

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
VETERINÁRIAS
CURSO DE MESTRADO**

**STATUS DA SUSCETIBILIDADE DE *RHIPICEPHALUS
MICROPLUS* A IVERMECTINA, FIPRONIL E FLUAZURON EM
MATO GROSSO DO SUL**

LUIZA MENDES VALSONI MASSENA

CAMPO GRANDE, MS

2018

LUIZA MENDES VALSONI MASSENA

**STATUS DA SUSCETIBILIDADE DE *RHIPICEPHALUS*
MICROPLUS A IVERMECTINA, FIPRONIL E FLUAZURON EM
MATO GROSSO DO SUL**

Exame de Qualificação apresentado
ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Veterinárias como requisito
parcial para obtenção do título de
Mestre em Ciências Veterinárias.

Orientador: Prof. Dr. Fernando de
Almeida Borges

CAMPO GRANDE, MS

2018

*“Só se pode alcançar um grande êxito quando nos mantemos fiéis a
nós mesmos.”*

Friedrich Nietzsche

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, que se fez presente em todos os momentos da minha trajetória, por iluminar meu caminho e me conceder força e sabedoria para superar todos os obstáculos.

Ao meus pais, João Luiz Valsoni, pelo seu carinho, amor e por ser um exemplo para mim desde sempre, e Silvana Valsoni pela educação e valores que me foram passados. Os dois são responsáveis pelo que sou hoje.

Ao meu marido e amigo Michael Douglas Bellinate Massena, agradeço ao apoio, carinho e companheirismo desde o início desta jornada. Obrigada por acreditar em mim mesmo quando nem eu acreditava.

A minha vó Hildicéia Mendes, que esteve do meu lado durante todos esses anos, agradeço pela paciência e incentivo.

Agradeço ao meu orientador Prof^o Dr^o Fernando Borges, pela paciência e por todo conhecimento que foi passado a mim.

A equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias da FAMEZ-UFMS, por todo auxílio, amizade, alegrias e apoio durante esses dois anos, em especial a Mariana Green, por ser uma grande amiga e excelente profissional.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma me auxiliaram neste projeto e na execução desta pesquisa, agradeço.

RESUMO

Estudos realizados para a avaliação da resistência do carrapato visam um efetivo controle desse parasito, porém, as avaliações *in vitro* de princípios ativos de aplicação via *pour on* ou injetáveis ainda são escassos. Relata-se pela primeira vez um isolado de campo de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, multirresistente a todas as classes de acaricidas e algumas associações por meio de testes *in vitro*. Foi constatada a resistência desse isolado a treze carrapaticidas e dois produtos químicos demonstraram-se eficazes. Também foi realizada a avaliação do perfil de resistência de dez isolados de campo de *Rhipicephalus microplus* aos acaricidas fluazuron, fipronil e ivermectina, em rebanhos bovinos em Mato Grosso do Sul. As avaliações dos produtos pulverização foram feitas pelo teste de imersão de adultas (TIA) convencional, o fluazuron foi avaliado por meio de um TIA modificado e o teste de imersão de larvas (TIL) foi utilizado para a avaliação do fipronil e ivermectina. Foram recebidas amostras de dez propriedades em Mato Grosso do Sul, sendo constatada a resistência em oito isolados de campo ao fluazuron e, em relação ao fipronil e ivermectina, observou-se resistência em quatro isolados e houve resistência incipiente nos outros seis isolados. Com os resultados obtidos em ambos os estudos foi possível observar que grande parte das populações do carrapato-do-boi em Mato Grosso do Sul se encontram resistentes aos principais acaricidas, aplicados via *pour-on*, utilizados para o controle dos carrapatos.

Palavras-chave: acaricidas; carrapatos; controle químico; teste de imersão de adultos; teste de imersão de larvas.

ABSTRACT

Studies carried out for the evaluation of tick resistance aim at an effective control of this parasite, however, in vitro evaluations of active principles of pour or injection are still scarce. A field isolate from Campo Grande, Mato Grosso do Sul, is reported for the first time, multiresistant to all classes of acaricides and some associations through in vitro tests. The resistance of this isolate to thirteen carrapaticides was verified and two chemical products proved to be effective. The evaluation of the resistance profile of ten field isolates of *Rhipicephalus microplus* to the acaricides fluazuron, fipronil and ivermectin in bovine herds in Mato Grosso do Sul was evaluated. The spraying evaluations were done by the adult immersion test (TIA) Fluazuron was evaluated by means of a modified TIA and the larval immersion test (TIL) was used for the evaluation of fipronil and ivermectin. Samples were collected from ten properties in Mato Grosso do Sul, where resistance was observed in eight field isolates of fluazuron and, in relation to fipronil and ivermectin, resistance was observed in four isolates and there was incipient resistance in the other six isolates. With the results obtained in both studies, it was possible to observe that most of the populations of the tick-of-ox in Mato Grosso do Sul are resistant to the main acaricides, applied via pour-on, used for the control of ticks.

Key-words: acaricides; ticks; chemical control; adult immersion test; test of immersion of larvae.

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	8
2.	OBJETIVOS.....	10
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	11
3.1.	<i>Rhipicephalus microplus</i>	11
3.2.	Importância econômica.....	11
3.3.	Controle químico.....	12
3.3.1.	Fluazuron.....	12
3.3.2.	Fipronil.....	12
3.3.3.	Ivermectina.....	13
3.4.	Resistência de <i>R. microplus</i> a ivermectina, fipronil e fluazuron no Brasil.....	13
3.5.	Diagnóstico da resistência dos carrapatos aos acaricidas.....	14
4.	REFERÊNCIAS.....	15
5.	ARTIGO 1.....	19
6.	ARTIGO 2.....	32

1. INTRODUÇÃO

O carrapato-do-boi, *Rhipicephalus microplus*, é um ectoparasito que tem como hospedeiro, preferencialmente, os bovinos. É responsável por grandes prejuízos econômicos, como redução na produção de leite, danos ao couro, redução do ganho de peso, imunossupressão (HORN, 1983), além da transmissão de patógenos como *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina* (SMITH e KILBORNE, 1892). O impacto na produção causado pelo *R. microplus* gera prejuízos de aproximadamente US\$ 3.236,35 bilhões no Brasil (GRISI et al. 2014).

O principal método de controle de infestações de carrapatos é por meio de produtos químicos, a via de ação dos acaricidas podem ser por contato, sendo as classes mais utilizadas no Brasil os organofosforados, formamidinas, piretróides e fenilpirazoles (fipronil), ou sistêmicos, as lactonas macrocíclicas (ivermectina) e benzoilfeniluréias (fluazuron) (SINDAN, 2013).

O desenvolvimento da resistência se inicia com uma mutação genética na população dos parasitos (SUTHERST; COMMINS, 1979), fato que se agrava com a utilização dos acaricidas em larga escala de modo indiscriminado promovendo uma seleção de carrapatos geneticamente resistentes aos produtos químicos (STONE, 1972).

O primeiro relato de um isolado resistente ao fluazuron foi em um estudo de Reck et al. (2014) por meio do Teste de Imersão de Adultas (TIA), com a padronização da técnica, o que tornou possível a sua reprodução em outros laboratórios. Castro-Janer et al. (2009) constataram que o Teste de Imersão de Larvas (TIL) foi a melhor técnica para o diagnóstico da resistência dos carrapatos ao fipronil. A resistência dos carrapatos a ivermectina foi relatada pela primeira vez por Martins e Furlong (2001) no Rio Grande do Sul por meio de teste *in vivo*, e por técnicas *in vitro* por Klafke et al. (2006; 2012).

Até o momento, a maioria dos estudos do perfil de resistência do carrapato do boi a acaricidas são com formulações comerciais via pulverização, porém poucas avaliações utilizam testes *in vitro* com acaricidas que são aplicados de forma *pour-on* ou injetável. Por isso, há escassez de estudos para a detecção da resistência dos carrapatos aos fármacos ivermectina, fipronil, fluazuron e que abordem todas as

classes e suas associações, que resulta em um desconhecimento do real cenário atual da resistência de *R. microplus*.

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil da resistência de isolados de campo de *Rhipicephalus microplus* em bovinos de Mato Grosso do Sul, Brasil aos acaricidas fluazuron, fipronil e ivermectina que são aplicados via *pour on* por meio de testes *in vitro*.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. *Rhipicephalus microplus*

O “carrapato-do-boi”, que tem como sua origem a Ásia (HOOGSTRAAL e KIM, 1985), possui distribuição mundial, afeta principalmente a região neotropical, atinge o Brasil, Paraguai, Uruguai, norte da Argentina, Colômbia, estende-se até o México (ESTRADA-PEÑA, 1999; et al. 2006). É um ectoparasito do gado bovino preferencialmente, porém podem parasitar outros animais, como os bubalinos, equinos, ovinos, caprinos (RIEK, 1959) e cervídeos (BECHARA et al. 2000).

O local de predileção destes parasitos em seu hospedeiro são: regiões ventrais como bolsa escrotal, barbela, parte interna das patas, pavilhão auricular (CORDOVÉS, 1997), tórax, axilas e tábua do pescoço, a preferência por estes locais se dá pela temperatura local e espessura da pele, além da dificuldade dos animais lamberem estes locais (WAGLAND, 1978).

3.2. Importância econômica

Infestações maciças por carrapatos resultam em grandes perdas, causadas por lesões no couro do animal pela fixação das larvas, substâncias em sua saliva geram uma reação anticoagulante local, resultando em inflamação, prurido, edema, pontos de necrose e ulceração (PEREIRA, 1982; LIMO et al. 1991). O prejuízo causado por *R. microplus* também se deve pela diminuição da produção dos bovinos, em decorrência do estresse causado nas infestações, anemia devido às perdas diárias de sangue para a alimentação destes parasitos (FORTES, 1997), diminuição da produção de leite, redução da conversão alimentar tendo como consequência a diminuição do ganho de peso e imunossupressão (HORN, 1983).

O estresse e a diminuição da imunidade dos bovinos são fatores que tem como consequência uma predisposição a patologias, principalmente a Tristeza Parasitária Bovina, já que o carrapato-do-boi é um transmissor da *Anaplasma marginale*, *Babesia bovis* e *B. bigemina*, agentes etiológicos desta doença (SMITH e KILBORNE, 1892).

Em um estudo realizado por Grisi et al. (2014) foi realizada a avaliação do impacto econômico de parasitos de bovino no Brasil, sendo relatado que o prejuízo econômico atribuído aos bovinos pelo *R. microplus* é de aproximadamente \$ 3,24 bilhões de dólares por ano.

