

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Caroline Zamperete Reginato

**RESISTÊNCIA DE *Rhipicephalus microplus* A ASSOCIAÇÕES COMERCIAIS DE
ORGANOFOSFORADOS E PIRETROIDES SINTÉTICOS NO ESTADO DO RIO
GRANDE DO SUL, BRASIL**

**Santa Maria, RS
2016**

Caroline Zamperete Reginato

**RESISTÊNCIA DE *Rhipicephalus microplus* A ASSOCIAÇÕES COMERCIAIS DE
ORGANOFOSFORADOS E PIRETROIDES SINTÉTICOS NO ESTADO DO RIO
GRANDE DO SUL, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Orientadora: Prof^ª Fernanda Silveira Flores Vogel

**Santa Maria, RS
2016**

Caroline Zamperete Reginato

**RESISTÊNCIA DE *Rhipicephalus microplus* A ASSOCIAÇÕES COMERCIAIS DE
ORGANOFOSFORADOS E PIRETROIDES SINTÉTICOS NO ESTADO DO RIO
GRANDE DO SUL, BRASIL**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária**.

Aprovado em 19 de dezembro, 2016:

Fernanda Silveira Flores Vogel, Dr^a (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Marta Lizandra do Rêgo Leal, Dr^a (UFSM)

João Fabio Soares, Dr^o (UFRGS)

Santa Maria, RS
2016

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária desta instituição, pela ela oportunidade de realização de mais uma etapa na minha formação.

À toda minha família, em especial aos meus pais, Vladimir e Marta, pelo apoio e incentivo que sempre recebi.

À toda equipe do Laboratório de Doenças Parasitárias (Ladopar), estagiários, bolsistas e pós-graduandos, pelas amizades, companheirismo no dia-a-dia e pelo auxílio na execução deste trabalho.

À minha orientadora, professora Fernanda Silveira Flores Vogel, pela oportunidade, ensinamentos e pela compreensão nos momentos que não pude me fazer presente.

Aos médicos veterinários da SEAPI-RS e da EMATER, que colaboraram nas coletas e na disponibilização de algumas propriedades para execução do trabalho.

Aos demais médicos veterinários e proprietários, que abriram suas portas e auxiliaram nas coletas.

Muito Obrigada!

RESUMO

RESISTÊNCIA DE *Rhipicephalus microplus* A ASSOCIAÇÕES COMERCIAIS DE ORGANOFOSFORADOS E PIRETROIDES SINTÉTICOS NO ESTADO DO RIO GRANDE DO SUL, BRASIL

