadas principalmente a morcegos) reúnem características morfológicas nos adultos, tais como presença de bochechas, tarsos sem protuberâncias dorsais, e ausência de espinhos no primeiro artículo dos palpos das larvas, entre outras, que são distintas de *O. brasiliensis* (BARROS-BATTESTI et al., 2011, 2012).

Clifford et al. (1964) desconheciam a larva de *O. brasiliensis*, mesmo assim incluíram esta espécie em *Pavlovskyella* devido à morfologia dos carrapatos adultos e dos seus hábitos. A presença de protuberâncias dorsais nos tarsos de *O. brasiliensis*, ausência de bochechas e presença de sulcos dorsoventral, pré-anal e pós-anal transverso, bem como, o comportamento biológico (de se enterrar no solo e se alimentar em diferentes animais, incluindo o homem), foram características determinantes para sua inclusão em *Pavlovskyella* por Clifford et al. (1964) (Anexo 1). Essas características também são comuns à *O. rostratus* e *O. turicata* (ARAGÃO, 1931), bem como à *O. nattereri*, embora esta última espécie nunca mais tenha sido encontrada desde sua descrição (GUGLIELMONE et al., 2003).

No entanto, as espécies de *Ornithodoros* que não se alimentam no estágio larval e mudam para o primeiro instar ninfal, não apresentam placa dorsal na larva entre outros caracteres morfológicos, foram agrupadas por Clifford et al. (1964) no subgênero *Ornithodoros*. As espécies relacionadas a este grupo foram: *O. savignyi* (Audouin), *O. moubata* (Murray), *O. compactus* Walton, *O. apertus* Walton, *O. porcinus* Walton, *O. eremicus* Cooley & Kohls e *O. procaviae* Teodor & Costa. Esta característica biológica é também compartilhada pela larva de *O. brasiliensis*. Embora a placa dorsal na larva seja muito difícil de ser visualizada, ela certamente está presente nesta espécie, assim como os espinhos no ângulo interno dorsal do artículo I do palpo.

Barros-Battesti et al. (2012) verificaram que *O. brasiliensis* possui características morfológicas e biológicas semelhantes aos dois subgêneros acima. Este fato foi também evidenciado para muitas espécies de *Ornithodoros* que não se

enquadram totalmente nos subgêneros propostos e por isso eles deixaram de ser válidos (NAVA et al., 2010).

Mais detalhes da discussão morfológica e filogenética de *O. brasiliensis* estão demonstrados no Anexo 1.

7.2 CICLO BIOLÓGICO E INVESTIGAÇÃO DE *RICKETTSIA*

Com relação aos aspectos da biologia, o comprimento do ciclo biológico de *O. brasiliensis* observado no presente estudo foi maior do que aquele obtido por Davis (1952). Entretanto, alguns aspectos não foram evidenciados por esse autor, como por exemplo, os períodos de jejum entre as alimentações e o tempo de incubação dos ovos.

A eclosão das larvas de *O. brasiliensis* e as mudas para N1 sem alimentação, ocorreram em sua totalidade para as duas gerações estudadas neste experimento, não havendo diferença entre as gerações. Embora Davis (1952) tenha obtido apenas uma geração de *O. brasiliensis*, ele reportou que somente duas fêmeas fizeram posturas e de uma delas eclodiram apenas 3 larvas enquanto que de outra foram 110. Ainda de acordo com esse autor, quando essas larvas foram colocadas em ratos brancos, elas tiveram um comportamento de baixa atividade e algumas chegaram a fixar e ingerir pequena quantidade de sangue, mas nenhuma se tornou totalmente repleta. Este fato não foi observado no presente estudo. No entanto, Davis (1952) verificou também que as larvas que não se alimentaram mudaram normalmente para N1, evidenciando que a ausência de repasto sanguíneo neste estágio não comprometeu a ecdise para o primeiro instar ninfal.

O número máximo de ínstaes ninfais que foi observado neste estudo foi de 5, e uma vez iniciada a muda, todos os espécimes daquele instar mudaram num intervalo entre uma e duas semanas. Houve diferença significativa ($p < 0.05$) entre as gerações F1 e F2 para este parâmetro, e embora as médias tenham sido numericamente próximas, sendo maiores em F1.

O número máximo de ínstaes ninfais observado para *O. rostratus* foi de 6 com adultos emergindo a partir de N3. Há predominância de machos emergindo de N3 e N4, e as fêmeas predominam a partir de N5. Mas, a maioria dos adultos emerge de N5 e somente poucas ninfas mudam para N6. As mudas para esta espécie são sempre precedidas de repasto sanguíneo, porém alguns ínstaes ninfais

requerem mais de uma alimentação para mudarem ao instar seguinte. Excluindo os períodos de jejum antes das alimentações, o ciclo de vida de *O. rostratus* (de fêmea a fêmea) obtido de uma geração estudada recentemente, levou em média 60,1 a 135,4 dias (dados não publicados).

O ciclo biológico de *O. brasiliensis* (ovo a adulto, única geração) realizado nos anos 50, utilizando ratos brancos como hospedeiros, levou um total de 103 e 184 dias de amplitude. Davis (1952) obteve um máximo de 7 ínstaes ninfais e a emergência de adultos iniciou a partir da muda de N4, estando os machos em maior proporção que as fêmeas.

No presente estudo, na geração F1, fêmeas e machos emergiram igualmente a partir de N3, porém, houve predomínio de fêmeas emergindo de N4 e N5. Na segunda geração, as fêmeas foram significativamente mais abundantes que machos já a partir de N3.

O ciclo biológico completo (ovo a ovo) obtido nas duas gerações de *O. brasiliensis*, levou em média 215,4 dias (F1) e 195 dias (F2). Já os tempos de pré-ecdise entre os diferentes ínstaes ninfais, bem como de incubação dos ovos, foram maiores do que aqueles observados por Davis (1952).

Com exceção das larvas, todos os ínstaes ninfais e adultos necessitaram de repasto sanguíneo antes das mudas e oviposição, nas duas gerações. Normalmente, os ínstaes ninfais dos argasídeos necessitam de repastos sanguíneos antes de cada ecdise, mas existem espécies de *Ornithodoros*, por exemplo, *O. amblus* e *O. mimon*, que realizam a muda para o segundo instar ninfal (N2) sem alimentação (KHAN; SRIVASTAVA, 1988, SONENSHINE, 1991; LANDULFO et al., 2012).

Hoogstraal (1985) mencionou que o hospedeiro pode influenciar no tempo de alimentação das larvas de espécies que necessitam de repasto sanguíneo neste estágio. Embora as larvas de *O. brasiliensis* não se alimentem, a escolha do hospedeiro influenciou na postura. No início do presente estudo, quando coelhos e cobaias foram utilizados como hospedeiros para os adultos, foi verificado que houve diferença na produção de ovos. As fêmeas que se alimentaram em cobaias produziram mais ovos (cerca de 50 ovos a mais) do que aquelas alimentadas em coelhos.

LANDULFO et al. (2012) verificaram que roedores de laboratório foram melhores hospedeiros para *O. mimon*. As larvas da geração F1 alimentadas em

roedor tiveram sucesso de ingurgitamento duas vezes maior que aquelas alimentadas em coelho. Já na geração F2, o sucesso de ingurgitamento obtido de larvas alimentadas em roedor foi menor em comparação à primeira geração. Porém, considerando este hospedeiro, os autores relataram que o sucesso de recuperação das larvas de *O. mimon* foi quatro vezes maior quando comparado aos obtidos por Schumaker e Barros (1995) para *O. talaje*. Esta espécie teve seu ciclo biológico realizado em *Gallus gallus* porque o sucesso de recuperação de larvas alimentadas em roedores foi muito baixo.

Segundo Venzal et al. (2008), um complexo de espécies formam o táxon *O. talaje*, cujas populações se distribuem desde o Sul dos Estados Unidos, México, Guatemala até a Argentina. Estes autores, no entanto, mencionaram que outras espécies podem estar equivocadamente classificadas neste táxon. Considerando o comportamento biológico e a proximidade das espécies que compõem o complexo “*O. talaje*”, bem como a localidade de procedência da colônia reportada por Schumaker e Barros (1995), é possível que a biologia estudada tenha sido de outra espécie (VENZAL et al., 2008).

De qualquer forma, o grupo formado por espécies que se alimentam principalmente em morcegos na natureza, como é o caso de *O. talaje* e *O. mimon*, possui comportamento biológico bastante distinto do grupo que inclui *O. brasiliensis*, *O. rostratus*, *O. turicata*, entre outras espécies, cujas larvas não se alimentam ou alimentam-se rapidamente.