3.3. Controle químico

Na tentativa de diminuir esse prejuízo econômico e preservar a saúde animal é necessário o controle desses ectoparasitos nos bovinos, o principal método utilizado nesse combate é com uso de acaricidas. Os carrapaticidas podem ser aplicados por via tópica, por pulverização, banhos de imersão ou aplicação dorsal (*pour on*), ou por via parenteral (subcutânea). Esses fármacos são classificados quanto sua via de ação, agindo por contato, sendo as principais classes os organofosforados, os piretróides, as amidinas e os fenilpirazois. Já as lactonas macrocíclicas e as benzoilfenilureias são acaricidas que agem de forma sistêmica, sendo metabolizados e distribuídos por toda a corrente sanguínea do animal (FURLONG et al. 2007).

3.3.1. Benzofenilureias (Fluazuron)

O fluazuron é um inibidor da síntese da quitina, que atua na cutícula dos carrapatos, impedindo a ecdise desses parasitos e afeta também a eclosão dos ovos (FURLONG et al. 2007). Começou a ser comercializado no Brasil em 1994, sendo indicado para o controle dos carrapatos pois possui alta especificidade, baixa toxicidade para os mamíferos e longo período de ação (RETNAKARAM e WHIGHT, 1987).

3.3.2. Fenilpirazoles (Fipronil)

O fipronil é um inseticida que começou a ser utilizado em 1990 no controle de carrapatos e moscas (GUGLIELMONE et al. 2000; ALBERTI et al. 2001). É um acaricida que age por contato (MEDINA et al. 2003), aplicado na forma "*pour on*" (FURLONG et al. 2007). Atua por meio do bloqueio dos canais de cloro, afetando o sistema nervoso dos artrópodes, resultando em sua morte (COLE et al. 1993; DURHAN et al. 2001).

3.3.3. Lactonas Macrocíclicas (Ivermectina)

Um dos acaricidas mais utilizados para o controle de infestações por *R. microplus* (MENDES et al. 2011), a ivermectina é um antiparasitário da classe das lactonas macrocíclicas, além de ser um acaricida também possui ação contra insetos e nematodas. Age por meio da abertura dos canais de cloro, promove o bloqueio dos impulsos nervosos nos parasitas e causa a morte por paralisia do parasito (GEARY et al. 1993). Esse fármaco, que age de forma sistêmica, pode ser aplicado por via “*pour on*” ou injetável (FURLONG et al. 2007).

A ivermectina possui longo período residual, este fato aliado ao uso deste fármaco por longos períodos pode desencadear a seleção de uma população de carrapatos resistentes, que dificulta o controle desses parasitos (KUNZ e KEMP, 1994).

3.4. Resistência de *R. microplus* a ivermectina, fluzuron e fipronil no Brasil

O desenvolvimento da resistência se inicia com uma mutação em um alelo da população dos parasitos que ocorre de forma aleatória. Os tratamentos aplicados a esta população matam todos os indivíduos suscetíveis, que não possuem esta alteração genética, aumenta-se a frequência do alelo resistente em toda a população e tem como consequência a não eficiência do acaricida utilizado no controle (STONE, 1972; SUTHERST e COMMINS, 1979)

Os relatos da resistência a este princípio ativo têm aumentado nos últimos anos, sendo constatado por técnicas *in vitro* (Reck et al. 2014), e *in vivo* por Maciel et al. (2016).

A resistência de *R. microplus* ao fipronil foi constatada pela primeira vez por meio de testes *in vitro* por Castro e Janer et al. (2009), em populações do Brasil e Uruguai.

O primeiro relato da resistência dos carrapatos a ivermectina no Brasil, foi em um estudo de Martins e Furlong (2001) por meio de teste a campo, no Sul do país. Posteriormente, foi relatado por Klafke et al. (2006; 2012) a resistência detectada por técnica *in vitro*.

3.5. Diagnóstico da resistência dos carrapatos aos acaricidas

A resistência dos carrapatos aos acaricidas pode ser detectada por bioensaios *in vivo*, *in vitro* ou por técnicas moleculares. As técnicas *in vivo* são realizadas com infestações controladas em bovinos, sendo divididos em grupos, um recebe o tratamento com a droga avaliada e o outro não recebe tratamento, posteriormente são avaliadas o número e peso das teleóginas, oviposição e eclosão dos ovos. São consideradas técnicas de referência, porém, possuem desvantagens pelo tempo na aplicação dos testes, gasto com materiais, a manutenção dos animais utilizados, entre outros fatores (CASTRO-JANER, 2010).

As técnicas *in vitro* são de baixo custo e simples na sua execução (SCOTT, 1995), são utilizadas as adultas no Teste de Imersão de Adultas (TIA) (DRUMMOND et al. 1973) ou larvas no Teste de Imersão de Larvas (TIL) (SHAW, 1966) ou Teste de Pacote com Larvas (TPL) (STONE E HAYDOCK, 1962).

Para a ivermectina, foi relatado por Klafke et al. (2006) que o TIL foi a técnica que se demonstrou mais eficaz para o diagnóstico da resistência das populações de campo de *R. microplus*. No estudo de Castro-Janer et al. (2009) também ficou comprovado que o TIL foi mais sensível da detecção da resistência ao fipronil. A técnica indicada pela FAO (2004) para o diagnóstico da resistência ao fluazuron é o TIA, que foi modificado por Reck et al. (2014).

4. REFERÊNCIAS

- ALBERTI, H.; ALBERTI, A.L.L.; RINALDI, P.L.F.; LAMBERTI, D.D.G.; RODRÍGUEZ, L.G.; LIMA, G.L. Avaliação da eficácia do fipronil e da deltametrina, formulação “pour-on”, no controle da *Haematobia irritans*, parasitando bovinos em regime de campo, na região oeste do Estado de São Paulo. **A Hora Veterinária**. 20, p. 48–51, 119. 2001.
- BECHARA, G. H.; SZABÓ, M.P.J.; DUARTE, J. M. B.; MATUSHIMA, E. R.; CAMPOS-PEREIRA, M.; REHAV, Y.; KEIRANS, J. E.; FIELDEN, L. J. Ticks associated with wild animals in the Nhecolandia Pantanal, Brazil. **Ann. N. Y. Academy Sci.**, v. 916, p.289-297, 2000.
- CASTRO-JANER, E. A. Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) a fipronil: padronização de bioensaios *in vitro*, detecção de resistência em populações de campo e avaliação sobre resistência cruzada com outras drogas. Tese. São Paulo. 2010.
- CASTRO-JANER, E. A., RIFRAN, L., PIAGGIO, J., GIL, A., MILLER, R.J., SCHUMAKER, T.T.S. In vitro tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. **Vet. Parasitol.** v.162, p. 120–128. 2009.
- CASTRO-JANER, E. A.; RIFRAN, L.; GONZÁLEX, P.; NIELL, C.; PIAGGIO, K.; GIL, A.; SCHUMAKER, T.T. Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. **Vet Parasitol.** 2010.
- COLE, L.M.; NICHOLSON, R.A.; CASIDA, J.E. Action of phenylpyrazole insecticides at the GABA-gated chloride channel. **Est. Biochem. Physiol.** v. 46, p. 47–54. 1993.
- CORDOVÉS, C.O. Carrapato: controle ou erradicação. 2. ed. **Guaíba: Agropecuária**, p. 177, 1997.
- DE CASTRO, J.J., NEWSON, R.M. Host resistance in cattle tick control. **Parasitol.** 9: p.13-17, 1993.
- DRUMMOND, R.O., ERNST, S.E., TREVINO, J.L., GLADNEY, W.J., GRAHAM, O.H., *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides. **J. Econ. Entomol.** v. 66, p. 130–133. 1973.

- DURHAM, E.W.; SCHARF, M.E.; SIEGFRIED, B.D. Toxicity and neurophysiologic effects of fipronil and its oxidative sulfone metabolite on European corn borer larvae (*Lepidoptera: Crambidae*). **Pestic. Biochem. Physiol.** v. 71, 97–106. 2001.
- ESTRADA-PEÑA, A. Geostatistics and remote sensing using NOAA-AVHRR satellite imagery as predictive tools in tick distribution and habitat suitability estimations for *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in South America. **Vet. Parasitol.** 81, p. 73- 82, 1999.
- ESTRADA-PEÑA, A.; BOUATTOR, A.; CAMICAS, J. L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Expo. App. Acarol.**, v.38, p. 219 – 235. 2006.
- FAO (FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION). **Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines.** Animal Production and Health Division, Roma. 53 p., 2004.
- FORTES, E. *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) In: FORTES, E. **Parasitol. Vet.** 3 ed. São Paulo: Ícone, p. 580-584. 1997.
- FURLONG, J.; MARTINS, J.R.; PRATA, M.C.A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, p. 26-32, 2007.
- GEARY, T. G.; SIMS, S.M.; THOMAS, E.M.; VANOVER, L.; DAVIS, J. P; WINTERROWD, C.A.; KLEIN, R. D.; HO, B.F.; THOMPSON, D.P. *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. **Exp. Parasitol.**, v. 77, p. 88-96, 1993.
- GRISI, L.; LEITE, R.C.; MARTINS, J.R.S.; BARROS, A.T.M.; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P.H.D., BARROS A.T.M., ANDREOTTI R., CANÇADO P.H.D., LEÓN, A.A.P., PEREIRA, J.B., VILLELA, H.S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Braz. J. Vet. Parasitol.** Jaboticabal; 23 (2): p. 150-156. 2014.
- GUGLIELMONE, A.A.; VOLPOGNI, M.M.; MANGOLD, A.J.; ANZIANI, O.S.; CASTELLI, M.C. Evaluación de una formulación comercial “pour on” con fipronil al 1% para el control de *Haematobia irritans* em vaquillonas Holando naturalmente infestadas. **Veterinária.** (Argentina) 17, p. 108–113. 2000.

- HOOGSTRAAL, H; KIM, K. C. Tick and mammalco-evolution, with emphasison *Haemaphysalis*. In: KIN, K. C. **Coevolution of parasitic artropods and mammals**. New York: Wiley& Sons, 569p. 1985.
- HORN, S. C. Prováveis prejuízos causados pelos carrapatos. **Bol. Def. Sanitária Anim.** 79p., 1983.
- KLAFKE, G.M.; CASTRO-JANER, E.; MENDES, M.C.; NAMINDOME, A., SCHUMAKER, T.T. Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol.** 184 (2–4), p. 212–220. 2012.
- KLAFKE, G.M.; SABATINI, G.A.; ALBUQUERQUE, T.A. de; MARTINS, J. R.; KEMP, D. H.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. T. S. Larval Immersion Tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.** v. 142, p. 386-390, Dec. 2006.
- KUNZ, S. E.; KEMP, D.H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. **Rev. Sci. Technol. OIE.** V. 13, p. 1249 – 1286, 1994.
- LIMO, M. K.; VOIGT, W. P.; TUMBO-OERI, A.G.; NJOGU, R. M.; OLE-MOIYOI, O.K. Purification and characterization of an anticoagulant from the salivary glands of the ixodid tick *Rhipicephalus appendiculatus*. **Experimental Parasitology**; v.72, n. 4, p. 418-29, 1991.
- MACIEL, W. G.; LOPES, W. D. Z.; GOMES, L. V. C.; CRUZ, B. C.; FELIPPELLI, G.; SANTOS, I. B. D.; BORGES, F. A.; JUNIOR, W. A. G.; SCARPA, A. B.; NICARETTA, J. E.; BASTOS, T. S. A.; COSTA, A. J. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to fluazuron(2.5 mg/kg) and a combination of novaluron(2.0 mg/kg) + eprinomectin (0.36 mg/kg) in field studies in Brazil. **Preventive Veterinary Medicine**; v. 135, p. 74-86, 2016.
- MARTINS, J. R.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **Vet. Rec.**, v. 149, n. 2, p.64, 2001.
- MEDINA, P.; BUDIA, F.; DEL ESTAL, P.; ADÁN, A.; VIÑUELA, E. Toxicity of fipronil to the predatory lace wing *Chrysoperla carnea* (Neuroptera: Chrysopidae). **BiocontrolSci. Technol.** 14, 261–268. 2003.
- MENDES, M. C.; LIMA, C.K.; NOGUEIRA, A. H.; YOSHIHARA, E.; CHIEBAO, D. P.; GABRIEL, F. H.; UENO, T. E.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G. M. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus*

(*Boophilus microplus*) (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.**, 2011.