AUTOR: Caroline Zamperete Reginato
ORIENTADOR: Fernanda Silveira Flores Vogel

Rhipicephalus microplus é um dos principais ectoparasitas de bovinos em regiões de clima tropical e subtropical. As perdas econômicas que este parasita causa, estão relacionadas aos custos com tratamento, diminuição da produtividade e transmissão de doenças. Atualmente o uso de produtos químicos ainda é a forma mais comum de controle do carrapato bovino, no entanto, seu uso de maneira inadequada e supressiva, vem causando o desenvolvimento de resistência às diferentes classes de acaricidas disponíveis comercialmente. Assim, o controle deste parasita tem se caracterizado por apresentar um grande desafio para técnicos e produtores. Uma alternativa ao controle do carrapato é a associação de duas bases farmacológicas diferentes, sendo que atualmente esta forma de apresentação é amplamente encontrada a nível comercial. O objetivo deste trabalho é descrever a avaliação da eficácia de associações carrapaticidas, a base de organofosforados e piretroides sintéticos, em diferentes populações de *R. microplus* no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Para isto, foram coletadas amostras de carrapatos de 54 propriedades, localizadas em diferentes municípios do estado do Rio Grande do Sul. A avaliação da eficácia *in vitro* dos acaricidas testados foi realizada através do teste de imersão de teleóginas (bicarrapaticidograma). Para a realização dos testes, foram escolhidos quatro produtos comercialmente disponíveis, sendo eles denominados: Produto A - 15% cipermetrina + 25% clorpirifós + 1% citronelol - (Colosso[®], Ouro Fino Saúde Animal), Produto B - 15% cipermetrina + 30% clorpirifós + 15% fenthion - (Colosso FC30[®], Ouro Fino Saúde Animal), Produto C - 50% clorpirifós + 6% cipermetrina high-cis - (Flytion[®], Clarion Biosciences Ltda.), Produto D - 16% ethion + 8.5% clorpirifós + 5% alfa-cipermetrina - (Potenty[®], MSD Saúde Animal). A associação de cipermetrina/clorpirifós/fenthion, apresentou os melhores resultados, com eficácia média superior a 95%, sendo eficaz em 94,44% (51/54) das propriedades testadas. O produto contendo a associação de cipermetrina/clorpirifós/citronelol, apresentou menor eficácia média (62,11%), sendo eficaz em apenas 29,62% (16/54) das propriedades testadas. *R. microplus*, apresenta diferentes graus de resistência à associação de organofosforados e piretroides sintéticos, sendo observado resistência múltipla em boa parte das populações estudadas. Apenas a combinação de cipermetrina/clorpirifós/fenthion apresentou níveis médios aceitáveis de eficácia nas populações de carrapato estudadas. Desta maneira, é fundamental estabelecer um monitoramento frequente da eficácia dos carrapaticidas utilizados, a fim de prolongar sua vida útil, contribuindo para o seu uso racional para o controle do carrapato em bovinos.

Palavras-chave: *Rhipicephalus microplus*, resistência parasitária, resistência múltipla, carrapato bovino.

ABSTRACT

RESISTANCE OF *Rhipicephalus microplus* TO COMMERCIAL ASSOCIATIONS OF ORGANOPHOSPHORS AND SYNTHETIC PYRETHROIDES IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, BRAZIL

AUTHOR: Caroline Zamperete Reginato
ADVISER: Fernanda Silveira Flores Vogel

Rhipicephalus microplus is one of the main ectoparasites of cattle in regions of tropical and subtropical climate. The economic losses caused by this parasite are related to treatment costs, decreased productivity and disease transmission. Currently the use of chemical products is still the most common form of control of the cattle tick, however, its use in an inadequate and suppressive way, has been causing the development of resistance to different classes of commercially available acaricides. Thus, the control of this parasite has been characterized by presenting a great challenge for technicians and producers. An alternative to tick control is the association of two different pharmacological bases, and currently this form of presentation is widely found commercially. The objective of this work is to describe the evaluation of the effectiveness of organophosphates and synthetic pyrethroids based on different combinations of *R. microplus* in the state of Rio Grande do Sul, Brazil. For this, 54 samples of cattle farms were collected, located in different municipalities of the state of Rio Grande do Sul. The evaluation of the in vitro efficacy of the acaricides tested was performed through the adult immersion test (AIT). In order to carry out the tests, four commercially available products were chosen: *Ectoparasiticide A* - 15% cypermethrin + 25% chlorpyrifos + 1% citronellal - (Colosso[®], Ouro Fino Animal Health), *Ectoparasiticide B* - 15% cypermethrin + 30% chlorpyrifos + 15% fenthion - (Colosso FC30[®], Ouro Fino Animal Health), *Ectoparasiticide C* - 50% chlorpyrifos + 6% cypermethrin high-cis - (Flytion[®], Clarion Biosciences Ltda.) and *Ectoparasiticide D* - 16% ethion + 8.5% chlorpyrifos + 5% alpha-cypermethrin - (Potenty[®], MSD Animal Health). The cypermethrin/ chlorpyrifos/ fenthion combination showed the best results, with an average efficiency greater than 95%, being effective in 94.44% (51/54) of the tested farms. The product containing the cypermethrin / chlorpyrifos / citronellal combination had a lower mean efficacy (62.11%), being effective in only 29.62% (16/54) of the properties tested. *R. microplus* presents different degrees of resistance to the association of organophosphates and synthetic pyrethroids, and multiple resistance was observed in most of the populations studied. Only the cypermethrin/ chlorpyrifos/ fenthion combination showed acceptable mean levels of efficacy in the tick populations studied. In this way, it is essential to establish a frequent monitoring of the effectiveness of the acaricides used, in order to prolong their useful life, contributing to their rational use for tick control in cattle.