No caso de *O. rostratus*, uma espécie que parasita diferentes mamíferos na natureza, as larvas necessitam de um repasto sanguíneo rápido (de algumas horas), antes da muda. De fato, as larvas daquelas espécies que parasitam mamíferos terrestres tendem a uma alimentação rápida, como por exemplo, *O. turicata* (BECK et al., 1986) e *O. erraticus* (Lucas, 1849) (SHOURA, 1987). Por outro lado, aquelas que parasitam aves e morcegos (que correspondem à maioria das espécies conhecidas), como *O. kelleyi* Cooley & Kohls, 1941 (SONENSHINE; ANASTOS, 1960), *O. amblus* Chamberli, 1920 (KHALIL; HOOGSTRAAL, 1981), *O. talaje* e *O. mimon*, as larvas requerem vários dias para realizarem o repasto sanguíneo.

Em relação aos períodos de alimentação e pré-ecdise, bem como, número de instares ninfais, *O. brasiliensis* se comportou semelhantemente às espécies *O. rostratus* e *O. turicata* (BRUMPT, 1915, BECK et al., 1986, HADANI; GUGLIELMONE, 1994). A alimentação rápida e períodos de pré-ecdise longos são

também comuns a outras espécies que foram reunidas no subgênero *Pavlovskyella* (CLIFFORD et al., 1964).

Vial (2009) reportou que os ínstaes ninfais de um carrapato argasídeo pode variar de 3 a 9, com exceção de *Otobius lagophilus* Cooley & Kohls, 1940, que possui somente um único instar ninfal (BACHA, 1957). Já *O. megnini* pode ter mais de 2 ínstaes (NAVA et al., 2009). Por outro lado, adultos de *O. mimon* começam emergir a partir de N2 e o número máximo de instar é 3 (LANDULFO et al., 2012). A espécie *A. neghmei* possui 3 ínstaes ninfais, enquanto que *O. talaje*, *O. erraticus* e *O. amblus* possuem 4, 5 e 6 ínstaes, respectivamente (KHALIL;HOOGSTRAAL, 1981, SHOURA, 1987, SCHUMAKER; BARROS, 1995, GONZÁLEZ-ACUÑA et al., 2010).

Com relação à investigação da presença de *Rickettsia*, as sequências obtidas no presente estudo, quando comparadas àquelas depositadas no Genbank, mostraram similaridade de 98% com uma cepa de *Rickettsia* RDa420 (AF497584) oriunda de *Dermacentor auratus* do Vietnã (PAROLA et al., 2003). Igualmente, houve similaridade na proporção de 98% com uma cepa brasileira de *Rickettsia bellii* (DQ865204) isolada por Labruna et al. (2007) de *Haemaphysalis justakochi* do Estado de São Paulo. Até então, nenhuma espécie de argasídeo do continente americano havia sido reportada com infecção natural por esta bactéria.

Assim, o encontro de uma *Rickettsia* próxima a uma espécie asiática e à *R. bellii*, embora não pertença ao grupo da Febre Maculosa e sua patogenicidade seja ainda desconhecida, se trata de um primeiro relato da presença de infecção por *Rickettsia* em argasídeo no Brasil..

Por outro lado, o gênero *Ornithodoros* possui diversas espécies envolvidas na transmissão de microrganismos causadores de doenças, principalmente bactérias do gênero *Borrelia* Swellengrebel, 1907. Embora Davis (1952) tenha descrito *B. brasiliensis* do sangue dos hospedeiros utilizados na alimentação de *O. brasiliensis*, a borrelia nunca mais foi encontrada. Os espécimes coletados recentemente, quando investigados para este agente, foram sempre negativos pela PCR.

Recentemente espécimes de *O. rostratus* foram encontrados naturalmente infectados por *Coxiella* (ALMEIDA et al., 2012). Os autores sugeriram que se trata de um endossimbionte devido à alta taxa de infecção (100%) dos ovos testados.

Considerando o parasitismo em humanos, *O. brasiliensis* é uma espécie bastante agressiva e suas picadas causam lesões dolorosas na pele, além de febre (MARTINS et al. (2011), assim como *O. rostratus* (ALMEIDA et al. 2012).

Estrada-Peña e Jongejan (1999) mencionaram que as espécies mais frequentemente citadas são *O. moubata* (Murray, 1877), *O. parkeri* Cooley, 1936, *O. hermsi*, *O. capensis*, *O. kelleyi* e *O. erraticus* (HOOGSTRAAL et al., 1976, VARGAS, 1984, ESTRADA-PEÑA; JONGEJAN, 1999).

Segundo Jongejan e Uilenberg (2004) as espécies *Argas reflexus* (Fabricius, 1794), *Argas vespertilionis* (Latreille, 1796) e *Argas monolakensis* Schwan, Corwin & Brown, 1992 são também bastante agressivos aos humanos e aos animais de criação, sendo a última, transmissora do vírus Mono Lake (ESTRADA-PEÑA; JONGEJAN, 1999). No gênero *Otobius*, *O. megnini* é a espécie de maior importância, pois a larva e as ninfas parasitam uma grande variedade de mamíferos domésticos, como gado, ovelha, caprino, cão e cavalo, além de humanos (EADS; CAMPOS, 1984, ESTRADA-PEÑA; JONGEJAN, 1999, NAVA et al., 2009).

8 CONCLUSÕES

- A larva de *O. brasiliensis* muda para o primeiro instar ninfal sem alimentação.
- Todos os instares ninfais e adultos de *O. brasiliensis* necessitam de um repasto sanguíneo antes das mudas e oviposição.
- Presença de no máximo 5 instares ninfais para *O. brasiliensis* com machos e fêmeas emergindo proporcionalmente a partir de N3 e com predominância de fêmeas a partir de N4, na primeira geração.
- A emergência de fêmeas de *O. brasiliensis* foi maior já a partir de N3 na segunda geração.
- O ciclo biológico de *O. brasiliensis* (de ovo a ovo) se completou entre 195 e 215,4 dias, em condições de laboratório, utilizando cobaia como hospedeiro, excluindo-se os períodos de jejum.
- Foi constatada pela primeira vez a presença de infecção por *Rickettsia* em uma espécie de argasídeo do Brasil.
- A espécie de *Rickettsia* encontrada em *O. brasiliensis* possui 98% de similaridade com uma *Rickettsia* asiática e com *R. bellii* do Brasil, cepa oriunda de *H. juxtakochi*.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMEIDA, A. P.; MARCILI, A.; LEITE, R. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; DOMINGUES, L. N.; MARTINS, J. R.; LABRUNA, M. B. Coxiella symbiont in the tick *Ornithodoros rostratus* (Acari: Argasidae). **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 3, n. 4, p. 203-206, 2012.

ARAGÃO, H. B. Algumas novas espécies de carrapatos brasileiros. **Brazil Médico**, v. 22, p. 111-115, 1908.

ARAGÃO, H. B. Notas sobre ixódidas brasileiros. **Memórias do Insitituto Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 145-195, 1911.

ARAGÃO, H. B. Comissão de Linhas Telegráficas Estratégicas de Matto-Grosso ao Amazonas, **Zoologia Ixodidas**, v. 36, n. 5, p. 1-19, 1916.

ARAGÃO, H. B. O. brasiliensis n. sp. **Brasil Médico**. v 37. p. 20, 1923.

ARAGÃO, H. B. Notas sobre os *Ornithodoros rostratus*, *brasiliensis* e *turicata*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 25, p. 227-231, 1931.

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de algunos paizes limitrophes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 31, p. 759-843, 1936.

ARAGÃO, H. B.; FONSECA, F. Notas de ixodologia. VIII. Lista e chave para os representantes da fauna brasileira. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 59, p. 115-129, 1961.

BACHA, W. J. W. J. The life history of *Otobius lagophilus*. **Parasitology Research**, v. 43, n. 5, p. 560-565, 1957.

BALASHOV, Y. S. Bloodsucking ticks (Ixodoidea) - Vectors of diseases of man and animals. **Miscellaneous Publications of the Entomological Society of America**, v. 8, p. 160-376, 1972.

BENNETT, G. F. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae). I.

Influence of tick size on egg production. **Acarologia**, v.16, n. 1, p. 52 – 61, 1974.

BANKS, N. New American mites. **Proceedings of Entomological Society of Washington**, v. 14, p. 96-99, 1912.