PEREIRA, M. C. *Boophilus microplus*: revisão taxonômica e morfológica. Rio de Janeiro: Químio Divisão Veterinária, 167 p., 1982.

RECK, J.; KLAFKE, G.M.; WEBSTER, A.; DALL'ANGOL, B.; SCHEFFER, R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Vet. Parasitol.** 201. p. 128–136. 2014.

RETNAKARAM, A. WHIGHT, J. E. Control of insect pests with benzoylphenyl ureas. In: WHRIGHT, J. E., RETNAKARAN, A. (Eds.), Chitin and Benzoylphenyl Ureas. W. Junk, Boston, p. 205 – 282. 1987.

RIEK, R. F. Studies on the reaction of animals to infestation with ticks. V. Laboratory animals as hosts for the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini). *Aust. J. Agric. Res.*, v. 10, p. 614-619, 1959.

SHAW, R.D. Culture of na organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum. **Bull. Entomol. Res.** 56, p. 398–405. 1966.

SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal). *Compêndio de Produtos Veterinários SINDAN*. 2013.

SMITH, T.; KILBORNE, K. L. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. **Bull. Bur. Anim. Med. U.S. De. Agric.**, v.1, p.1-103. 1892.

STONE, B.F.; HAYDOCK, R.P. A method for the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Bull. Entomol. Res.** 53, p. 563–578. 1962.

STONE, B. D. The genetics of resistance by ticks to acaricides. **Australian Veterinary Journal**, Brunswick, v. 48, 537, 1978.

SUTHERST, R. W.; COMINS, H. N. The management of acaricide resistance in the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae), in Australia. **Bull Entomol. Res.** v. 69: p. 519-540. 1979.

WAGLAND, B. M. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. III. Growth on previously unexposed animals. **Aus. J. Agric. Res.**, v.29, p. 401-409, 1978.

5. ARTIGO 1

Normalizado segundo o periódico: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (RBPV)

http://cbpv.org.br/rbpv/normas/rbpv_v24n1_normas_PT.pdf

Resistência a todos os grupos químicos acaricidas de um isolado de *Rhipicephalus microplus* em Mato Grosso do Sul, Brasil

Luiza Mendes Valsoni^{1*}, Mariana Green de Freitas¹, Jéssica Teles Echeverria¹, Dyego Gonçalves Lino Borges¹, Fernando de Almeida Borges¹

¹Laboratório de Doenças Parasitárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

ABSTRACT

The objective of this study was to diagnose the resistance of tick-of-ox to systemic acaricides and that act by contact in a property in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. Adult immersion tests were used to evaluate the commercial formulations of the organophosphorus, amidines, pyrethroids, their associations and fluazuron, and the immersion test of larvae with ivermectin and fipronil. The resistance to the acaricides was detected in all chemical classes administered alone, with effective products of 3.2% (Amitraz), 34.2% (Dichlorvos + Cypermethrin), 14.6% (Chlorpyrifos 5g + Cypermethrin 2g), 72.9% (Deltamethrin), 60.3% (Cypermethrin), 70,2% (Cypermethrin 15g + Chlorpyrifos 25g + Citronella 1g), 20.5% (Dichlorvos + Chlorpyrifos), 0% (Chlorpyrifos), 46.2% (Ethion + Chlorpyrifos + Cypermethrin), 51.5% (Cypermethrin 15g + Chlorpyrifos 25g + Citronella 1g), only two associations, one containing two types of organophosphates and one pyrethroid (Chlorpyrifos + Cypermethrin + Fenthion) and another with a high concentration of organophosphates + pyrethroid (Chlorpyrifos 50g + Cipermetrine 6g) were still effective at 100% and 96.3%, respectively. Resistance to fluazuron, ivermectin (Resistance factor = 3.08) and fipronil with (FR = 3.18) were also observed. The results obtained with the present study indicate an isolated of ox-ticks with resistance to all classes of existing contact or systemic acaricides and associations between pyrethroids and organophosphates.

Keywords: tick-of-ox; control; adult immersion test; immersion test of larvae.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a resistência do carrapato-do-boi a acaricidas sistêmicos e que agem por contato em uma propriedade em Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Foram utilizados testes de imersão de adultas para a avaliação de formulações comerciais das

classes organofosforados, amidinas, piretróides, suas associações e fluazuron, e o teste de imersão de larvas com ivermectina e fipronil. A resistência aos acaricidas foi detectada a todas as classes químicas administradas isoladamente, com eficácia dos produtos de 3,2% (Amitraz), 34,2% (Diclorvós + Cipermetrina), 14,6% (Clorpirifós 5g + Cipermetrina 2g), 72,9% (Deltametrina), 60,3% (Cipermetrina), 70,2% (Cipermetrina 15g + Clorpirifós 25g + Citronela 1g), 20,5% (Diclorvós + Clorpirifós), 0% (Clorpirifós), 46,2% (Ethion + Clorpirifós + Cipermetrina), 51,5% (Cipermetrina 15g + Clorpirifós 25g + Citronela 1g). Apenas duas associações, uma contendo dois tipos de organofosforados e um piretróide (Clorpirifós + Cipermetrina + Fenthion) e outra com elevada concentração de organofosforado + piretróide (Clorpirifós 50g + Cipermetrina 6g) apresentaram eficácia de 100% e 96,3%, respectivamente. Também foi constatada a resistência a fluazuron, ivermectina (Fator de resistência = 3,08) e fipronil com (FR = 3,18). Os resultados obtidos com o presente estudo indicam um isolado de carrapato-do-boi com resistência a todas as classes de acaricidas por contato ou sistêmico existentes e algumas associações entre piretróides e organofosforados.

Palavras-chave: carrapato-do-boi; controle; teste de imersão de adultos; teste de imersão de larvas.

INTRODUÇÃO

Rhipicephalus microplus, também conhecido como carrapato-do-boi, é um ectoparasita pertencente à família Ixodidae que tem como principal hospedeiro o bovino (PATARROYO et al. 2002). Encontrado principalmente em regiões tropicais e subtropicais (WILLADSEN & JONGEJAN, 1999), cerca de 80% dos bovinos no mundo estão expostos ao carrapato-do-boi, segundo Grissi et al. (2002).

Há uma perda de aproximadamente US\$ 3,24 milhões por ano no Brasil devido ao parasitismo de *R. microplus*. Os prejuízos são verificados, principalmente, pela diminuição da produção de leite e queda no ganho de peso, danos ao couro, gastos com carrapaticidas, entre outros fatores, como afirmam Grisi et al. (2014). Além da diminuição produtiva dos bovinos, o carrapato-do-boi transmite, durante o repasto sanguíneo, agentes como *Babesia* sp. e *Anaplasma marginale*, que causam a Tristeza Parasitária Bovina (SMITH & KILBORNE, 1893).

Em geral, o controle dos carrapatos se dá por meio do controle químico, com o uso de acaricidas (KUNZ & KEMP, 1994). Os grupos químicos que podem ser utilizados neste controle são os organofosforados, amidinas (amitraz), piretróides, lactonas macrocíclicas, fenilpirazois (fipronil) e benzoilfenilureias (fluazuron) (KLAFKE et al. 2012). Por meio do uso inadequado destes fármacos, falhas no controle dos carrapatos são verificadas devido à

resistência, condição associada a fatores como a pressão de seleção imposta pela aplicação dos acaricidas (CONWAY & COMINS, 1979).

Relatos de populações de carrapatos resistentes a acaricidas são frequentes no Brasil, Higa et al. (2016) relatam em seu estudo que 47,64% das 28 propriedades avaliadas em Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Ceará, São Paulo, Minas Gerais e Distrito Federal, foram resistentes aos acaricidas avaliados. Estudos recentes utilizando técnicas *in vitro*, têm demonstrado a existência de isolados resistentes à ivermectina (KLAFKE et al. 2006), fipronil (CASTRO-JANER et al. 2009), e recentemente Reck et al. (2014) relatou um isolado resistente a cipermetrina, clorpirifós, fipronil, amitraz, ivermectina e pela primeira vez ao fluazuron. Os relatos de isolados resistentes atualmente não apresentam avaliações de acaricidas de atuação sistêmica e de associações das classes em cada isolado de carrapatos monitorado, ficando com uma deficiência de informações importantes para um eficaz controle do carrapato-do-boi.

O objetivo do presente estudo foi avaliar a resistência de todas as bases químicas de acaricidas que atuam por contato ou por modo sistêmico por meio de bioensaios *in vitro* em um isolado de carrapatos de bovinos em Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

MATERIAIS E MÉTODOS

Propriedade de origem dos carrapatos

Os carrapatos foram coletados de bovinos em uma propriedade produtora de leite, localizada no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil. Foram utilizados bovinos da raça Holandesa e Jersey, naturalmente infestados, dos quais, foram coletadas aproximadamente 300 teleóginas para realizar o Teste de Imersão de Adultas (TIA) e Teste de Imersão de Larvas (TIL).

A fazenda possui um histórico de utilizar todas as classes de acaricidas no controle de *Rhipicephalus microplus*, com diferentes produtos comerciais e formulações. Todas as classes de acaricidas avaliadas no presente estudo já foram utilizadas na propriedade. Um das atividades econômicas nesta propriedade era a comercialização de animais adquiridos em fazendas no Rio Grande do Sul e, no momento da chegada dos bovinos, era realizada aspersão de acaricidas que atuam por contato, caso fosse constatado a infestação de carrapatos. Não era realizada a quarentena dos animais provenientes de outras propriedades. Os produtos comerciais de pulverização não eram preparados como informa a bula, sem precisão na diluição em água. Os animais eram tratados frequentemente com acaricidas, com pulverizações semanais. Formulações *pour-on* a base de fipronil, fluazuron e formulações injetáveis de ivermectina também eram administradas com frequência e as recomendações dos fabricantes quanto à dosagem não eram respeitadas. Os relatos de falhas no tratamento

ocorriam com frequência. A molécula ivermectina além de ser usada no controle de ectoparasitas, também era utilizada para o controle de endoparasitas na propriedade.