Keywords: *Rhipicephalus microplus*, parasitary resistance, multiple resistance, cattle tick.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
2.1 <i>Rhipicephalus microplus</i>	10
2.2 IMPORTÂNCIA.....	10
2.3 EPIDEMIOLOGIA.....	11
2.4 CONTROLE E PROFILAXIA.....	13
2.4.1 Controle químico.....	13
2.4.2 Vacinas.....	14
2.5 RESISTÊNCIA.....	15
2.5 ANIMAIS RESISTENTES.....	17
3. ARTIGO	19
3.1 INTRODUÇÃO.....	20
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	22
3.4 CONCLUSÕES.....	24
3.5 REFERÊNCIAS.....	24
4. CONCLUSÕES	32
5. REFERÊNCIAS	33

1 INTRODUÇÃO

O rebanho bovino brasileiro possui um efetivo estimado em aproximadamente 215 milhões de cabeças, sendo considerado o maior rebanho comercial mundo. O Brasil se destaca como exportador de carne bovina, com mais de 1.5 milhões de toneladas exportadas por ano. Já na produção de leite, ocupa a quinta colocação no ranking mundial, com uma produção de 35,2 bilhões de litros anuais (ANUALPEC, 2014; IBGE, 2016). A pecuária brasileira se caracteriza por ter a maior parte do rebanho criado a pasto, sendo a área de pastejo estimada em cerca de 174 milhões de hectares, composta em sua maioria, por pastagens naturais (LOBATO et al., 2014).

Como consequência do aumento da produtividade da bovinocultura no Brasil, surgem diversos obstáculos inerentes à sanidade animal. Dentre os principais desafios sanitários encontrados na criação de bovinos em regiões tropicais e subtropicais, destacam-se as ectoparasitoses, dentre elas a infestação por carrapatos, que constitui um grande obstáculo para a produção de bovinos devido às grandes perdas econômicas que causa (LEAL et al., 2003). A infestação por carrapatos representa a principal ectoparasitose de bovinos, sendo estimado que cerca de 80% do rebanho mundial esteja infestado (BOWMAN, et al., 2004).

Apesar de diversas desvantagens do uso de carrapaticidas, como resíduos potencialmente tóxicos na carne e no leite, contaminação ambiental e toxicidade para os aplicadores, atualmente, este ainda é o principal método de controle do carrapato bovino, pois oferece supressão relativamente rápida de populações de carrapatos, sendo economicamente viável (GEORGE et al., 2004). No entanto, o uso supressivo de carrapaticidas aliado a uma inadequada utilização, em longo prazo, pode promover a seleção de populações resistentes, dificultando seu controle e implicando em custos elevados devido as falhas no tratamento e gastos com aquisição de mais medicamentos. A detecção de resistência aos carrapaticidas usados a campo, juntamente com o histórico de uso dos produtos, são informações essenciais para gerir o controle do carrapato bovino (ABBAS et al, 2014).

Diante deste contexto, esta dissertação tem como objetivo descrever a avaliação da eficácia de formulações comerciais de carrapaticidas contendo combinações de organofosforados e piretroides sintéticos, frente a diferentes populações de *Rhipicephalus microplus* do estado do Rio Grande do Sul. Para isso, essa dissertação está dividida em dois capítulos, sendo o primeiro, uma revisão bibliográfica que aborda os principais aspectos

relacionados ao carrapato bovino e o segundo um artigo intitulado “Status of commercial acaricides of synthetic pyrethroids associated with organophosphates used to control of *Rhipicephalus microplus* in southern Brazil”.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Rhipicephalus microplus*

Os carrapatos são ectoparasitos hematófagos que pertencem ao filo Artropoda, classe Aracnida, ordem Acarina e subordem Metastigmata. São classificados dentro em três famílias: Argasidae, ou carrapatos moles, Ixodidae, ou carrapatos duros e Nuttalliellidae, que é representada por apenas uma espécie (HORAK et al., 2002). Existem mais de 700 espécies de carrapatos que compõe a ordem Ixodidae, entre elas, a espécie *R. microplus*, que anteriormente era denominada *Boophilus microplus*, foi reclassificada dentro do gênero *Rhipicephalus*, através de um estudo filogenético (MURRELL e BARKER, 2003).