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: Projeto Vox/ICTTD-3/Butantan, 2006. 223 p

BARROS-BATTESTI, D. M.; HERNÁNDEZ, M. R.; FAMADAS, K. M.; ONOFRIO, V. C.; BEATI, L.; GUGLIELMONE, A. A. The ixodid ticks (Acari: Ixodidae) from Cuba. **Systematic and Applied Acarology**, v. 14, p. 101-128, 2009.

MARTINS, J. R.; DOYLE, R. L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; GUGLIELMONE, A. A. Occurrence of *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae) in São Francisco de Paula, RS, Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 40, p. 143-144, 2011.

BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; NIERI-BASTOS, F. A.; SOARES, J. F.; MARCILI, A.; FAMADAS, K. M.; FACCINI, J. L. H.; DOYLE, R. L.; MARTINS, J. R.; RECK, Jr. J.; GUGLIELMONE A. A.; LABRUNA, M. B. *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae): description of larva, redescription of male and female, and neotype designation. **Zootaxa**, v. 3178, p. 22-32, 2012.

BLACK IV, W. C.; PIESMAN, J. Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 21, p. 10034-10038, 1994.

BECK, A. F.; HOLSCHER, K. H.; BUTLER, J. F. Life cycle of *Ornithodoros turicata americanus* (Acari: Argasidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology**, v. 23, p. 313–319, 1986.

BRUMPT, E. Biologia de alguns Ixodideos brasilienses. **Annaes Paulista de Medicina e Cirurgia**, v. 4, n. 2, p. 25-29, 1915.

CLIFFORD, C. M.; KOHLS, G. M. SONNENSHINE, D. E. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). I. The genera and subgenera.

Annals of the Entomological Society of America, v. 57, p. 429-437, 1964.

COOLEY, R. A.; KOHLS, G. M. *Antricola* new genus, *Amblyomma gertschi* new species, and notes on *Ixodes spinipalpis* (Acarina: Ixodoidea). **Public Health Report**, v. 57, p. 1733-1736, 1942.

COOLEY, R. A.; KOHLS, G. M. The Argasidae of North America, Central America and Cuba. **American Midland Naturalist**. Monographia, v.1, p. 152, 1944.

DANTAS-TORRES, F.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. **Systematic and Applied Acarology**, v.14, p. 30–46, 2009.

DANTAS-TORRE, F.; VENZAL, J. M.; BERNARDI, L. F. O.; FERREIRA, R. L. F.; ONOFRIO, V. C.; MARCILI, A.; BERMÚDEZ, S. E.; RIBEIRO A. F.; BARROS-BATTESTI, D. M.; LABRUNA, M. B. Description of a new species of bat-associated argasid tick (Acari: Argasidae) from Brazil. **Journal of Parasitology**, v. 98, n. 1, p. 36–45, 2012.

DAVIS, G. E. Observations on the biology of the argasid tick, *Ornithodoros brasiliensis* Aragão, 1923, with the recovery of a spirochete, *Borrelia brasiliensis*, n. sp. **The Journal of Parasitology**, v. 38, p. 473-476, 1952.

DESLOIRE, S.; VALIENTE-MORO, C.; CHAUVE, C.; ZENNER, L. Comparision of four methods of extracting DNA from *D. galinae* (Acari: Dermanyssidae). **Veterinary Research**, v. 37, p. 725-732, 2006.

DI PRIMIO, R. Em torno de alguns transmissores de doenças no Rio Grande do Sul. **Arquivos do Rio Grandense do sul**, v. 16, n. 7, 1937.

EADS, R. B.; CAMPOS, E. G. Human parasitism by *Otobius megnini* (Acari: Argasidae) in New Mexico, USA. **Journal of Medical Entomology**, v. 21, p. 244, 1984.

ESTRADA-PENA, A.; VENZAL, J. M.; BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; TRAJANO, E.; FIRMINO, J. V. L. Three new species of *Antricola* (Acari: Argasidae) from Brazil, with a key to the known species in the genus. **Journal of Parasitology**,

v. 90, p. 490–498, 2004

ESTRADA- PEÑA.A.; JONGEJAN, F. Ticks feeding on humans: a review of records on human-biting Ixodoidea with special reference to pathogen transmission.

Experimental and Applied Acarology, v. 23, p. 685-715, 1999.

FAIRCHILD, G. B.; KOHLS, G. M.; TIPTON, V. J. The ticks of Panama (Acarina: Ixodoidea). In: WENZEL, W. R.; TIPTON, V. J. **Ectoparasites of Panama**. Field Museum of Natural History, Chicago, 1966. p. 167-219.

GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; VARGAS, P.; ARDILES, K.; PARRA, L.; GUGLIELMONE, A. A. Developmental Biology of *Argas neghmei* Kohls & Hoogstraal (Acari: Argasidae) under Laboratory Conditions. **Neotropical Entomology**, v. 39, n. 2, p. 160-162, 2010.

GUGLIELMONE A. A.; ROBBINS, R. G.; APANASKEVICH, D. A.; PETNEY, T. N.; ESTRADA-PEÑA, A; HORAK, I. G., SHAO, R; BARKER, S. C. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. **Zootaxa**, v. 2528, p. 1–28, 2010.

GUIMARÃES, J. H.; TUCCI, E. D.; BARROS-BATTESTI, D. M. **Ectoparasitos de Importância Veterinária**. São Paulo: Pliade/FAPESP, 2001. p. 218.

GUGLIELMONE, A. A.; HADANI, A. Hallazgos de *Amblyomma parvum* Aragão, 1908, em Catamarca y Salta. **Revue Médecine Vétérinaire**, v. 61, p. 121-129. 1980

HOOGSTRAAL, H., AESCHLIMANN, A. Tick-host specificity. **Bulletin Society Entomology Suisse**. V. 55, p. 5-32, 1982.

HOOGSTRAAL, H.; KAISER, M. N.; EASTON, E. R. *Ornithodoros (Alectorobius) capensis* Neumann (Ixodoidea: Argasidae) parasiting a human and birds nesting on islands in east African Lakes. **Journal of Medical Entomology**, v. 12, n. 6, p.703-704, 1976.

HOOGSTRAAL, H. Argasid and nuttallied ticks as parasites and vectors. **Advance Parasitology**, v. 1, n. 24, p. 135-238, 1985.

HOSKINS, D.J; CUPP, E. W. Ticks of Veterinary Importance. Part II. The Argasidae Family: Identification, Behavior and Associated Diseases. **Compendium Small Animal**, v. 10, p. 699-710, 1988.

JONES, E. K.; CLIFFORD, C. M.; KEIRANS J. E.; KOHLS, G. M. The ticks of Venezuela (Acarina: Ixodoidea) with a key to species of *Amblyomma* in the western hemisphere. **Brigham Young University Science Bulletin**, Biological Series, v. 17, p. 1-40, 1972.

JONGEJAN, F.; UILENBERG, G. The global importance of ticks. **Parasitology**, v. 129, p. 3-14, 2004.

KHAN, M. H.; SRIVASTAVA, S. C. Life-History of *Ornithodoros savignyi* Audoun. **Indian Veterinary Journal**, v. 65, p. 192-195, 1988.

KHALIL, G. M.; HOOGSTRAAL, H. The life cycle of *Ornithodoros (Alectorobius) amblys* (Acari: Ixodoidea: Argasidae) in the laboratory, **Journal of Medical Entomology**, v. 18, p. 134-139, 1981.

KOHL, G. M.; SONENSHINE, D. E.; CLIFFORD, C. M. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). II. Identification of the larvae of the western hemisphere and description of three new species. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 58, p. 331–364, 1965.

KOHL, G. M.; CLIFFORD, C. M.; JONES, E. K. The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). IV. Eight new species of *Ornithodoros* from the Western Hemisphere. **Annals of the Entomological Society of America**, v. 62, p. 1035–1043, 1969.

LABRUNA, M. B.; SANFILIPPO, L. F.; Demetrio, C.; MENEZES A. C.; PINTER, A.; GUGLIELMONE, A. A.; SILVEIRA, L. F. Ticks collected on birds in the state of São Paulo, Brazil. **Experimental and Applied Acarology**, v. 43, n. 2, p. 147-160, 2007.

LABRUNA, M. B.; TERASSINI, F. A.; CAMARGO, L. M.; BRANDÃO, P. E.; RIBEIRO,

A. F.; ESTRADA-PENÃ, A. New reports of *Antricola guglielmonei* and *Antricola delacruzii* in Brazil, and a description of a new argasid species (Acari). **Journal of Parasitology**, v. 94, n. 4, p. 788-792, 2008.