Cepa susceptível de *Rhipicephalus microplus*

Para a realização de testes pareados, foi utilizada a cepa Porto Alegre (POA), caracterizada como suscetível aos carrapaticidas. Esta população foi coletada no Uruguai em 1992, e atualmente é mantida na Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Foram enviadas para a Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) larvas desta cepa, que foi mantida por meio de infestações controladas em um bovino. As teleóginas e larvas POA foram utilizadas como padrão de referência, nos testes com fipronil, ivermectina e fluazuron, nos cálculos dos fatores de resistência nas diferentes técnicas utilizadas no presente trabalho, conforme estabelecido por Castro-Janer et al. (2009).

Acaricidas

Para os testes, foram utilizados os seguintes grupos químicos: ivermectina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), fipronil e fluazuron ($\geq 98\%$ HPLC, doados por Ouro Fino Saúde Animal®, Brasil), Amitraz 12,5g diluição 1:500 (Triatox – MSD Saúde Animal®), Diclorvós 45g + Cipermetrina 5g diluição 1:400 (Alatox – FORT DODGE®), Clorpirifós 5g + Cipermetrina 2g diluição 1:800 (Aspersin – BiogénesisBagó®), Deltametrina 2,5g diluição 1:1000 (Butox – MSD Saúde Animal®), Cipermetrina 15g diluição 1:1000 (Barrage – FORT DODGE®), Cipermetrina 15g + Clorpirifós 25g + Citronela 1g diluição 1:800 (Colosso – Ouro Fino Saúde Animal®), Diclorvós 60g + Clorpirifós 20g diluição 1:400 (Ectofós - Vallé®), Clorpirifós 15g diluição 1:1000 (Flytick - Vallé®), Ethion 20g + Clorpirifós 10,6g + Cipermetrina 6,2g diluição 1:400 (Potenty – MSD Saúde Animal®), Cipermetrina 15g + Clorpirifós 25g + Citronela 1g diluição 1:800 (Couro Limpo – Noxon Divisão Veterinária®), Clorpirifós 30g + Cipermetrina 15g + Fenthion 15g diluição 1:800 (Colosso FC30 – Ouro Fino Saúde Animal®) e Clorpirifós 50g + Cipermetrina 6g diluição 1:600 (Flytion – Clarion Biociências LTDA®). Todos os acaricidas avaliados foram escolhidos por abranger as classes químicas existentes no mercado e suas associações.

Bioensaios

Para os carrapaticidas comerciais de utilização por pulverização, foi utilizado o Teste de Imersão de Adultas (TIA) como indicado por Drummond et al. (1973).

No teste *in vitro* com o fluazuron foi utilizado o Teste de Imersão de Adultas (TIA) como descrito por Reck et al. (2014). O Teste de Imersão de larvas (TIL) modificado foi realizado para os testes com a ivermectina (KLAFKE, 2012) e fipronil (CASTRO-JANER, 2009). Cada

bioensaio foi realizado de forma pareada, sendo também realizado um ensaio com a cepa Porto Alegre (POA).

Teste de Imersão de Adultas

Foi utilizado o Teste de Imersão de Adultas (TIA) como indicado por Drummond et al. (1973) para os fármacos: Triatox®, Alatox®, Aspersin®, Butox®, Barrage®, Colosso®, Ectofós®, Flytick®, Potenty®, Couro Limpo®, Colosso FC30® e Flytion®, que agem por contato. Foi realizada a imersão por 5 minutos de grupos contendo 10 teleóginas nas formulações comerciais diluídas conforme indicado por seus respectivos fabricantes, sendo observada a ovipostura e eclosão das larvas de cada grupo comparando-a com um grupo controle imerso em água.

A avaliação da eficácia do fluazuron foi realizada por meio do TIA, como indicado pelas diretrizes da FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) para a Gestão da Resistência e Controle Integrado de Parasitas em Ruminantes (FAO, 2004), e modificado por Reck et al. (2014). O teste foi realizado com a imersão de 10 teleóginas por 1 minuto em concentrações de 500ppm, 50ppm, 5ppm, 0,5ppm e 0,05ppm do princípio ativo m duplicata, posteriormente foi avaliada a ovipostura e eclosão larval.

Teste de Imersão de Larvas

Para a avaliação do fipronil, foi utilizada o TIL como indicado por Castro-Janer (2009), com modificações: ao invés de depositar as 100 larvas diretamente nos microtubos, foram utilizados aproximadamente 100 ovos (0,05g) em microtubos até a sua eclosão, objetivando-se uma maior precisão da quantidade de larvas utilizadas no bioensaio. Os testes foram realizados nas concentrações de 3, 2.5, 2, 1.7, 1.2, 1, 0.8, 0.6, 0.5, 0.4 e 0.2 ppm para os bioensaios com fipronil, em triplicata.

Para a avaliação da ivermectina, foi utilizado o TIL como indicado por Klafke et al. (2012), com modificações semelhantes à descrita acima, as avaliações foram avaliadas em concentrações de 100, 70, 49, 34.3, 24, 16.8, 11.7, 8.2, 5.7, 4 e 2.8 ppm, em triplicata.

Análise estatística

Para a avaliação dos produtos químicos no teste de imersão de adultas, foram calculadas a eficácia reprodutiva e a eficácia do produto, como indicado por Drummond et al. (1973). O peso das teleóginas, peso dos ovos e o percentual de eclodibilidade dos ovos foram utilizados para o cálculo da eficiência reprodutiva de acordo com a seguinte fórmula:

Eficiência Reprodutiva (ER)

ER= peso dos ovos (g) x eclodibilidade (%) x 20.000 / peso das teleóginas (g)

O cálculo de eficácia dos produtos levou em consideração a eficiência reprodutiva do grupo controle e a eficiência reprodutiva dos grupos tratados:

Eficácia do Produto (EP)

$$EP = \frac{ER(\text{grupo controle}) - ER(\text{grupo tratado})}{ER(\text{grupo controle})} \times 100$$

São considerados produtos sensíveis os que possuem eficácia maior que 95% (Fernandes, 2001).

A avaliação do fluazuron foi por meio do índice de fecundidade (IFec) das teleóginas de acordo do seguinte cálculo:

Índice de Fertilidade (IFer)

$$IFer = \frac{\text{peso dos ovos (g)}}{\text{peso das teleóginas (g)}}$$

Índice de Fecundidade (IFec)

$$IFec = IFer \times \text{eclodibilidade (\%)} / 100$$

Os valores da IFec do grupo de teleóginas do isolado de campo e do grupo da cepa sensível foram submetidos a análise de variância (ANOVA) considerando apenas um fator, o tratamento, seguido do pós teste de Bonferroni.

Para o diagnóstico da resistência por meio do Teste de Imersão de Larvas foi calculado o Fator de Resistência (FR), obtido primeiramente por meio do cálculo da Concentração Letal (CL50) do isolado de campo e seu intervalo de confiança de 95%, e posterior divisão da CL50 do isolado de campo com a cepa suscetível (Cepa POA) como estabelecido por Robertson & Preisler (1992), sendo considerada susceptibilidade quando a concentração letal não apresentou diferença estatística entre a cepa suscetível, resistência incipiente quando a concentração letal fosse estatisticamente diferente da cepa suscetível sendo o fator de resistência <2 e resistente, quando a concentração letal fosse estatisticamente diferente da cepa suscetível e com fator de resistência >2 (CASTRO-JANER, 2009).

No TIA com fluazuron, o índice de fertilidade ente as cepas foi comparado pela análise de variância de um fator (one-way ANOVA), seguido pelo teste de comparação múltipla de Sidak, utilizando-se o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Os resultados do Teste de Imersão de Adultas (TIA) para os carrapaticidas comerciais de uso por pulverização estão descritos na Tabela 1. Foi observada resistência a todos os produtos, exceto as associações de Clorpirifós 30g + Cipermetrina 15g + Fenthion 15g (Colosso FC30 – Ouro Fino Saúde Animal®) e Clorpirifós 50g + Cipermetrina 6g (Flytion – Clarion

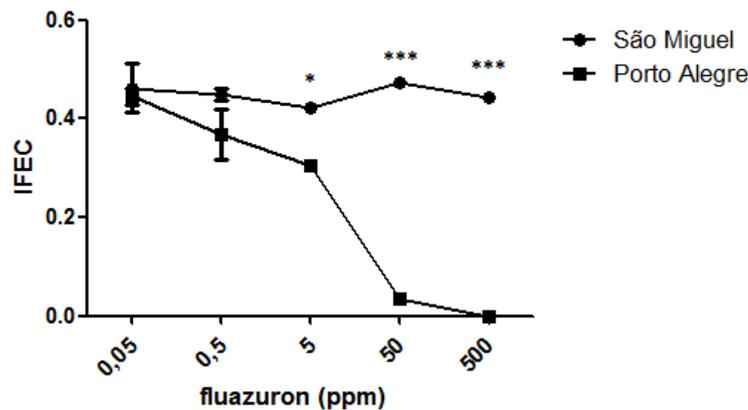
Biociências LTDA®), que apresentaram respectivamente a eficácia de 100% e 96,3%, sendo considerados produtos ainda eficazes, se utilizados na diluição recomendada pelo fabricante.

Tabela 1. Parâmetros de índice de postura, eclodibilidade e eficácia dos diferentes acaricidas de contato em um isolado de *Rhipicephalus microplus* de um rebanho localizado no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

<i>Acaricida (diluição)</i>	<i>Eclodibilidade (%)</i>	<i>Eficácia do Produto (%)</i>
Diclorvós 45g + Cipermetrina 5g (1:400)	50,00	34,20
Clorpirifós 5g+ Cipermetrina 2g (1:800)	72,66	14,60
Deltametrina 2,5g (1:1000)	27,00	72,90
Cipermetrina 15g (1:1000)	43,00	60,30
Cipermetrina 15g + Clorpirifós 25g + Citronela 1g (1:800)	26,33	70,20
Clorpirifós 30g + Cipermetrina 15g+ Fenthion 15g (1:800)	0,00	100,00
Cipermetrina 15g + Clorpirifós 25g + Citronela 1g (1:800)	43,00	51,50
Diclorvós 60g + Clorpirifós 20g (1:400)	67,00	20,50
Clorpirifós 15g (1:1000)	86,00	0
Clorpirifós 50g + Cipermetrina 6g (1:600)	8,00	96,30
Ethion 20g + Clorpirifós 10,6g + Cipermetrina 6,2g (1:400)	50,00	46,20
Amitraz 12,5g (1:500)	86,00	3,20

Foi observada diferença significativa da eficiência reprodutiva do isolado de campo quando comparada com a cepa Porto Alegre (sensível), quando expostas a fluazuron (Figura 1). A eficiência reprodutiva das teleóginas do isolado de campo não reduziu com o aumento das concentrações, sendo resistentes até mesmo na solução mais concentrada do fármaco.