R. microplus, está amplamente distribuído em regiões tropicais e subtropicais do planeta, entre os paralelos 32° norte e sul, região que se localiza praticamente todo o território brasileiro e onde essa espécie encontra temperatura e umidade favoráveis para seu desenvolvimento em boa parte do ano. O carrapato bovino tem sua origem no continente asiático e ao longo do tempo, se difundiu para outras regiões do planeta, juntamente com as migrações de pessoas e suas criações de animais. Atualmente a sua ocorrência é relatada nas Américas do Sul, Central e do Norte, sul e leste da África e parte de Ásia (GONZÁLES, 2002).

2.2 IMPORTÂNCIA

R. microplus é considerado um dos principais desafios para a bovinocultura de leite e de corte em diversos países em que sua ocorrência é relatada e parasita cerca de 1,4 bilhões de bovinos no mundo todo (FAO, 2004). Essa parasitose causa perdas devido sua ação espoliativa, pois cada fêmea adulta pode ingerir até 3 ml de sangue do hospedeiro. Além disso, o carrapato bovino também pode atuar como vetor de doenças do complexo tristeza parasitária bovina, que tem como agentes etiológicos a rickettsia *Anaplasma marginale* e os protozoários *Babesia bovis* e *Babesia bigemina*, ocasionando, muitas vezes, uma alta taxa morbidade e mortalidade nos rebanhos afetados. Os prejuízos econômicos ocorrem devido ao retardo no ganho de peso, diminuição na produção de leite, depreciação do valor do couro,

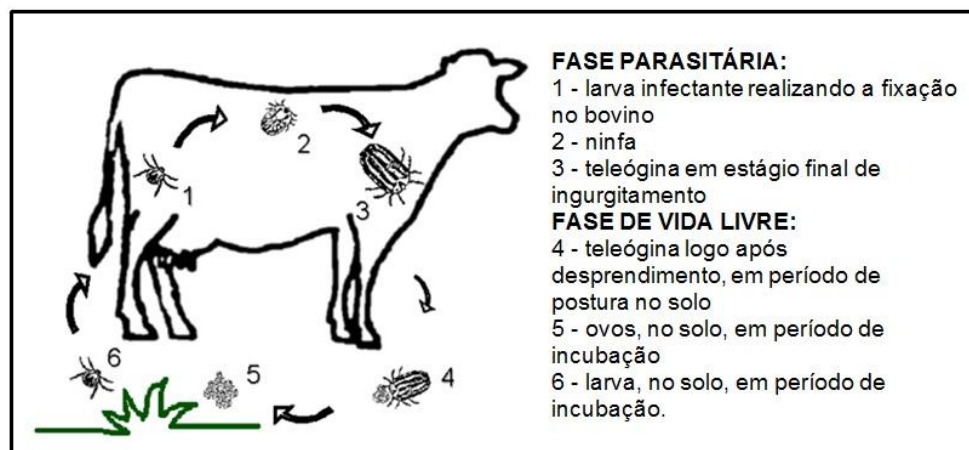
além de custos relacionados à aquisição de acaricidas, instalações e mão de obra adicional para o manejo do gado. (DE ALMEIDA, et al., 2006; GONÇALVES, 2000).