LABRUNA, M. B.; VENZAL, J. M. *Carios fonsecai* sp. nov. (Acari, Argasidae), a bat tick from the central-western region of Brazil. **Acta Parasitologica**, v. 54, p. 355-363, 2009.

LABRUNA, M. B.; NAVA, S.; TERASSINI, F. A.; ONÓFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M.; CAMARGO, L. M.; VENZAL, J. M. Description of adults and nymph, and redescription of the larva, of *Ornithodoros marinkellei* (Acari:Argasidae), with data on its phylogenetic position. **The Journal of Parasitology**, v. 97, n. 2, p. 207-17, 2011.

LANDULFO, G. A.; Pevidor, L. V.; Sampaio, J. S.; LUZ, H. R.; ONOFRIO, V. C.; FACCINI, J. L. H.; BARROS-BATTESTI, D. M. Life cycle of *Ornithodoros mimon* (Acari: Argasidae) under laboratory conditions. **Experimental and Applied Acarology**, v. 58, p. 69–80, 2012.

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.

MARTINS, J. R.; SALOMÃO, E.; DOYLE R. L.; ONOFRIO, V. C.; BARROS-BATTESTI, D. M. Importância do monitoramento das espécies silvestres no Rio Grande do Sul. **A Hora Veterinária**, v. 166, p. 52-54, 2008.

MARTINS, J. R.; SALOMÃO, E.; DOYLE R. L.; BARROS-BATTESTI, D. M.; ONOFRIO, V. C.; GUGLIELMONE, A. A. Occurrence of *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae) in São Francisco de Paula, RS, Southern Brazil. **Neotropical Entomology**, v. 40, p. 143-144, 2011.

MATHESON, R. Three new species of ticks, *Ornithodoros* (Acarina, Ixodoidea). **The Journal of Parasitology**, v. 21, p. 347-353, 1935.

NAVA, S.; GUGLIELMONE, A. A.; MANGLOD, A. J. An overview of the systematics and evolution of ticks. **Frontiers in Bioscience**, v. 14, p. 2857–2877, 2009.

NAVA, S.; VENZAL, J. M.; TERASSINI, F. A.; MANGOLD, A. J.; CAMARGO, L. M. A, LABRUNA, M. B. Description of a new argasid tick (Acari: Ixodida) from bat caves in Brazilian Amazon. **The Journal of Parasitology**, v. 96, n. 6, p. 1089-1101, 2010.

NEED, T. J.; BUTLER, J. F. Sequential feedings by two species of argasid tick on laboratory mice: effects on tick survival, weight gain, an attachment time. **Journal of Medical Entomology**, v. 28, p. 37-40, 1992.

NEUMANN, L. G. Révision de la famille des ixodidés (1^{er} mémoire). **Mémoires Societe Zoologique de France**, v. 9, p. 1-44, 1896.

NEUMANN, L. G. Révision de la famille des ixodidés (4^e mémoire). **Mémoires Societe Zoologique de France**, v. 14, p. 249-372, 1901.

OLIVER, J. H. JR. Biology and Systematics of ticks (Acari: Ixodida). **Annual Review of Ecology and Systematics**, v. 20, p. 397-430, 1989.

PAROLA, P.; CORNET, J. P.; SANOGO, Y. O.; MILLER, R. S.; THIEN, H. V.; GONZALEZ, J. P.; DIDIER, R.; SAM, R.; TELFORD III, S. R.; WONGSRICHANALAI, C. Detection of *Ehrlichia* spp., *Anaplasma* spp., *Rickettsia* spp., and other eubacteria in ticks from the Thai-Myanmar border and Vietnam. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 41, p. 1600-1608, 2003.

SONENSHINE, D. E. Biology of ticks. New York: **Oxford University Press**, v. 1, p. 447, 1991.

SONENSHINE, D. E.; ANASTOS, G. Observations on the Life History of the bat tick *Ornithodoros kelleyi* (Acarina: Argasidae). **The Journal of Parasitology**, v. 46, n. 4, p. 449-454, 1960.

SCHUMAKER, T. T. S.; BARROS, D. M. Life cycle of *Ornithodoros (Alectorobius) talaje* (Acari: Argasidae) in laboratory. **Journal of Medical Entomology**, v. 32, p.

249-254, 1995.

SCHUMAKER, T. T. S.; MORI, C. M. C.; FERREIRA, C. S. Experimental infestation of *Gallus gallus* with *Ornithodoros (Alectorobius) amblus* (Ixodoidea: Argasidae). . **Journal of Medical Entomology**, v. 34, p. 521-526, 1997.

SHOURA, S. M. E. The Life cycle of *Ornithodoros (Pavlovskella) erraticus* (Acari: Ixodoidea: Argasidae) in the laboratory. **Journal of Medical Entomology**, v. 24, n. 2, p. 229-234, 1987.

SWOFFORD, D. L. PAUP*. Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*and Other Methods). Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts. 2002.

RECK, J.; SOARES, J. F.; TERMIGNONI, C; LABRUNA, M. B.; MARTINS, J. R. S. Tick toxicosis in a dog bitten by *Ornithodoros brasiliensis*. **Veterinary Clinical Pathology**, v. 40, p. 356-360, 2011.

REGENER, R. L.; SPRUILL, C. L.; PLIKAYTIS, B. D. Genotypic identification of rickettsiae and estimation of intraspecies sequence divergence for portions of two rickettsial genes. **Journal of Bacteriology**, v. 173, n. 5, p. 1576–1589, 1991.

RONQUIST, F.; HUELSENBECK, J. P. MRBAYES 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. **Bioinformatics**, n. 19, p. 1572-1574. 2003.

VARGAS, M. Occurrence of the bat tick *Ornithodoros (Alectorobius) kelleyi* Cooley & Kohls (Acari: Argasidae) in Costa Rica and its relation to human bites. **Revista de Biología Tropical**, v. 32, p. 103-107, 1984.

VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A. Larval feeding performance of two Neotropical *Ornithodoros* ticks (Acari: Argasidae) on reptiles. **Experimental and Applied Acarology**, v. 39, p. 315-320, 2006.

VENZAL, J. M.; ESTRADA-PEÑA, A; MANGOLD, A. J.; GONZÁLEZ-ACUÑA, D.; GUGLIELMONE, A. A. The *Ornithodoros (Alectorobius) talaje* Species Group (Acari: Ixodida: Argasidae): Description of *Ornithodoros (Alectorobius) rioplatensis* n. sp.

From South America. **Journal of Medical Entomology**, v. 45, n. 5, p. 832-840, 2008.

VIAL, L. Biological and Ecological Characteristics of soft ticks (Ixodida: Argasidae) and their impact for predicting tick and associated disease distribution. **Parasite**, v. 16, p. 191-202, 2009.
315-320, 2006.

ANEXOS

***Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae): description of the larva, redescription of male and female, and neotype designation**

DARCI M. BARROS-BATTESTI^{1,7}, VALERIA C. ONOFRIO¹, FERNANDA A. NIERI-BASTOS², JOÃO FÁBIO SOARES², ARLEI MARCILI², KÁTIA M. FAMADAS³, JOÃO LUIZ H. FACCINI³, DIEGO G. RAMIREZ², ROVAINA L. DOYLE⁴, JOÃO RICARDO MARTINS⁴, JOSÉ R. JUNIOR⁵, ALBERTO A. GUGLIELMONE⁶ & MARCELO B. LABRUNA²

¹Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, 05503-900, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: valcastilho@butantan.gov.br

²Departamento de Medicina Veterinária Preventiva e Saúde Animal, FMVZ/USP, 05508-270, São Paulo, SP, Brazil. E-mail: feneri@usp.br, jfsvet@gmail.com, amarcili@usp.br, ramirez@usp.br, labruna@usp.br

³Departamento de Parasitologia Animal, IV/UFRRJ, 23890-000, Seropédica, RJ, Brazil.