Figura 1. Índices de Fecundidade (IFec) do isolado de *R. microplus* São Miguel e cepa Porto Alegre (referência sensível) obtidos por meio do Teste de Imersão de Adultas (TIA) com fluazuron grau técnico.



(* $p < 0.05$ e *** $p < 0.001$)

Quando a concentração letal de fipronil para 50% das larvas (CL₅₀) do isolado de campo (São Miguel) foi comparada com a CL₅₀ da cepa suscetível (Porto Alegre), foi observada a presença da resistência (Tabela 2), já que houve diferença significativa de acordo com o intervalo de confiança a 95% entre as concentrações letais (CL₅₀), e o fator de resistência de 3,18 (IC₉₅: 3.02 - 3.37). Os resultados obtidos por meio do TIL com as diferentes concentrações de ivermectina estão presentes na Tabela 2. Ficou comprovada a ineficácia desta molécula, com FR= 3.08 (IC₉₅: 3.06 - 3.09).

Tabela 2. Comparação dos parâmetros obtidos por meio do Teste de Imersão de Larvas (TIL) com os acaricidas fipronil e ivermectina entre um isolado de *Rhipicephalus microplus* suscetível (POA) e um isolado de campo (São Miguel) de um rebanho localizado no município de Campo Grande, Mato Grosso do Sul.

Fármaco	Isolado	Inclinação da curva (± erro)	CL ₅₀ (ppm) (IC ₉₅)	FR
Fipronil	POA	4.34 (3.18 - 5.49)	1.23 (1.15 - 1.31)	-
	São Miguel	4.34 (2.93 - 5.75)	3.92 (3.48 - 4.42)	3.18
Ivermectina	POA	3.05 (2.29 - 3.81)	17.56 (16.01 - 19.26)	-
	São Miguel	7.85 (2.81 - 12.88)	54.13 (49.10 - 59.68)	3.08

EC₅₀: concentração letal para 50% das larvas; IC₉₅: intervalo de confiança de 95%; FR= fator de resistência

DISCUSSÃO

Neste estudo foi observado um isolado de campo de *R. microplus* resistente a todas as classes de acaricidas, quando testados isoladamente e algumas associações, utilizadas no controle químico (piretróides, amitraz, organofosforados, lactonas macrocíclicas, fipronil e fluazuron). Essa informação é de fundamental importância, pois demonstrou que apenas dois acaricidas ainda podem ser utilizados na propriedade na tentativa de um controle dessa infestação. Até o

momento não há estudos que abordem todas as classes dos acaricidas e suas associações, permanecendo uma lacuna na estratégia do controle desses parasitos.

O histórico do uso indiscriminado de todas as classes de acaricidas existentes em intervalos de curto período pode ter sido um fator determinante para a falha no controle químico dos carrapatos desta propriedade (KUNZ e KEMP, 1994). Estes fatores favoreceram a ocorrência da resistência dos carrapatos que foram expostos aos diferentes fármacos diversas vezes, além do uso de forma incorreta destes, como informado no histórico da propriedade.

Há outros relatos de isolados de carrapatos multirresistentes como em um estudo relatado por Klafke et al. (2017) com diferentes populações de carrapatos diagnosticadas resistentes a cinco classes de acaricidas, porém não foi avaliada a resistência ao fluazuron e combinações de diferentes princípios ativos. Foi documentado por Fernández-Salas et al. (2012) um isolado de carrapatos em uma fazenda no México resistentes a organofosforados, piretróides, amitraz e lactonas macrocíclicas por meio das técnicas de imersão de larvas e de pacotes larvais. O presente estudo apresentou em um único isolado resistente a todas as classes de acaricidas disponíveis para o controle químico dos carrapatos e associações, sendo também avaliado por teste *in vitro* a molécula fluazuron, não avaliada nos demais relatos de múltipla resistência.

No presente estudo foi confirmada a eficácia de dois produtos comerciais, quando preparados e aplicados conforme indicado por bula. Ambos possuem em sua composição química a classe dos organofosforados, um contém uma associação destes (Clorpirifós 30g + Fenthion 15g) e o outro possui em maior quantidade um princípio ativo pertencente a essa classe (Clorpirifós 50g). Essa observação é de grande importância, uma vez que indica que os organofosforados ainda podem ser utilizados no presente isolado de campo, na tentativa de um eficaz controle desses parasitos.

Em um estudo realizado por Neto e Toledo-Pinto (2006) foram observados carrapatos resistentes aos fármacos Ectofós®, Aspersin®, Triatox®, Alatox® e Butox®, com eficiência de 81,3%, 52,5%, 20,1%, 8,2% e 0%, respectivamente. A resistência aos acaricidas que atuam por contato também foi encontrada por Higa et al. (2016) com isolados oriundos dos estados de São Paulo, Ceará, Minas Gerais e Mato Grosso do Sul, assim também como Koller et al. (2009) e Gomes et al. (2011) com populações de carrapatos em Mato Grosso do Sul, demonstrando o aumento de relatos de isolados resistentes aos acaricidas que agem por contato em Mato Grosso do Sul e no restante do Brasil.

Poucos estudos avaliam a resistência de *R. microplus* ao fipronil, ivermectina e fluazuron, até então não há relatos da avaliação da resistência aos todas as classes de acaricidas e suas associações em uma único isolado de carrapatos. O primeiro relato de resistência ao fipronil

pelo carrapato-do-boi foi descrito por Castro-Janer et al. (2009), observando um fator de resistência de 5.36 do isolado avaliado quando comparada com a cepa Mozo (sensível), já no presente estudo foi relatado um fator de 3.18 quando comparada com a cepa Porto Alegre (sensível), em ambos os estudos foi realizada a técnica de imersão de larvas. Neto e Toledo-Pinto (2006) observaram uma eficácia de 100% do fipronil, porém o autor afirma que a propriedade que originou o isolado avaliado, no município de Garça – SP, nunca utilizou o princípio ativo no rebanho. Shyma et al. (2015) relatou a presença da resistência ao fipronil pelo carrapato-do-boi encontrado nos rebanhos de bovinos e búfalos, na Índia, por meio da técnica do Teste do Pacote de Larvas (TPL), com um fator de resistência de 3.78, próximo ao encontrado na presente pesquisa.

A técnica *in vitro* mais apropriada para avaliar a eficácia da ivermectina em carrapatos é o TIL, pois é um teste sensível, podendo diagnosticar a resistência mesmo quando presente em uma baixa frequência na população (KLAFKE et al. 2012). A resistência de *R. microplus* a ivermectina foi relatada pela primeira vez no Rio Grande do Sul por Martins e Furlong (2001) por técnica *in vivo*, posteriormente por Klafke et al. (2006; 2012) por técnica *in vitro*. A relatos de resistência a ivermectina na Índia descrito no estudo de Singh et al. (2015) e no México por Fernández-Salas et al. (2012) utilizando o TIL. Nos animais da propriedade foi utilizada ivermectina tanto no controle de ectoparasitas como de endoparasitas, o que pode indicar uma resistência secundária, já que durante anos os carrapatos foram expostos ao mesmo princípio ativo diversas vezes. Este mesmo fenômeno foi reportado por Alegria-López et al. (2015) em seu estudo que determinou uma resistência simultânea para nematodas gastrintestinais e *R. microplus* em bovinos que utilizaram este princípio.

A primeira avaliação de resistência ao fluazuron com uma técnica *in vitro* foi em 2014 por Reck et al., o estudo foi realizado utilizando o Teste de Imersão de Adultas com isolados de carrapatos do Rio Grande do Sul, sendo observado e relatado pela primeira vez a resistência a esta molécula, já se mostrando ineficaz para o controle de carrapatos. Maciel et al. (2016) relataram isolados de campo resistentes ao fluazuron, avaliadas por meio de técnicas *in vivo*, foi constatado a presença de um isolado de campo já resistente ou com baixa suscetibilidade a este princípio ativo no estado de Minas Gerais, uma em São Paulo e duas em Mato Grosso do Sul.

Nesta pesquisa foi utilizada a mesma técnica, sendo diagnosticada a resistência a esse carrapaticida. No histórico da propriedade foi relatado o uso indiscriminado deste produto, o que contribui para a hipótese de que o uso incorreto dos acaricidas contribui com o aumento da pressão de seleção, resultando na ineficácia do controle.

Os bovinos na propriedade avaliada são oriundos de propriedades no Rio Grande do Sul e já vinham infestados, nesse Estado já foi relatada a resistência do carrapato-do-boi a oito classes de acaricidas (RECK et al. 2014, MACHADO et al. 2014). Com os resultados do presente estudo sugere-se que o transporte dos animais já infestados é uma possível causa da ocorrência da resistência múltipla aqui relatada.

CONCLUSÃO

Este é o primeiro relato de um isolado de campo multirresistente a todas as classes de acaricidas e algumas combinações organosforados e piretróides.

REFERÊNCIAS

- Alegría-López MA, Rodríguez-Vivas RI, Torres-Acosta JF, Ojeda-Chi MM, Rosado-Aguilar JÁ. Use of ivermectin as endoparasiticide in tropical cattle herds generates resistance in gastrointestinal nematodes and the tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 2015; 52 (2): 214-21.
- Castro-Janer EAC. *Resistência de Rhipicephalus (Boophilus) microplus (ACARI: IXODIDAE) a fipronil: padronização de bioensaios in vitro, detecção de resistência em populações de campo e avaliação sobre resistência cruzada com outras drogas* [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.
- Castro-Janer E, Rifran L, Piaggio J, Gil A, Miller RJ, Schumaker TTS. In vitro tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. *Vet Parasitol* 2009; 162, 120–128.
- Conway G R, Comins H N. Resistance to pesticides. 2. Lessons in strategy from mathematical models. *Span* 1979; 22 : 53-55.
- Drummond RO, Ernst SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory tests of insecticides. *J Economic Entomol* 1973; 66 (1): 130-133.
- FAO (Food and Agriculture Organization). Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants – Guidelines, Module 1 – Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention. Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, Rome, 2004; 25–77.
- Fernandes FF. Efeitos toxicológicos e resistência a piretroides em *Boophilus microplus* de Goiás. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2001; 53: 538-543.
- Gomes A, Koller WW, Barros ATM. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Cienc Rural* 2011; 41(8): 1447-1452.

Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, León AAP, Pereira JB, Villela HS. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 2014; 23 (2): 150-156.

Grisi L, Massard CL, Moya-Borja GE, Pereira JB. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *A Hora Veterinária* 2002; 21, (125): 8-10.