Os prejuízos atribuídos ao carrapato bovino podem ser expressos tanto em perda de peso corporal e produção de leite perdida ou ainda em termos de perdas econômicas estimados. Estudos recentes apontam que o parasitismo causado por *R. microplus* acarreta potenciais prejuízos no Brasil, em mais de US\$ 3 bilhões por ano (GRISI et al., 2014). Estes mesmos autores afirmam que em bovinos de leite, parasitados por *R. microplus*, os prejuízos podem até atingir até US\$ 922 milhões por ano, já na bovinocultura de corte, a perda anual pode chegar a quase 3 bilhões dólares. Cada fêmea ingurgitada pode causar diminuição de 9 ml na produção de leite diária e 1,0 grama de peso vivo em raças de alta produção leiteira (JONSSON et al., 1998; RODRIGUES e LEITE, 2013). Em raças de corte, as perdas são estimadas em 1,18 e 1,37 gramas por carrapato, por animal, para bovinos cruza *Bos indicus* x *Bos taurus* e *B. taurus*, respectivamente (JONSSON, 2006).

2.3 EPIDEMIOLOGIA

R. microplus é um carrapato de ciclo monoxeno, ou seja, vive em um único hospedeiro, realizando seu desenvolvimento total por meio de duas metamorfoses. Possui ciclo biológico (Figura 1) dividido em duas fases: ciclo de vida parasitária, que se inicia quando a larva se prende ao hospedeiro e ciclo de vida livre ou não parasitária, que ocorre no ambiente e prolonga-se por aproximadamente três meses, dependendo principalmente das condições inerentes ao clima da região (GONZÁLES, 2002).

Figura 1 – Esquema simplificado do ciclo biológico do *Rhipicephalus microplus*.



Fonte: Adaptado de ANDREOTTI, 2002.

A fase parasitária inicia quando as larvas após subirem no hospedeiro, fixam-se por meio de seu aparelho bucal e então começam a se alimentarem de linfa, para posteriormente atingir o estágio de ninfa. Nesta fase, o carrapato imaturo já se alimenta de sangue do animal parasitado. Posteriormente, ao atingem a fase adulta, acontece a fecundação das fêmeas e o ingurgitamento das mesmas, quando passam a ser denominadas teleóginas (fêmeas fecundadas) (FURLONG e PRATA, 2005). As teleóginas então se desprendem do hospedeiro para realizarem a ovipostura no ambiente. Os machos são pequenos, cerca de dez vezes menor que a fêmea e permanecem por até 38 dias sobre o bovino onde podem fecundar inúmeras fêmeas. Neste período do ciclo biológico, o carrapato é pouco afetado pelas condições climáticas ambientais (PEREIRA et al., 2008).

A fase não parasitária (ambiental) se inicia após a queda da teleógina no solo, com o período de pré-postura, que tem em média, duração de dois a três dias. Ao realizar a postura, cada fêmea tem capacidade de por de 2000 a 3000 ovos viáveis, que em condições ideais de temperatura e umidade, irão eclodir em um período de aproximadamente 15 dias. Após a eclosão, as larvas vão se tornar aptas para parasitar um animal dentro de quatro a seis dias, sendo guiadas por estímulo luminoso, sobem na vegetação à procura do hospedeiro, apresentando um comportamento de geotropismo negativo (GONZALES, 1975). Nesse período, o carrapato não se alimenta e sobrevive exclusivamente das suas reservas (FARIAS, 2007).

O período de duração de cada estágio do ciclo é bastante variável, dependendo de fatores inerentes ao clima, como umidade e temperatura. Em condições adversas para sobrevivência, como baixa temperatura ou períodos de seca prolongada, a teleógina desprendida do hospedeiro não morre e permanece aguardando condições favoráveis para reiniciar o processo de postura, o que pode prolongar este período por vários dias e até meses, dependendo das condições climáticas (BOWMAN et al., 2004; GONZÁLES, 1975).

O Rio Grande do Sul possui clima subtropical úmido, com estações do ano bem demarcadas sendo que as baixas temperaturas e que ocorrem no inverno acabam por inibir ou inativar boa parte da população de carrapatos que está em vida livre (BRUM et al., 1985). Além disso, a dinâmica populacional de *R. microplus* no estado é caracterizada por um grande pico de abundância no outono, diminuindo no inverno, quando as condições climáticas tornam-se desfavoráveis para as fases de vida livre. A reinfestação dos animais volta a acontecer no início da primavera, onde ocorre a primeira geração de carrapatos, que se caracteriza por uma baixa infestação dos animais (MARTINS et al., 2002).