E-mail: faccini@ufrrj.br, kfamadas@ufrrj.br

⁴Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, FEPAGRO, 92990-000, Eldorado do Sul, RS, Brazil. E-mail:

joaorsm@terra.com.br, rovainadoyle@yahoo.com.br

⁵Centro de Biotecnologia, UFRGS, Campos do Vale/UFRGS, 91540-000, Porto Alegre, RS, Brazil. E-mail: jreck@cbiot.ufrgs.br

⁶Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, CC 22, CP 2300 Rafaela, Santa Fe, Argentina. E-mail: aguglielmone@rafaela.inta.gov.ar

⁷Corresponding author. E-mail: dbattesti@butantan.gov.br

Abstract

Ornithodoros brasiliensis is an endemic tick from Brazil and is very aggressive to humans, resulting in pain, fever and intense inflammatory response. After more than 50 years without report, this species was recently found in rural areas of São Francisco de Paula municipality, State of Rio Grande do Sul, southern Brazil, from where it was originally described. Herein, we describe the larva and redescribe the adults of *O. brasiliensis* based on scanning electron microscopy. Since the type was lost we designate the neotype specimen under the number IBSP 10409. In addition, the relationship between *O. brasiliensis* and other species from the Neotropical region that share the morphological characteristics of *Ornithodoros* with dorsal humps on tarsi, and also live under the soil and feed on hosts other than bats, are discussed. Molecular analysis inferred from a portion of the 16S rRNA mitochondrial gene is also provided and it placed *O. brasiliensis* in a cluster supported by a maximal bootstrap value (100%) with *Ornithodoros parkeri*, *Ornithodoros rostratus*, and *Ornithodoros turicata*.

Key words: *Ornithodoros brasiliensis*, argasid ticks, taxonomy, DNA sequence, Brazil

Introduction

Classical argasid tick systematics recognizes five genera, namely *Ornithodoros* Koch, *Antricola* Cooley & Kohls, *Argas* Latreille, *Nothoaspis* Keirans & Clifford, and *Otobius* Banks (Hoogstraal 1985; Guglielmone *et al.* 2010).

Clifford *et al.* (1964) recognized 7 subgenera of *Ornithodoros* as follows: *Ornithodoros* s. str., *Alveonasus* Schulze, *Alectorobius* Pocock, *Pavlovskyella* Pospelova-Shtrom, *Reticulinasus* Schulze, and described *Ornamentum* and *Subparmatus* as new subgenera that were accepted by Hoogstraal (1985). Camicas and Morel (1977) considered *Alectorobius* as a valid genus including the subgenera *Reticulinasus*, *Ornamentum* and *Subparmatus* as well as *Pavlovskyella* (this last genus as a synonym of *Theriodoros*). This classification was maintained by Camicas *et al.* (1998), but Keirans (2009) retained the subgeneric classification proposed by Hoogstraal (1985) who did not recognize *Alectorobius* as a genus.

Klompen and Oliver (1993) recognized three genera in the Ornithodorinae, *Ornithodoros*, *Otobius*, and *Carios*, based on phylogenetic analysis. According to Estrada-Peña *et al.* (2010) the generic divisions proposed by

Hoogstraal (1985), Klompen and Oliver (1993) and Camicas *et al.* (1998) present taxonomic arrangements characterized by the genera *Ornithodoros*, *Carios* and *Alectorobius*, respectively, that include most of the species of Argasidae. However these generic arrangements are difficult to settle with our current knowledge about this family.

In the current list of valid species names of ticks in the world (Guglielmone *et al.* 2010) the Argasidae consists of 193 species and *Ornithodoros* includes 112 species. According to these authors there is widespread disagreement with reference to the genera and 133 argasid species (most placed into *Carios* or *Alectorobius*).

The genus *Ornithodoros* is currently represented by at least 50 species in the Neotropical Region, from which 13 species occur in Brazil (Dantas-Torres *et al.* 2009, who named 10 of them as belonging to *Carios*).

Morphologically, most of the Brazilian species of *Ornithodoros* share common features (e.g., presence of well-developed cheeks and legs with micromammillate cuticle) with other bat-associated argasid ticks included in the subgenus *Alectorobius*. However, two species, *Ornithodoros brasiliensis* Aragão and *Ornithodoros rostratus* Aragão, share common characters (e.g., presence of tuft of shorter setae laterally on article I of palpi, presence of humps on tarsi and absence of cheeks) with other species included in the subgenera *Ornithodoros* and *Pavlovskyella* (Clifford *et al.* 1964). Both species are known as “ground tick” due to their habits of living buried in sand or soft soil near the main host inhabitations, cellars, stables and even primitive human habitations (Martins *et al.* 2011). They are parasites of mammals, including humans, and birds (Kohls *et al.* 1965). The species *O. brasiliensis* is known just from the State of Rio Grande do Sul (Southern Brazil) where it is endemic. It is closely related to *O. rostratus* that is distributed in four countries of South America.

Although *O. brasiliensis* had not been reported in the last 50 years, it has been recently found in rural areas of São Francisco de Paula municipality, Rio Grande do Sul State, from where it was originally described. The geographical distribution of *O. rostratus* covers Argentina, Bolivia, Paraguay, and Brazil, parasitizing mammals under natural conditions, but also reptiles under laboratory conditions (Venzal *et al.* 2006).

Herein we describe the larva, and redescribe the male and female of *O. brasiliensis* based on scanning electron microscopy. In addition, we provide the mitochondrial 16S rDNA sequence, to further consider the molecular affinities of this species. Because the type of *O. brasiliensis* is not among the surviving Aragão’ collection (curator Marinete Amorim, personal communication), we also designate the neotype specimen.

Materials and Methods

Adults of *O. brasiliensis* were obtained from nymphs collected from the ground of a house’s basement in São Francisco de Paula municipality (29° 20’ 00” S; 48° 30’ 21” W), State of Rio Grande do Sul. Adults mated under laboratory conditions and the females laid batches of eggs resulting in a new generation. Larvae emerged 18–20 days after oviposition and some of them were fixed in alcohol. Ten unfed larvae were mounted in Hoyer’s medium on slides and examined under a Zeiss MC80DX light microscope for morphological analyses and morphometry. Larval chaetotaxic terminology and measures follow Kohls *et al.* (1965). Five specimens each of larvae, males and females were cleaned according to Keirans *et al.* (1976) and adults were measured under a Leica MZ12 stereomicroscope. All measurements are given in mm, the mean followed by the standard deviation, and range in parentheses. Five larvae, two males and two females were prepared for scanning electron microscopy, as well as the tarsi I–IV of *O. rostratus* collected in July, 2004 on a pig from Nhecolândia municipality (19°14’S, 57°01’W) State of Mato Grosso do Sul (IBSP10461). Part of the micrographs were taken in the Laboratory of Electron Microscopy, Museu de Zoologia da Universidade de São Paulo, using a Zeiss/Leo 440 scanning electron microscope, and other part was taken in the Laboratory of Electron Microscopy, Instituto de Biociências, UNESP Rio Claro (State of São Paulo), using a Hitachi TM3000 scanning electron microscope.

Material of *O. turicata* are deposited at the Acari Collection from Instituto Butantan (IBSP 1061, 2 females from Texas, USA, number 5 from Matheson Collection, 1937) as well as adults of 2 lots of *Ornithodoros rudis* Karsch (IBSP 1062, from Panama; and IBSP 4960, from Paraguay) and 24 lots of *O. rostratus* from different regions of Brazil were also examined.

The specimens of *O. brasiliensis* were processed for DNA extraction by using the DNEasy Tissue kit (Qia-gen®), following the manufacturer’s recommendations with some modifications according to Desloire *et al.* (2006). For molecular taxonomic studies, a ~400-bp fragment of the 16S rDNA gene was used, as proposed by Mangold *et al.* (1998) using primers: 16S + 1 (5’-CTG CTC AAT GAT TTT TTA AAT TGC TGT GG-3’); 16S – 1 (5’-CCG GTC TGA ACT CAG ATC AAG T- 3’) (Black & Piesman 1994). Fragments of PCR amplified DNA

were purified with ExoSAP-IT (USB Corporation) and the products were sequenced using kit Big Dye Terminator (Perkin Elmer).

The mitochondrial 16S rDNA sequence (426bp) of *O. brasiliensis* (GU198363) was aligned with sequences previously determined for other argasid species available in Genbank, *Argas reflexus* Fabricius (AF001401), *Argas monachus* Keirans, Radovsky & Clifford (EU283344), *Argas neghmei* Kohls & Hoogstraal (DQ295781), *Argas monolakensis* Schwan, Corwin & Brown (L34305), *Ornithodoros turicata* (L34327), *Ornithodoros parkeri* Cooley (EU009925), *Ornithodoros gurneyi* Warburton (AY436767), *Ornithodoros coriaceus* Koch (AY668970), *O. rostratus* (DQ295780), *Ornithodoros porcinus* Walton (L34329), *Ornithodoros moubata* (Murray) (L34328), *Carios fonsecai* Labruna & Venzal (GQ120967), *Carios mimon* (Kohls, Clifford & Jones) (GU198362), *Carios rondoniensis* Labruna, Terassini, Camargo, Brandao, Ribeiro & Estrada-Pena (EU090907), *Antricola guglielmonei* Estrada-Pena, Barros-Battesti & Venzal (EU090905) and *Antricola mexicanus* Hoffmann (L34323). Phylogenetic analyses were inferred by maximum parsimony (MP) and Bayesian (B) methods. Maximum parsimony (MP) trees were inferred using PAUP* v. 4.0b10 (Swofford 2002) and Bayesian (B) inferences were carried out with MrBayes v.3.1.2 (Ronquist & Huelsenbeck 2003) using GTR model. The first 100,000 trees from 1,000,000 generations were discarded as burn in, and posterior probability values were calculated on the consensus of last tree samples. *Ixodes holocyclus* (AB051844) was used as an outgroup.