Higa LOS, Garcia MV, Barros JC, Koller WW, Andreotti R. Avaliação da resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) a diferentes formulações acaricidas utilizando amostras de propriedades brasileiras. *Rev Bras Parasitol Vet* 2016; 25 (2).

Klafke GM, Sabatini GA, Albuquerque TA de, Martins JR, Kemp DH, et al. Larval Immersion Tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 2006; 386-390.

Klafke GM, Castro-Janer E, Mendes MC, Namindome A, Schumaker, TTS. Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 2012; 184(3-4): 212-220.

Klafke G, Webster A, Agnol BD, Pradel E, Silva J, La Canal LH, Becker M, et al. Multiple resistance to acaricides in field populations of *Rhipicephalus microplus* from Rio Grande do Sul state, Southern Brazil. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2017; 8: 73-80.

Koller WW, Gomes A, Barros ATM. Diagnóstico da resistência do carrapato-do-boi a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte 2009; 25: 47.

Kunz SE, Kemp DH. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev Sci Tech* 1994; 13: 1249–1286.

Machado FA, Pivoto FL, Ferreira MST, Gregorio FV, Vogel FSF. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the western-central region of Rio Grande do Sul, Brazil: multiresistant tick. *Braz J Vet Parasitol* 2014; 23: 337-42.

Maciel EG, Lopes WDZ, Gomes LVC, Cruz BC, Felipelli G, Santos IBD, Borges FA, Junior WAG, Scarpa AB, Nicaretta JE, Bastos TSA, Costa AJ. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to fluzuron (2.5 mg/kg) and a combination of novaluron (2.0 mg/kg) + eprinomectin (0.36 mg/kg) in field studies in Brazil. *Prev Vet Med* 2016; 135: 74-86.

Martins JR, Furlong J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet Rec* 2001; 149 (2), 64.

Neto SFP, Toledo-Pinto EA. Análise da eficiência de carrapaticidas contra *Boophilus microplus* em gado leiteiro. *Rev Cien Eletron Med Vet* 2006; 07.

- Patarroyo JH, Portela RW, De Castro RO, Pimentel JC, Guzman F, Patarroyo ME, Vargas MI, Prates AA, Dias MAM. Immunization of cattle with synthetic peptides derived from the *Boophilus microplus* gut protein (Bm86). *Vet Immunol* 2002.
- Robertons LJ, Preisler KH. Pesticide bioassays with arthropods. Boca Raton, FL, USA 1992; 3 : 17-34.
- Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall'Angol B, Scheffer R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet Parasitol* 2014; 201: 128–36.
- Shyma KP, Gupta JP, Singh V, Patel KK. In Vitro Detection of Acaricidal Resistance Status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* against Commercial Preparation of Deltamethrin, Flumethrin, and Fipronil from North Gujarat, India. *J Parasitol* 2015.
- Singh NK, Prerna M, Rath SS. First report of ivermectin resistance in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Punjab districts of India. *Vet Parasitol* 2015; 30;214(1-2):192-4.
- Smith T, Kilborne K L. Investigations into the nature, causation and prevention of Texas or southern cattle fever. *Bull. Bur. Anim. Med. U.S.* 1892; 1: 1-103.
- Willadsen P, Jongejan F, Immunology of the Tick-Host Interaction and the Control of Ticks and Tick-borne Diseases. *Parasitol Today* 1999; 15(7):258-62.

6. ARTIGO 2

Normatizado segundo o periódico: Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária (RBPV)
http://cbpv.org.br/rbpv/normas/rbpv_v24n1_normas_PT.pdf

Status da resistência de *Rhipicephalus microplus* a ivermectina, fipronil e fluazuron em Mato Grosso do Sul, Brasil

Luiza Mendes Valsoni^{1*}, Mariana Green de Freitas¹, Dyego Gonçalves Lino Borges¹, Fernando de Almeida Borges¹

¹Laboratório de Doenças Parasitárias, Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil.

ABSTRACT

Few studies report the resistance of tick-to-acaricides to spray-on and injectables, this lack of information results in a failure in the strategic control of this parasite. This study aimed to evaluate the resistance profile in ten populations of *Rhipicephalus microplus* to the fluazuron, fipronil and ivermectin acaricides in cattle herds in Mato Grosso do Sul, Brazil. The resistance diagnosis was obtained through the adult immersion test (TIA) for fluazuron and larval immersion test (TIL) for the evaluation of fipronil and ivermectin. Samples were collected from ten farms in Mato Grosso do Sul. Four isolates resistant to fipronil were found in eight isolates of the field; four strains were resistant to incipient resistance, three resistant to ivermectin, four resistant and three incipient resistance. Of these ten isolates evaluated, three were resistant to only one active principle, one resistant to at least two active principles, three isolates were not considered resistant. With the results obtained, it was possible to observe that a large part of the populations of the tick-of-ox in Mato Grosso do Sul are resistant to the main carrapaticides currently available for the chemical control of ticks.

Keywords: acaricides; ticks; chemical control; adult immersion test; immersion test of larvae.

RESUMO

Poucos estudos relatam a resistência do carrapato-do-boi a acaricidas com modo de aplicação *pour on* e injetáveis, essa falta de informação resulta em uma falha no controle estratégico deste parasito. Este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de resistência em dez populações de *Rhipicephalus microplus* aos acaricidas fluazuron, fipronil e ivermectina, em rebanhos bovinos em Mato Grosso do Sul, Brasil. O

diagnóstico da resistência foi obtido por meio do teste de imersão de adultas (TIA) para o fluazuron e teste de imersão de larvas (TIL) para a avaliação do fipronil e ivermectina. Foram recebidas amostras de dez propriedades em Mato Grosso do Sul, sendo constatada a resistência em oito isolados de campo ao fluazuron e, em relação ao fipronil e ivermectina, observou-se resistência em quatro isolados e houve resistência incipiente nos outros seis isolados. Destes dez isolados avaliados, três foram resistentes a apenas um princípio ativo, um foi resistente a pelo menos dois princípios ativos, três isolados não foram considerados resistentes. Com os resultados obtidos foi possível observar que grande parte das populações do carrapato-do-boi em Mato Grosso do Sul estão resistentes aos mais recentes carrapaticidas disponíveis para o controle químico dos carrapatos.

Palavras-chave: acaricidas; carrapatos; controle químico; teste de imersão de adultos; teste de imersão de larvas.

INTRODUÇÃO

O carrapato-do-boi, *Rhipicephalus microplus*, é um ectoparasito que tem como hospedeiros os bovinos, responsável por grandes prejuízos econômicos, como redução na produção de leite, danos ao couro, redução do ganho de peso, imunossupressão que aumenta a suscetibilidade a doenças, afetando a saúde dos hospedeiros. O impacto na produção causado pelo *R. microplus* gera prejuízos de aproximadamente \$ 3.236,35 milhões de dólares no Brasil por ano (Grisi et al. 2014).

O principal método de controle de infestações de carrapatos é por meio de produtos químicos, os carrapaticidas podem ser classificados em dois tipos, o que tem ação por contato, sendo as classes mais utilizadas no Brasil os organofosforados, formamidinas, piretróides e fenilpirazoles (fipronil), ou os que tem ação sistêmica, as lactonas macrocíclicas e benzoilfeniluréias (fluazuron) (SINDAN, 2013).

A utilização dos acaricidas em larga escala e de modo indiscriminado promove uma seleção de carrapatos geneticamente resistentes aos produtos químicos (De Castro; Newson, 1993). O desenvolvimento da resistência se inicia a partir de uma mutação da população de carrapatos de forma aleatória, com os contínuos tratamentos com acaricidas a uma seleção dos carrapatos por meio da morte dos suscetíveis (Suthert e Commins, 1979).

O primeiro relato de um isolado resistente ao fluazuron foi em um estudo de Reck et al. (2014) por meio do Teste de Imersão de Adultas (TIA), padronizando a técnica *in vitro*,

sendo possível a sua reprodução em laboratórios. Posteriormente foi detectado, com bioensaios *in vivo*, a resistência de quatro isolados de campo resistentes ou com baixa suscetibilidade ao fluazuron, nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul (Maciel et al. 2016). A resistência ao fipronil foi relatada pela primeira vez por Castro-Janer et al. (2010), sendo constatado que o Teste de Imersão de Larvas (TIL) foi eleito como a técnica com maior desempenho para o diagnóstico da resistência dos carrapatos ao fipronil. A resistência dos carrapatos a ivermectina foi relatada pela primeira vez por Martins e Furlong (2001) no Rio Grande do Sul por meio de teste *in vivo*, e por técnicas *in vitro* por Klafke et al. (2006; 2012).

O diagnóstico da resistência dos carrapatos aos acaricidas é necessário para um efetivo controle químico das infestações dos bovinos. Até o momento poucos estudos relatam isolados de campo resistentes aos acaricidas que atuam de forma sistêmica, que resulta em uma falta do conhecimento atual sobre a resistência a esses fármacos. O objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil da resistência das populações de carrapatos de bovinos em Mato Grosso do Sul, Brasil aos acaricidas fluazuron, fipronil e ivermectina por meio de testes *in vitro*.

MATERIAIS E MÉTODOS

***Rhipicephalus microplus* Isolados de campo**

Foram recebidas no Laboratório de Doenças Parasitárias da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (LADPAR/FAMEZ/UFMS) 10 amostras de populações de carrapatos de bovinos de municípios em Mato Grosso do Sul, Brasil como descrito no Quadro 1. Aproximadamente 150 teleóginas eram coletadas de mais de dez bovinos aleatórios em cada propriedade para a realização dos testes *in vitro*. Na recepção das amostras, as teleóginas foram lavadas em água corrente e secas com toalhas de papel. Eram coladas em placas de petri 30 adultas para a oviposição, aproximadamente 100 ovos (0,05g) foram depositados em microtubos para após a eclosão ser realizado os testes com larvas.

Quadro 1. Informações das propriedades onde os estudos foram realizados.

<i>Isolado</i>	<i>Fazenda</i>	<i>Cidade-Estado</i>	<i>Princípios ativos já utilizados</i>
MIG	São Miguel	Campo Grande – MS	Ivermectina Fipronil Fluazuron
REN	Santa Renata	Terenos – MS	Ivermectina
CIC	São Cícero	Terenos – MS	Ivermectina Fluazuron
JOS	São José	Três Lagoas – MS	*
PED	São Pedro	Campo Grande – MS	Ivermectina Fipronil Fluazuron
CLA	Santa Clara	Nova Andradina – MS	Ivermectina Fluazuron
ESP	Boa Esperança	Rochedinho – MS	Ivermectina
HOR	Belo Horizonte	Corguinho – MS	Ivermectina Fipronil
JUL	São Julião	Campo Grande – MS	Ivermectina Fipronil Fluazuron
BOA	Água Boa	Camapuã – MS	Ivermectina Fipronil Fluazuron
* dados não obtidos			

Cepa susceptível de *Rhipicephalus microplus*

Para a realização de testes pareados, foi utilizada como referência sensível nos testes *in vitro* a cepa Porto Alegre (POA), este isolado foi mantido na Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) por meio de infestações controladas semanais em um bovino em baia individual. O animal era alimentado e realizada limpeza da baia uma vez por dia, sendo coletadas as teleóginas que se desprendiam do animal duas vezes por dia. Os materiais utilizados com o animal para manutenção da cepa e da limpeza da baia eram de uso exclusivo para este fim, para não haver a contaminação da cepa sensível.