2.4 CONTROLE E PROFILAXIA

2.4.1 Controle químico

Atualmente o uso de produtos químicos é a forma de controle de carrapato mais difundida e amplamente utilizada a campo (LEAL et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2002). Carrapaticidas, se corretamente aplicados, são eficientes e possuem um custo relativamente baixo (WILLADSEN, 2006). Entretanto, devido ao desconhecimento do ciclo biológico do parasita, o uso de acaricidas químicos vem sendo frequentemente utilizado de forma incorreta, e com isso, se observa um aumento na frequência da aplicação destes produtos, o que contribui para acelerar o processo de resistência parasitária (FURLONG e PRATA, 2005; GEORGE, 2004;).

Alguns estudos envolvendo métodos alternativos para controle do carrapato bovino; como controle biológico, vacinas e fitoterápicos; tem mostrado resultados promissores para perspectivas futuras. Agentes de controle biológico têm sido bastante estudados, no entanto sua eficácia, fabricação, estabilidade e aplicabilidade a campo ainda apresentam grandes desafios (BASSO et al., 2005; WILLADSEN, 2006).

Como alternativa para o controle do carrapato, tem se empregado sistemas de controle estratégico para reduzir as taxas de infestação e os impactos econômicos causados por este parasita (PEREIRA et al., 2008). Tais sistemas são baseados na relação entre os carrapatos, hospedeiros e o ambiente e tem como ponto principal, o uso de tratamentos em épocas do ano biologicamente desfavoráveis ao parasita. Pereira et al. (2008) relataram que para o controle de *R. microplus*, é necessário considerar que apenas 5% dos carrapatos estão localizados no hospedeiro e os 95% restantes permanecem no ambiente. Um dos pontos chaves para o sucesso no emprego de controle estratégico é a escolha do acaricida a ser utilizado, uma decisão que deve levar em conta o período de proteção residual e, sobretudo, a sua eficiência contra o desafio de infestação (FURLONG e PRATA, 2005).

O primeiro grupo de bases químicas utilizada para o controle do carrapato bovino foram os arsenicais, disponibilizado no início do século XX. Ao longo dos anos, organoclorados, organofosforados, carbamatos, piretróides sintéticos e amitraz foram usadas sequencialmente. Posteriormente, foram introduzidas no mercado veterinário as lactonas macrocíclicas, e mais recentemente os reguladores de crescimento, fipronil e spinosad

(GEORGE, 2004; PEREIRA et al., 2008). No entanto, resistência a praticamente todas as classes de acaricidas disponíveis comercialmente já foram relatadas no Brasil (CASTRO-JANER et al., 2010; LOVIS et al., 2013; MARTINS e FURLONG, 2001; MENDES et al., 2011; RECK et al., 2014).

Os organofosforados são compostos derivados do ácido fosfórico, que atuam inibindo a acetilcolinesterase, enzima que degrada a acetilcolina após o impulso nervoso entre neurônios. Desta maneira a acetilcolina se acumula nos receptores sinápticos, em níveis tóxicos para os carrapatos, causando um aumento das contrações dos músculos até atingir a paralisia (ANDREOTTI, 2010). Já os piretroides exercem um efeito sobre os canais de sódio dos filamentos nervosos, bloqueando a sua abertura e fechamento. Assim, prolongam o tempo de entrada dos íons sódio para o interior da célula, causando morte por hiperexcitação (DOS SANTOS et al., 2007)

Apesar das desvantagens do uso de produtos químicos para o controle do carrapato bovino, como a contaminação ambiental, resíduos presentes na carne e no leite, além da toxicidade para os trabalhadores que fazem a aplicação, esta é ainda a principal ferramenta para o controle de infestações por *R. microplus* em rebanhos bovinos, pois é considerada eficaz quando usada de forma correta (DE CASTRO, 1997). Desta maneira, as estratégias de controle do carrapato bovino devem levar em conta uma combinação da utilização racional dos carrapaticidas atualmente disponíveis e a frequência da sua aplicação, levando à manutenção da carga parasitária abaixo do limiar de perdas econômicas e com um impacto ambiental mínimo (FAO, 2004).