Results

Description of Larva (Figures 1–6)

Gnathosoma - basis capituli, length from palpal apex to posterior margin 0.313 ± 0.014 (0.295–0.333) by 0.274 ± 0.013 (0.255–0.293) wide (Figure 1). *Palpi* length from apices to basis of article I 0.217 ± 0.008 (0.202–0.230) long by 0.062 ± 0.002 (0.058–0.066) wide (at the level of article II). Length of palpal articles I–IV: 0.061 ± 0.003 (0.057–0.065), 0.050 ± 0.004 (0.046–0.057), 0.056 ± 0.004 (0.050–0.061), and 0.057 ± 0.003 (0.055–0.062), respectively. Short spines present on dorsal surface of palpal article I. Number of setae on palpal articles I–IV is 0, 4, 5, and 9, respectively. Ventral basis rectangular (Figure 2); two pairs of posthypostomal setae, Ph_1 setae very long reaching the middle of hypostome, Ph_1 setae length 0.069 ± 0.001 (0.053–0.105), Ph_2 setae length 0.028 ± 0.004 (0.022–0.034). Distance between Ph_1 setae 0.048 ± 0.011 (0.032–0.064) and between Ph_2 setae 0.100 ± 0.005 (0.094–0.110). *Hypostome* arises directly from the basis capituli, not from a median extension, slightly notched apically, 0.121 ± 0.007 (0.110–0.129) long (from Ph_1 to the apex) by 0.063 ± 0.005 (0.050–0.068) wide. Denticles present only on the anterior half, in 2/2 arrangement, internal and external files with 7 and 8 denticles, respectively, crenulations absent. *Idiosoma* outline oval rounded anteriorly 1.003 ± 0.054 (0.935–1.073) long by 0.962 ± 0.094 (0.867–1.154) wide, excluding capitulum. *Dorsal plate* almost rounded slightly longer than wide, 0.197 ± 0.017 (0.171–0.219) long by 0.122 ± 0.006 (0.113–0.131) wide (Figure 3). *Dorsum* with 13–14 (typically 13) pairs of setae thin, 10–11 (typically 10) dorsolateral pairs (7 anterolateral pairs and 3 posterolateral pairs), and 3 central pairs: C (central) setae, C1, C2, C3, length 0.084 ± 0.016 (0.046–0.105), 0.088 ± 0.024 (0.047–0.119) and, 0.090 ± 0.026 (0.035–0.126), respectively; DAL (dorsal anterolateral) setae, DAL1–DAL7, length 0.122 ± 0.035 (0.041–0.150), 0.125 ± 0.021 (0.085–0.153), 0.097 ± 0.014 (0.060–0.110), 0.110 ± 0.024 (0.050–0.132), 0.096 ± 0.016 (0.053–0.112), 0.098 ± 0.017 (0.051–0.111) and, 0.088 ± 0.015 (0.049–0.099), respectively; DPL (dorsal posterolateral) setae, length DPL1–DPL3, 0.107 ± 0.017 (0.063–0.125), 0.115 ± 0.022 (0.056–0.130), and 0.113 ± 0.022 (0.062–0.133), respectively. *Venter* with 8 pairs of setae plus 1 posteromedian seta: 3 sternal (St), length St1–St3, 0.048 ± 0.007 (0.038–0.062), 0.045 ± 0.009 (0.027–0.060), and 0.046 ± 0.009 (0.026–0.055), respectively; 3 circumanal (CA), length CA1–CA3, 0.084 ± 0.016 (0.046–0.106), 0.088 ± 0.024 (0.047–0.119), and 0.090 ± 0.026 (0.035–0.126), respectively; 1 ventral posterolateral (VPL) length 0.065 ± 0.011 (0.044–0.083); and 1 anal (A) length 0.040 ± 0.003 (0.032–0.045); plus 1 posteromedian seta (PM) length 0.056 ± 0.004 (0.052–0.067) (Figure 4). One specimen with 2 PM (Figure 5). Mild transverse postanal groove as shown (Figure 4). *Legs*. Tarsus I 0.301 ± 0.023 (0.266–0.339) long by 0.080 ± 0.008 (0.068–0.094) wide. Setal formula: 1 pair A (anterior), DM (distomedian) absent, 5 PC (paracapsular), 1 PM (posteromedian), 1 pair B (basal), 1 pair AV (apicoventral), 1 pair MV (midiventral), and 1 pair PL (posterolateral). Capsule of Haller's organ open, numerous halleral spinose setae present (Figure 6).

FIGURES 1–6. Scanning electron microscopy of *Ornithodoros brasiliensis* larva. 1. Capitulum dorsal view, presence of short spines palpal article I (arrowed). 2. Capitulum ventral view. 3. Idiosoma dorsal view, dorsal plate (arrowed). 4. Idiosoma ventral view, mild transverse postanal groove present (arrowed). 5. Opisthosoma ventral view, presence of two posteromedian setae in one specimen (arrowed). 6. Capsule of Haller's organ open, numerous halleral spinose setae present (arrowed). *Abbreviations:* A, anal setae; C, dorsal central setae; CA, circumanal setae; DAL, dorsal anterolateral setae; DPL, dorsal posterolateral setae; Ph, post hypostomal setae; PM, posteromedian setae; ST (sternal setae), VPL, ventral posterolateral setae. *Scale bars:* 1, 90µm; 2, 60µm; 3–4, 300µm; 5, 40µm; 6, 30µm.

Redescription of Adults (Figures 7–20, 26–27)

Female (Figures 7–13, 26–27): *Gnathosoma* ventral basis slightly wider than longer, with irregular transverse wrinkles; length since basis to apex of hypostome 0.688 ± 0.012 (0.683–0.695) by 0.925 ± 0.010 (0.920–0.930) wide; palpi rounded laterally with tufts of long setae present on articles 2 and 3, tuft of shorter setae laterally on article I, average length of palpal articles 1–4: 0.322, 0.241, 0.168, and 0.161, respectively. Hypostome short and small rounded apically, 0.585 ± 0.010 (0.583–0.590) long (from Ph_1 to apex) by 0.146 ± 0.015 (0.140–0.155) wide, dental formula 2/2, with 3/3 near to apex. Denticles arranged from the median to apex, external and internal rows with 9, 8 and 1 denticles, respectively; corona with small and numerous denticles. With 2 pairs of posthypostomal setae, Ph_1 0.307 ± 0.005 (0.305–0.310) long, reaching about three-fourths length of hypostome, Ph_2 0.005 ± 0.001 (0.005–0.006) long (Figure 7). Distance between setae of Ph_1 0.145 ± 0.015 (0.140–0.155), between setae of Ph_2 0.380 ± 0.005 (0.375–0.380). Hood reduced, camerostome well-developed, cheeks absent. *Idiosoma* outline oval, rounded anteriorly, broadest at level of coxa IV. Length from anterior to posterior body margin 7.475 ± 0.380 (7.040–7.760), breadth 4.643 ± 0.350 (4.242–4.880); submarginal and dorsoventral grooves distinct; mammillae large, close but not crowded, with small numerous hairs uniformly distributed and with many setae present on anterior and lateral margins; discs present (Figure 8). *Idiosoma ventral* with mammillae as dorsally, larger on the posterior margin, undefinitive on the supracoxal folds. Genital aperture at the level of coxae II, posterior margin rounded (Figure 9). Preanal (PA), transverse postanal (Tpa) and medium postanal (Mpa) grooves present (Figure 11); the later crossing the transverse terminating at the posterior border. Coxal folds extending from coxae I to coxae IV. Four pairs of bulging lateral structures resembling large mammillae on supracoxal folds between legs I–IV, visible in both optical and scanning microscopy (Figures 18, 19). Spiracular plates rounded, macula prominent (Figure 10), located laterally between the coxae III–IV, length 0.275 ± 0.010 (0.265–0.285), breadth 0.265 ± 0.010 (0.260–0.270). *Legs*: mammillae absent on all tarsi, proximal dorsal humps and claws present; tarsus I with 4 dorsal humps, 1 pointed (distal), anterior to Haller's organ (Figure 12) and 3 rounded (proximal), posterior (Figure 11), length 0.947 ± 0.046 (0.925–1.000); tarsi II, III also present proximal and distal humps dorsally, smaller than those from tarsus I (Figure 26). Tarsus IV with 1 distal and 1 proximal strong dorsal humps (Figure 27), length 1.165 ± 0.065 (1.160–1.220). Haller's organ with large capsule opening transversely with numerous halleral setae, and a group with 8 small plus 2 bigger prehalleral setae (Figure 12).