Acaricidas

Foram avaliados os princípios ativos em grau técnico: fluazuron, fipronil ($\geq 98\%$ HPLC, doados por Ouro Fino Saúde Animal®, Brasil) e ivermectina (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA).

Bioensaios

O fluazuron foi avaliado por meio do Teste de Imersão de Adultas (TIA) como indicado pela FAO (Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação) para a Gestão da Resistência e Controle Integrado de Parasitas em Ruminantes (FAO, 2004) e padronizada por Reck et al. (2014). O teste foi realizado com a randomização de 120

teleóginas, separadas em grupos de 10, para serem imersas em concentrações de 500, 50, 5, 0,5 e 0,05 ppm de fluazuron durante 1 minuto, posteriormente era realizada a avaliação da ovipostura e da eclosão das larvas. Todos os testes foram realizados em duplicata.

O Teste de Imersão de larvas (TIL) foi realizado para os testes com a ivermectina (KLAFKE, 2012) e fipronil (CASTRO-JANER, 2009). Em ambos os testes houve a modificação de pesar 0,05g de ovos das adultas e no momento do teste utilizar os microtubos com aproximadamente 100 larvas já eclodidas. As concentrações utilizadas na avaliação do fipronil foram: 3, 2.5, 2, 1.7, 1.2, 1, 0.8, 0.6, 0.5, 0.4 e 0.2 ppm, já para a ivermectina as avaliações foram avaliadas em concentrações de 100, 70, 49, 34.3, 24, 16.8, 11.7, 8.2, 5.7, 4 e 2.8 ppm, os testes com larvas foram realizados em triplicata.

Em todas as técnicas foram utilizados o diluente como controle negativo. Foram utilizados adultas e larvas da cepa POA em todos os testes de forma pareada, como referência suscetível.

Os carrapatos utilizados no presente estudo foram coletados de bovinos que estavam a um período de pelo menos 60 dias sem a administração de nenhum carrapaticida a estes animais.

Análise estatística

Foram consideradas resistentes ao fluazuron, as populações de campo que apresentaram índice de fecundidade (IFec) das teleóginas significativamente superior ao da cepa sensível, em que:

Índice de Fertilidade (IFer) = peso dos ovos (g) / peso das teleóginas (g)

Índice de Fecundidade (IFec) = IFer x eclodibilidade (%) / 100

Foi submetido a análise de variância (ANOVA) considerando apenas um fator, o tratamento, os valores da IFec do grupo de teleóginas de cada isolado de campo com o grupo da cepa sensível, seguido do pós teste de Bonferroni.

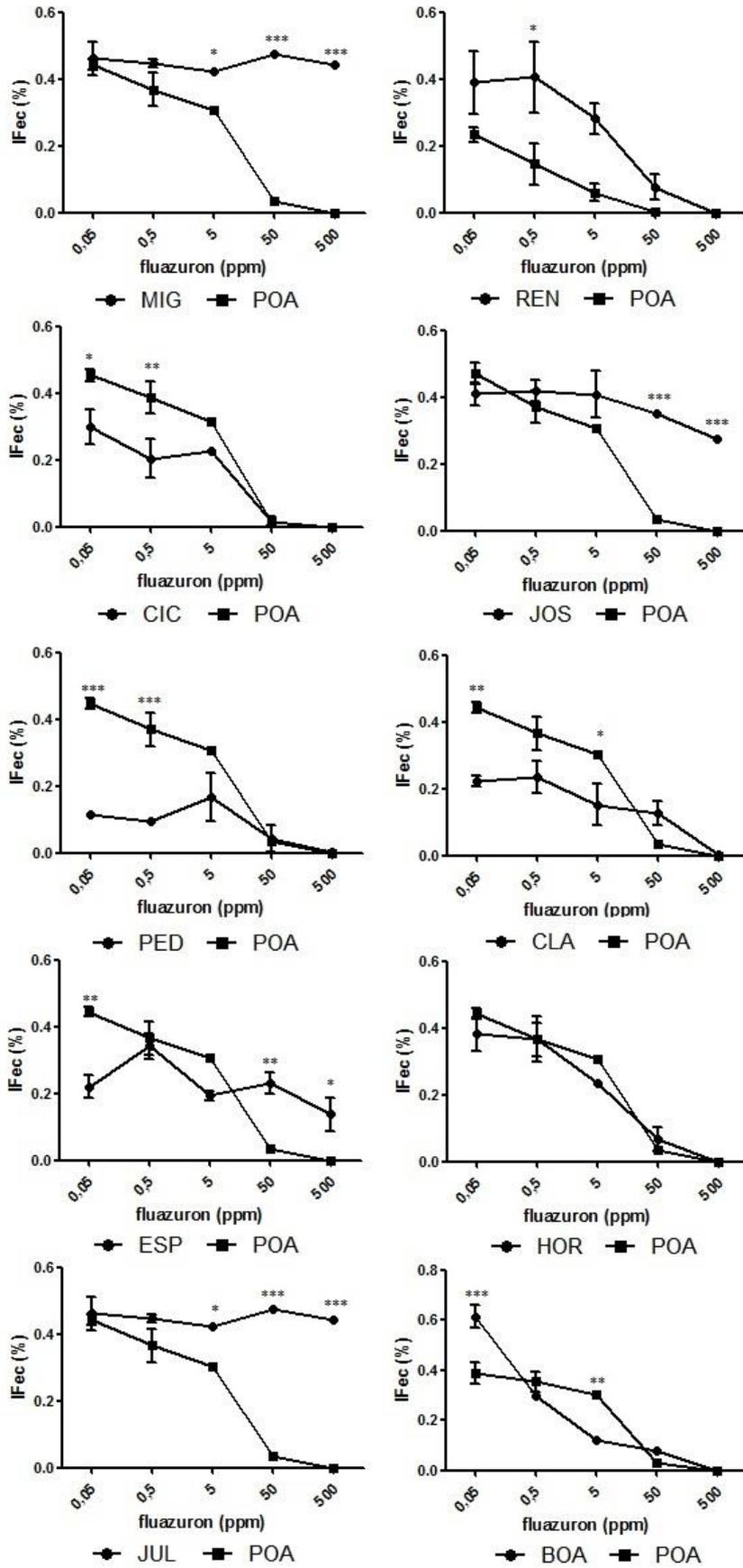
Para ivermectina e fipronil, foi calculada a Concentração Letal para 50% das larvas (CL50) e seu intervalo de confiança de 95% (IC95) para realizar o cálculo do Fator de Resistência (FR) (ROBERTSON; PREISLER, 1992). Foi considerada susceptibilidade do isolado quando a concentração letal não apresentava diferença estatística entre a cepa suscetível, resistência incipiente quando a concentração letal fosse estatisticamente diferente da cepa suscetível e o fator de resistência <2 e resistente, quando a concentração letal se apresentasse estatisticamente diferente da cepa suscetível e com fator de resistência >2 (CASTRO-JANER, 2009).

No TIA com fluazuron, o índice de fertilidade ente as cepas foi comparado pela análise de variância de um fator (one-way ANOVA), seguido pelo teste de comparação múltipla de Sidak, utilizando-se o programa GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA).

RESULTADOS

Por meio do TIA com o Fluazuron, foi constatada a resistência a este fármaco em quatro propriedades em Mato Grosso do Sul como observado na Figura 1.

Figura 1. Teste de Imersão de Adultas (TIA) com fluazuron grau técnico com os Índices de Fecundidade (IFec) dos isolados de campo e cepa Porto Alegre. Análise de variância (ANOVA) seguido do pós teste de Bonferroni (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ e *** $p < 0.001$), na comparação dos isolados de campo (MIG, REN, CIC, JOS, PED, CLA, ESP, HOR, JUL e BOA) com a cepa sensível (POA).



Com o cálculo da FR foi possível detectar a presença da resistência ao Fipronil nos testes realizados com larvas (Tabela 1).

Tabela 1. Resultados do Teste de Imersão de Larvas (TIL) com o fipronil grau técnico dos isolados de campo de *R. microplus* comparados com a cepa suscetível (POA).

<i>Cepa / Isolado</i>	<i>R²</i>	<i>CL₅₀ (ppm) (IC₉₅)</i>	<i>FR</i>	<i>Diagnóstico</i>
POA	0.92	1.23 (1.15 – 1.31)	-	
MIG	0.80	3.92 (3.48 – 4.42)	3.18	Resistente
POA	0.97	0.92 (0.77 – 1.09)	-	
REN	0.92	1.26 (1.11 – 1.43)	1.36	Resistência Incipiente
POA	0.93	1.26 (1.18 – 1.33)	-	
CIC	0.96	2.82 (2.76 – 2.89)	2.23	Resistente
POA	0.92	1.23 (1.15 – 1.31)	-	
JOS	0.96	2.16 (2.10 – 2.22)	1.75	Resistência Incipiente
POA	0.96	1.19 (1.14 – 1.25)	-	
PED	0.97	1.50 (1.44 – 1.56)	1.26	Resistência Incipiente
POA	0.96	1.19 (1.14 – 1.24)	-	
CLA	0.99	1.35 (1.33 – 1.38)	1.13	Resistência Incipiente
POA	0.92	1.23 (1.15 – 1.31)	-	
ESP	0.80	3.92 (3.48 – 4.42)	3.18	Resistente
POA	0.97	1.18 (1.14 – 1.22)	-	
HOR	0.98	1.30 (1.27 – 1.33)	1.10	Resistência Incipiente
POA	0.92	1.20 (1.12 – 1.31)	-	
JUL	0.90	5.15 (4.23 – 6.28)	4.29	Resistente
POA	0.91	0.72 (0.55 – 1.15)	-	
BOA	0.92	1.23 (1.16 – 1.31)	1.70	Resistência Incipiente

R²: coeficiente de determinação; CL₅₀: concentração letal para 50% das larvas; IC₉₅= intervalo de confiança de 95%; FR= fator de resistência

Na Tabela 2, estão apresentadas as CL₅₀, IC₉₅% e FR obtidos pelo TIL com a ivermectina. Por meio dos resultados obtidos foi possível diagnosticar que quatro populações de carrapatos avaliados são resistentes e seis populações estão com resistência incipiente.