A escolha do acaricida a ser utilizado deve ser feita com base na confirmação de eficácia para determinada população de *R. microplus*. Existem diversos testes *in vivo* ou *in vitro* para determinar a eficácia de um carrapaticida. Para produtos de uso tópico, que agem por contato com o carrapato, como é o caso dos organofosforados e piretroides, o principal método de avaliação de eficácia utilizado é o Teste de Imersão de Teleóginas, que é recomendado pela FAO (2004), por ser um método sensível, de baixo custo e de fácil execução.

2.4.2 Vacinas

Até então, já foram desenvolvidas duas vacinas para o controle do carrapato bovino, uma proveniente da Austrália e outra de Cuba (WILLADSEN et al., 1988). Ambas foram elaboradas com base na proteína Bm86, que é uma glicoproteína presente na membrana das

células do intestino de *R. microplus* e desempenha um papel na endocitose. Estas vacinas atuam reduzindo o número de teleóginas ingurgitadas, o seu peso e a capacidade reprodutiva, o que significa que o maior efeito de vacinação observado como uma infestação larval reduzida numa geração subsequente (ANDREOTTI et al., 2002; PARIZI et al., 2009).

A vacinação tem sido utilizada em alguns países, embora sem resolver o problema completamente (PRUETT, 1999). As vacinas contra o carrapato bovino disponíveis, que usam proteína recombinante, tem uma grande variação de eficácia, entre 51 a 91%, dependendo de fatores como cepa de *R. microplus* estudada, além de características inerentes aos hospedeiros, como raça e estado nutricional (WILLADSEN, 2006). Em um estudo conduzido no Brasil, foi demonstrado que o uso do antígeno Bm86, teve eficácia de 45 % a 60%, em bovinos vacinados e naturalmente infestados por *R. microplus* (RODRIGUEZ et al., 1995).

Antígenos já caracterizados não asseguram o grau de proteção necessário para suprimir o uso de acaricidas, portanto, tem se buscado identificar novas proteínas que possam ser utilizadas para o desenvolvimento de novas vacinas, as quais possam induzir maior imunogenicidade do que os antígenos já testados (PARIZI et al., 2009). Esses estudos ressaltam a importância da caracterização do sistema imune do hospedeiro para o desenvolvimento de novas vacinas e são importantes para acelerar o processo de trazer vacinas contra carrapatos desde o estágio de desenvolvimento até o uso clínico. Em conjunto, os controles biológicos e imunológicos, tem a perspectiva de oferecer um potencial considerável para a redução da utilização de produtos químicos no controle do *R. microplus* (MARITZ-OLIVIER, 2012; WILLADSEN 2006).

2.5 RESISTÊNCIA

A resistência parasitária pode ser definida como a capacidade de uma determinada cepa de carrapato sobreviver e se multiplicar, após administração e absorção de um produto químico, em doses iguais ou superiores às normalmente recomendadas, porém dentro dos limites de tolerância (WHO, 1965). O resultado deste processo é uma redução da eficácia do tratamento e, conseqüentemente, um aumento nos custos para o controle parasitário (KLAFKE et al., 2016). As diferentes formas de resistência aos antiparasitários podem ser classificadas conforme seu mecanismo de desenvolvimento, podendo ser ela: resistência adquirida, cruzada ou múltipla (ABBAS et al., 2014).