Male (Figures 14–21, 26–27): *Gnathosoma* smaller than female, length since basis to apex of hypostome 0.320 ± 0.002 (0.312–0.315) by 0.540 ± 0.010 (0.545–0.550) wide (Figure 14). *Idiosoma* outline oval, rounded anteriorly, broadest at level of coxae II (where are placed the second and third pairs of bulging lateral structures) and IV close to the dorsoventral groove (Figures 15, 18); length from anterior to posterior body margin 5.755 ± 0.350 (5.466–6.125), breadth 3.500 ± 0.250 (3.300–3.780); integument with small numerous mammillae and setae, discs present (Figures 15, 16). Ventral grooves similar to the female as well as the 4 pairs of bulging lateral structures on supracoxal folds (Figure 18, 19). Spiracular plates rounded as in female, prominent located laterally between the coxae III–IV (Figure 18), length 0.264 ± 0.010 (0.260–0.270), breadth 0.255 ± 0.010 (0.250–0.260). *Legs*: tarsus I with 4 dorsal humps, 3 posterior and 1 anterior to Haller's organ, length 0.695 ± 0.020 (0.675–0.725) (Figure 20). Tarsus IV similar to the female (Figure 25), length 0.945 ± 0.020 (0.925–0.955); tarsi II, III also present proximal and distal rounded humps and 3 smaller humps between them (Figure 26). Tarsus IV with proximal and distal humps smaller than the other tarsi (Figure 27). Haller's organ as in female (Figure 20).

For comparison, the tarsi I–IV of *O. rostratus* (Figures 21–25) and the tarsi III and IV of *O. brasiliensis* (Figures 26–27) were illustrated.

Through the phylogenetic relationships based on a partial sequence of the mitochondrial 16S rDNA gene (Figure 28), *O. brasiliensis* grouped with *O. rostratus* within a branch strongly supported (100% of bootstrap) that also contained the sequences of *O. parkeri*, *O. coriaceus*, *O. gurneyi* and *O. turicata*, but the sequence divergence between these species varied from 16 to 22%. The sequence divergence between *O. brasiliensis* and *O. rostratus* (Accession Number DQ295780) was 15%.

FIGURES 7–13. Scanning electron microscopy of *Ornithodoros brasiliensis* female. 7. Capitulum. 8. Idiosoma dorsal view, dorsoventral groove distinct (arrowed). 9. Idiosoma ventral view. 10. Idiosoma lateral view, spiracular plate (arrowed). 11. Preanal, transverse postanal and medium postanal grooves (arrowed). 12. Tarsus I, with a pointed dorsal hump, anterior to Haller's organ, and 3 posterior rounded (arrowed). 13. Hallers' organ, with large capsule and distal hump (arrowed). *Abbreviations:* PA, preanal groove; Ph, post hypostomal setae; Tpa, transverse postanal groove; Mpa, medium postanal groove. *Scale bars:* 7–10–12, 300µm; 8–9–11, 500µm; 13, 60µm.

FIGURES 14–20. Scanning electron microscopy of *Ornithodoros brasiliensis* male. 14. Capitulum, hypostome smaller than the female (arrowed). 15. Idiosoma dorsal view, the circle corresponds a disc of the tegument, dorsoventral groove distinct (arrowed). 16. A disc of the tegument increased 500x. 17. Idiosoma ventral view. 18. Four pairs of bulging lateral structures on supracoxal folds (arrowed). 19. Bulging lateral structure in focus. 20. Tarsus I, rounded and prominent dorsal humps present, large capsule of Haller's organ with numerous halleral setae (arrowed). Scale bars: 14, 500µm; 15, 1000µm; 16, 200µm; 17, 600µm; 18, 500µm; 19, 250µm; 20, 60µm.

FIGURES 21–27. Tarsi of adults of *Ornithodoros rostratus* (Figures 21–25) and *Ornithodoros brasiliensis* (Figures 26–27). 21. Tarsus I of *O. rostratus*, the distal and proximal dorsal humps (arrowed). 22. Capsule of Haller's organ of *O. rostratus*. 23–25. Tarsi II–IV of *O. rostratus*, distal and proximal humps present on figures 23–24 (arrowed), and the proximal hump on tarsus IV is absent on figure 25. 26. Tarsus III of *O. brasiliensis*, rounded dorsal humps present (arrowed). 27. Tarsus IV of *O. brasiliensis*, proximal and dorsal humps present. (arrowed) Scale bars: 21, 90µm; 22, 40µm; 23–25, 120µm; 26–27, 200µm.

FIGURE 28. Phylogenetic tree based on 16 Argasidae ticks and *Ixodes holocyclus* (outgroup). The alignment was made with 631 characters (including gaps) of the 16S rRNA mitochondrial gene used in the analysis. The Bayesian support (posterior probabilities) values are derived from 500 replicates. The branch length scale is the number of substitutions per site. The species with similar morphology are in a grey box.

Neotype designation

The neotype was designated under the number IBSP10409 (female, molted in laboratory from nymph collected at São Francisco de Paula, Rio Grande do Sul, 08/VIII/2008, leg J.R. Martins). The measurements of this specimen are:

Gnathosoma ventral basis length since basis to Ph₁ 0.680 by 0.970 wide; length of palpal articles 1–4: 0.300, 0.238, 0.165, and 0.159, respectively. Hypostome 0.430 long by 0.150 wide. *Idiosoma* length 6.600 by 4.020 wide. Tarsus I length 0.900; tarsus IV length 1.100.

Discussion

The morphological similarities and common life cycle history show some distinct groups in *Ornithodoros*, even though the taxonomic and molecular situation of the genus *Ornithodoros* is not clear yet and subgenera have not been considered in the lists of valid species (Horak *et al.* 2002; Guglielmone *et al.* 2003, 2010).

In the Neotropical region, *O. brasiliensis*, *Ornithodoros furcosus* Neumann, *Ornithodoros nicolleti* Mooser, and *O. rostratus* share characters such as the absence of cheeks, presence of dorsal humps (protuberances) on tarsi in adults, and hypostomal formula 2/2 on larvae, among others (Clifford *et al.* 1964). Although adults of *O. brasiliensis* present the same morphological characteristics, the larvae molt to first instar nymphs without feeding, in contrast to the other three species that need a rapid blood meal in each stage.

Species relationships

The larva of *O. brasiliensis* is bigger than any other known larva of Ornithodorinae. Despite of its enormous size, the length of the hypostome and palpi of *O. brasiliensis* is smaller than those of *O. rostratus* and *O. nicolleti*. In *O. brasiliensis* the dorsal plate is large, almost rounded and smooth, and the cuticle is so thin that the dorsal plate becomes transparent and hard to see when submitted to clarification methods. The dorsal plates of *O. nicolleti* and *O. rostratus* are smaller and have an anterior concavity. On the other hand the short spines on the dorsal surface of palpal article I in *O. brasiliensis* are also present in the larvae of *O. nicolleti* and *O. rostratus*. According to Clifford *et al.* (1964), this character could be observed in the larva of *O. turicata* but the dorsal plate in this species is absent, as it is in *O. parkeri* (Kohls *et al.* 1965).

Regarding the larval chaetotaxy, *O. brasiliensis* resembles *O. rostratus* but the length of setae Ph₁ and the distance between Ph₁–Ph₁ is twice that compared with *O. brasiliensis*. Setae Ph₂ is shorter but the distance between them is bigger than in *O. rostratus*. On the other hand the length of DAL and DPL is similar in both species but in *O. rostratus* these setae are thicker. The length of CA₁–CA₃ is slightly bigger in *O. brasiliensis*. The length of dorsal and ventral setae of *O. nicolleti* is similar to those of *O. rostratus*. The setal formula of tarsus I is similar in these species but the length is three times bigger in *O. brasiliensis*.