Tabela 2. Comparação da concentração letal da ivermectina dos isolados de campo e cepa sensível de *Rhipicephalus microplus* por meio do Teste de Imersão de Larvas (TIL) em diferentes concentrações do princípio ativo.

<i>Cepa / Isolado</i>	<i>R²</i>	<i>CL₅₀ (ppm) (IC₉₅)</i>	<i>FR</i>	<i>Diagnóstico</i>
POA	0.95	17.56 (16.01 – 19.26)	-	
MIG	0.84	54.13 (49.10 – 59.68)	3.08	Resistente
POA	0.94	13.54 (10.19 – 16.81)	-	
REN	0.96	17.01 (15.01 – 19.27)	1.25	Resistência Incipiente
POA	0.95	18.55 (16.84 – 20.44)	-	
CIC	0.97	57.68 (54.91 – 60.59)	3.10	Resistente
POA	0.78	15.30 (12.16 – 19.26)	-	
JOS	0.95	17.56 (16.09 – 19.17)	1.14	Resistência Incipiente
POA	0.95	17.93 (16.07 – 19.20)	-	
PED	0.96	33.47 (31.07 – 36.06)	1.86	Resistência Incipiente
POA	0.97	14.06 (13.01 – 15.19)	-	
CLA	0.95	17.56 (16.09 – 19.17)	1.24	Resistência Incipiente
POA	0.96	17.58 (16.06 – 19.30)	-	
ESP	0.82	54.13 (49.36 – 59.37)	3.07	Resistente
POA	0.95	17.50 (16.01 – 19.17)	-	
HOR	0.98	20.32 (19.49 – 21.18)	1.16	Resistência Incipiente
POA	0.96	17.86 (16.56 – 19.76)	-	
JUL	0.95	37.40 (35.28 – 39.82)	2.09	Resistente
POA	0.74	13.94 (10.74 – 18.08)	-	
BOA	0.95	18.55 (17.09 – 20.17)	1.33	Resistência Incipiente

R²: coeficiente de determinação; CL₅₀: concentração letal para 50% das larvas; IC₉₅= intervalo de confiança de 95%; FR= fator de resistência

Três isolados (REN, BOA e JOS) foram resistentes a pelo menos um princípio ativo dos três fármacos avaliados, um (CIC) isolado foi diagnosticado como resistente a pelo menos dois acaricidas e três isolados (MIG, ESP e JUL) resistentes à ivermectina, ao fipronil e ao fluazuron. Três isolados (PED, CLA e HOR) não foram considerados resistentes, por ser diagnosticados com resistência incipiente ou apresentando sensibilidade quando expostos aos acaricidas avaliados, como consta na Tabela 3.

Tabela 3. Número de isolados de campo de *R. microplus* resistentes a um princípio ativo, dois princípios ativos ou a três princípios.

<i>Resistentes a:</i>	<i>Número de isolados</i>
Um princípio ativo	3
Dois princípios ativos	1
Três princípios ativos	3
Nenhum dos princípios ativos	3

DISCUSSÃO

Dos dez isolados avaliados, foi diagnosticada a presença de oito isolados de campo resistentes ao fluazuron. Por meio do histórico das propriedades, foi observado que três propriedades (MIG, CIC e ESP), que foram diagnosticadas como resistentes a pelo menos um princípio ativo, adquiriam os bovinos, já infestados, da região Sul do país, local que contém muitos relatos de carrapatos resistentes (Martins e Furlong, 2001; Reck et al. 2014; Machado et al. 2014; Castro-Janer et al. 2010). Um isolado (HOR), que se demonstrou suscetível ao fluazuron diante o teste realizado, nunca utilizou esse princípio ativo nos bovinos e não adquire animais de fora da propriedade. Um isolado (JUL) que utiliza há muitos anos o fluazuron no controle dos parasitos e não adquirem animais de outros locais, foi resistente a esse princípio ativo, o que leva a concluir que provavelmente o uso frequente desse produto químico durante esses anos, gerou a seleção dos resistentes pela morte dos suscetíveis. Pelo fato da técnica *in vitro* ser realizada de forma pareada com a cepa suscetível e a necessidade de uma amostra de carrapatos grande por propriedade, poucos estudos avaliam a eficácia do fluazuron, sendo relatada um isolado resistente por Reck et al. (2014) por técnica *in vitro* e quatro isolados no estudo de Maciel et al. (2016) por técnica *in vivo* com isolados proveniente de Minas Gerais, São Paulo e Mato Grosso do Sul. O presente estudo colabora com mais relatos de isolados resistentes ao fluazuron, demonstrando o atual cenário da resistência dos carrapatos a este fármaco em Mato Grosso do Sul.

Nenhum dos isolados de carrapatos avaliados foram susceptíveis ao fipronil, sendo quatro isolados já resistentes e seis possuem resistência incipiente. Duas propriedades (MIG e JUL) que demonstram carrapatos resistentes ao fipronil possuem o histórico de utilizar semanalmente esse princípio ativo na tentativa de um efetivo controle, porém sem sucesso. Souza et al. (2014) concluiu por meio de bioensaios *in vivo*, a diminuição da eficácia do fipronil de 100% para 79.3% ao longo de seis tratamentos, demonstrando que a resistência ao fipronil se instala rapidamente na população dos carrapatos. Três

isolados (PED, HOR e BOA) demonstraram resistência incipiente ao fipronil e utilizam atualmente esse fármaco, sugere-se a interrupção do tratamento, pois a resistência está se desenvolvendo nessas populações e o uso contínuo desse acaricida irá acelerar esse processo por meio da seleção dos resistentes.

Em todas as fazendas avaliadas, a ivermectina é utilizada também para o controle da verminose, das quais quatro isolados (MIG, CIC, ESP, JUL) são resistentes a ivermectina, três (PED, CLA, HOR) demonstram resistência incipiente e três (REN, JOS e BOA) são sensíveis a esse princípio ativo. As propriedades (REN, JOS e BOA) com isolados sensíveis a ivermectina tem em comum no histórico do manejo de seu rebanho a utilização da ivermectina a cada 20 dias, utilizam esse princípio ativo para controle de verminose e não pesam os animais para a aplicação desse fármaco, sendo aplicado de modo subjetivo.

Foram detectadas em duas propriedades a existência de carrapatos resistentes ao fipronil (CIC e ESP) e ao fluazuron (ESP), sendo que esses fármacos não foram utilizados até então pelos proprietários no controle dos carrapatos, ambas possuem em seu histórico a compra de animais do sul do país, o que sugere uma possível resistência adquirida e distribuída pelo comércio dos bovinos infestados.

Seis isolados demonstraram-se com resistência incipiente a pelo menos um princípio ativo, essa informação é importante, pois duas propriedades (BOA e PED) utilizam o fármaco com a resistência em desenvolvimento, o que pode gerar futuramente uma ineficácia desse produto como afirma Castro-Janer (2010). Duas propriedades (REN, HOR e CLA) nunca utilizaram o fipronil nos bovinos de sua propriedade e foi contatada a resistência incipiente, é preferível que não se utilize esse princípio ativo nos bovinos, para preservar essa molécula.

Os ensaios *in vitro* são técnicas simples e de baixo custo como afirma Scott (1995), porém ao longo do desenvolvimento do presente trabalho algumas limitações dificultam a reprodução dessas técnicas, como a necessidade de realizar cada bioensaio com o isolado de campo de forma pareada com uma cepa suscetível, sendo necessário a manutenção de bovinos infestados em baias individuais com normas de biossegurança para impedir a contaminação do isolado, levando a um gasto pela manutenção dos animais. Outro empecilho, é a utilização do princípio ativo grau técnico, que tem alto custo quando comparado com o produto comercial. Por fim, sugere-se a realização de estudos que possam padronizar doses discriminantes para a detecção da resistência a ivermectina, fipronil e fluazuron.

CONCLUSÃO

Foi constatada por meio de técnicas *in vitro* a resistência de *R. microplus* a ivermectina, fipronil e fluazuron em isolados de campo em Mato Grosso do Sul.

REFERÊNCIAS

Castro-Janer E, Rifran L, Piaggio J, Gil A, Miller RJ, Schumaker TTS. In vitro tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *Microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. *Vet Parasitol* 2009; 162 : 120–128.

Castro-Janer EAC. *Resistência de Rhipicephalus (Boophilus) microplus (ACARI: IXODIDAE) a fipronil: padronização de bioensaios in vitro, detecção de resistência em populações de campo e avaliação sobre resistência cruzada com outras drogas* [Tese]. São Paulo: Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo; 2010.

De La Fuente J; García-García JC, González DM, Izquierdo G, Ochagavia ME. Molecular analysis of *Boophilus Microplus* (Acari:Ixodidae) tick strains. *Vet Parasitol* 2000; 92 : 209-222.

FAO (Food And Agriculture Organization). Resistance management and integrated parasite control in ruminants: Guidelines. Animal Production And Health Division, Roma. 2004; 53.

Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PHD, León AAP, Pereira JB, Villela HS. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 2014; 23 (2): 150-156.

Klafke GM, Castro-Janer E, Mendes MC, Namindome A, Schumaker TT. Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: ixodidae). *Vet Parasitol* 2012; 184 (2–4):212–220.

Klafke GM, Sabatini GA, Albuquerque TADe, Martins JR; Kemp DH, Miller RJ, Schumaker TTS. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: ixodidae) from state of São Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 2006; 142 : 386-390.

Machado FA, Pivoto FP, Ferreira MST, Gregorio FV, Vogel FSF, et al. *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* in the western-central region of Rio Grande do Sul, Brazil: multiresistant tick. *Braz J Vet Parasitol* 2014; 23: 337-342.

- Maciel WG, Lopes WDZ, Gomes LVC, Cruz BC, Felippelli G, Santos IBD, Borges FA, Junior, WAG, Scarpa AB, Nicaretta JE, Bastos TSA, Costa, AJ. Susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to fluazuron (2.5 mg/kg) and a combination of novaluron (2.0 mg/kg) + eprinomectin (0.36 mg/kg) in field studies in Brazil. *Prev Vet Med* 2016; 135:74-86.
- Martins JR, Furlong, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. *Vet Rec* 2001; 149 (2): 64.
- Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall'angol B, Scheffer R. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus Microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet Parasitol* 2014; 201:128–136.
- Robertons LJ, Preisler KH. Pesticide bioassays with arthropods. Boca Raton, FL, USA 1992; 3 : 17-34.
- Scott JA. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. *Florida Entomol.* 1995; 78:199-414.
- Sindan (Sindicato Nacional Da Indústria De Produtos Para Saúde Animal). Compêndio De Produtos Veterinários Sindan. 2013.
- Souza AP, Paim F, Bellato V, Sartor AA, Moura AB, et al. Avaliação da eficácia do fipronil em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em tratamentos consecutivos. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2014; 66: 55-60.
- Sutherst RW, Comins HN. The management of acaricide resistance in the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae), in Australia. *Bull Entomol Res* 1979; 69: 519-540.