Aragão and Fonseca (1961) presented a key for adult species of *Ornithodoros* from Brazil. According to these authors, the main morphological character used to separate the species *O. brasiliensis* from *O. rostratus* was the presence and absence of dorsal humps on tarsus IV in *O. brasiliensis* and *O. rostratus*, respectively. In fact, both species have dorsal humps in all tarsi but the number and shape of the humps are different. In *O. brasiliensis* the dorsal humps are rounded (Figures 12, 20, 26, 27) while in *O. rostratus* they are bigger and more pointed (Figures 21–25). Tarsus IV in *O. brasiliensis* have distal and proximal humps, but these are small (Figure 27), whereas in *O. rostratus* the proximal humps are absent (Figure 25). On the other hand, tarsus IV in *O. turicata* has only a distal hump, similar to *O. rostratus* and in *O. parkeri* it is absent (Cooley & Kohls 1944).

Although *O. parkeri* and *O. turicata* are Nearctic species (Kohls *et al.* 1965; Guglielmone *et al.* 2003), they are morphologically and molecularly close to *O. brasiliensis* and *O. rostratus*. These last three species have four pairs of bulging structures present laterally in the supracoxal folds. These structures are located at the level of leg I (a pair), two pairs at the level of leg III and one pair at the level of leg IV (Figures 18, 19). They were also observed in nymphs from the instar II of *O. brasiliensis*.

Molecular analysis

The DNA sequence is closely related to those of *O. brasiliensis*, *O. parkeri*, *O. rostratus* and *O. turicata* (Figure 28). Nevertheless, the lack of molecular studies with the full diversity of argasid ticks hinders the understanding of phylogenetic relationships among the Argasidae. Recent studies have shown that the genus *Ornithodoros* is paraphyletic (Labruna *et al.* 2008; Nava *et al.* 2009; Barros-Battesti *et al.* 2010). The joint study of morphological and molecular characters and the inclusion of new species in these studies are necessary for real discussion of the phylogenetic position of genus *Ornithodoros* as well as other genera within the Argasidae.

Acknowledgements

Thanks to Marinete Amorim, curator of the tick collection from Fiocruz for information on the type of *O. brasiliensis*, and to Pablo Nunes (Laboratory of Electron Microscopy, Instituto de Biociências, UNESP Rio Claro, Brazil) for his expertise and assistance with scanning electron microscopy. This study was supported by FAPESP (project number 2007/57749–2) and by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq (project number 478950/2004–7 to DMBB); and academic career scholarship to DMBB, MBL and JLHF.

References

- Aragão, H.B. & Fonseca, F. (1961) Notas de Ixodologia, VIII. Lista e chave para os representantes da fauna ixodológica brasileira. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 59, 115–155.
- Barros-Battesti, D.M., Landulfo, G.A., Onofrio, V.C., Faccini, J.L.H., Marcili, A., Nieri-Bastos, F.A., Venzal, J.M. & Labruna, M.B. (2010) *Carios mimon* (Acari: Argasidae): description of adults and redescription of larva. *Experimental and Applied Acarology*, 54, 93–104. Doi 10.1007/s10493-010-9416-2.
- Black, W.C. & Piesman, J. (1994) Phylogeny of hard- and soft-tick taxa (Acari: Ixodida) based on mitochondrial 16S rDNA sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 91, 10034–10038. Doi:10.1073/pnas.91.21.10034.
- Camicas, J.L. & Morel, P.C. (1977) Position systématique et classification des tiques (Acarida: Ixodida). *Acarologia*, 18, 410–420.
- Camicas, J.L., Hervy, J.P., Adam, F. & Morel, P.C. (1998) *Les Tiques du Monde*. Éditions de l'Orstom, Institut Français de Recherche Scientifique pour le Développement en Coopération, Paris, 233 pp.
- Clifford, C.M., Kohls, G.M. & Sonenshine, D.E. (1964) The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). I. The genera and subgenera. *Annals of the Entomological Society of America*, 57, 429–437.
- Cooley, R.A. & Kohls, G.M. (1944) The Argasidae of North America, Central America and Cuba. *The American Midland Naturalist Monograph*, 1, 1–152.
- Dantas-Torres, F., Onofrio, V.C. & Barros-Battesti, D.M. (2009) The ticks (Acari: Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil. *Systematic and Applied Acarology*, 14, 30–46.
- Desloire, S., Valiente-Moro, C., Chauve, C. & Zenner, L. (2006) Comparison of four methods of extracting DNA from *D. galinae* (Acari: Dermanyssidae). *Veterinary Research*, 37, 725–732. Doi: 10.1051/vetres:2006031.
- Estrada-Peña, A., Mangold, A.J., Nava, S., Venzal, J.M., Labruna, M.B. & Guglielmone, A.A. (2010) A review of the systematic of the tick family Argasidae (Ixodida). *Acarologia*, 50, 317–333. DOI: 10.1051/acarologia/20101975.
- Guglielmone, A.A., Estrada-Peña, A., Keirans, J.E. & Robbins, R.G. (2003) *Ticks (Acari: Ixodida) of the Neotropical Zoogeographic Region*. Special Publication of the International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases, Atalanta, Houten, 173 pp.
- Guglielmone, A.A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D.A., Petney, T.N., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., Shao, R. & Barker, S.C. (2010) The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, 2528, 1–28.
- Hoogstraal, H. (1985) Argasid and Nuttalliellid ticks as parasites and vectors. *Advances in Parasitology*, 24, 135–238. Doi:10.1016/S0065-308X(08)60563-1.
- Horak, I., Camicas, J.L. & Keirans, J.E. (2002) The Argasidae, Ixodidae, and Nuttalliellidae (Acari: Ixodidae): a world list of valid tick names. *Experimental and Applied Acarology*, 28, 25–54. Doi:10.1023/A:1025381712339.
- Keirans, J.E. (2009) Order Ixodida. In: Krantz, G.W. & Walter, D.E. (Eds.) *A Manual of Acarology*. 3rd ed, Texas Tech University Press, Lubbock, pp. 111–123.
- Keirans, J.E., Clifford, C.M. & Corwin, D. (1976). *Ixodes sigelos* n. sp. (Acarina: Ixodidae), a parasite of rodents in Chile, with a method for preparing ticks for examination by scanning electron microscopy. *Acarologia*, 18, 217–225.
- Klompen, J.S.H. & Oliver Jr, J.H. (1993) Systematic relationships in the soft ticks (Acari: Ixodida: Argasidae). *Systematic Entomology*, 18, 313–331. Doi:10.1111/j.1365-3113.1993.tb00669.x.
- Kohls, G.M., Sonenshine, D.E. & Clifford, C.M. (1965) The systematics of the subfamily Ornithodorinae (Acarina: Argasidae). II. Identification of the larvae of the Western Hemisphere and description of three new species. *Annals of the Entomological Society of America*, 58, 331–364.
- Labruna, M.B., Terassini, F.A., Camargo, L.M., Brandão, P.E., Ribeiro, A.F. & Estrada-Peña, A. (2008) New reports of *Antricola guglielmonei* and *Antricola delacruzi* in Brazil, and a description of a new argasid species (Acari). *Journal of Parasitology*, 94, 788–792. Doi 10.1645/GE-1447.1.
- Mangold, A.J., Bargues, M.D. & Mas-Coma, S. (1998) Mitochondrial 16S rDNA sequences and phylogenetic relationships of species of *Rhipicephalus* and other tick genera among Metastriata (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research*, 84, 478–484.
- Martins, J.R., Doyle, R.L., Barros-Battesti, D.M., Onofrio, V.C. & Guglielmone, A.A. (2011) Occurrence of *Ornithodoros brasiliensis* Aragão (Acari: Argasidae) in São Francisco de Paula, RS, Southern Brazil. *Neotropical Entomology*, 40, 143–144.
- Nava, S., Guglielmone, A.A. & Mangold, A.J. (2009) An overview of the systematics and evolution of ticks. *Frontiers in Bioscience*, 14, 2857–2877. DOI: 10.2735/3418.
- Ronquist, F. & Huelsenbeck, J.P. (2003) Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*, 19, 1572–1574.
- Swofford, D.L. (2002) PAUP* Phylogenetic Analysis Using Parsimony (* and Other Methods). Version 4.b10. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts.
- Venzal, J.M. & Estrada-Peña, A. (2006) Larval feeding performance of two Neotropical *Ornithodoros* ticks (Acari: Argasidae) on reptiles. *Experimental and Applied Acarology*, 39, 315–320.