Resistência adquirida pode ser definida como redução da sensibilidade a determinado fármaco, transmitida hereditariamente, ao longo das gerações do parasita, existindo uma

relação direta entre a concentração do medicamento e o grau de resistência (CHAPMAN, 1997). Uma cepa controlada por uma determinada dose de um medicamento pode mostrar resistência quando uma concentração mais baixa do mesmo medicamento é administrada. Isto pode permitir a seleção de cepas inicialmente resistentes a baixos níveis de um produto (LEES et al., 2013; MITCHELL, 1996). A exposição contínua a um acaricida resulta na remoção dos indivíduos sensíveis da população de carrapatos, com um concomitante aumento na proporção de indivíduos resistentes, resultando em um processo de seleção (ABBAS et al., 2014). Resistência cruzada ocorre quando uma cepa resistente a dois ou mais acaricidas, porém, com o mecanismo de ação igual ou semelhante. Isso pode ser observado, por exemplo, em casos de resistência a diferentes lactonas macrocíclicas. Já a resistência múltipla, ocorre quando uma determinada população de parasita desenvolve resistência a fármacos com diferentes mecanismos de ação (PEREZ-GONZALEZ et al., 2014).

Os mecanismos de resistência desenvolvidos por artrópodes tem sido estudados e alguns autores têm demonstrado que este fenômeno pode ser proveniente de mutações e ampliações pontuais de determinados genes (WHEELLOCK et al., 2005). Os mecanismos de resistência a diferentes bases químicas, desenvolvidos pelos carrapatos, podem ser atribuídos a diversos fatores, como: redução da absorção do produto, alterações nos sítio de ação e alteração do metabolismo por esterases, oxidases ou glutathione-S-transferases (VATSYA e YADAV, 2011). Estudos sobre a resistência carrapaticida tem mostrado que as esterases, em particular a acetilcolinesterase (AChEs), está associadas à resistência aos organofosforados e piretroides, envolvendo tanto o aumento desintoxicação quanto a insensibilidade do sítio de ação metabólica (LI et al., 2005). Além disso, uma série de mutações no gene do canal de sódio pode resultar em insensibilidade no sitio de ação para o efeito neurotóxico dos piretroides. (JAMROZ et al., 2000).

A velocidade à qual a resistência se desenvolve numa determinada população de carrapatos depende de vários fatores, dentre eles a frequência inicial de genes de resistência, intensidade de pressão de seleção, o grau de domínio do gene e o número de indivíduos que não entrou em contato com o acaricida (refugia) (ALONSO-DIAZ et al., 2006). Em geral, a frequência de genes que conferem resistência é muito baixa em populações que não tenham sofrido uma pressão de seleção. No entanto, quando uma base química é usada intensivamente, acaba por eliminar os indivíduos sensíveis, perpetuando os genes de resistência dentro de população, que será transmitido para gerações consecutivas (ABBAS et al., 2014).

O surgimento de carrapaticidas, bem como o registro para comercialização no mercado veterinário, requer um longo tempo de pesquisas e não acompanha a demanda por novos produtos devido ao surgimento da resistência às bases químicas atualmente disponíveis comercialmente (WILLADSEN, 2006). Além disso, o desenvolvimento de novas moléculas é dispendioso, havendo uma dificuldade de se encontrar produtos que tenham uma eficácia satisfatória sobre cepas de campo (GRAF et al., 2004). No Brasil, para um novo acaricida obter registro e ser comercializado, precisa comprovar eficácia acima de 95% para cepas sensíveis de *R. microplus* (BRASIL, 1997).

Atualmente no Brasil não existe nenhum programa ou política para o controle do carrapato bovino. A maioria dos produtores costuma adotar práticas individuais, muitas vezes sem levar em conta a biologia do parasita ou mesmo sem conhecimento da real eficácia do produto sobre a população de carrapato (PEREIRA et al., 2008). Nestas condições, a detecção de populações de carrapato resistentes se torna essencial para estabelecer procedimentos de controle e retardar o desenvolvimento da resistência parasitária, a fim de otimizar a utilização de carrapaticidas que possuem uma eficácia satisfatória, além de prolongar a sua vida útil (FAO, 2004).

Devido ao surgimento da resistência a diferentes bases químicas, foram desenvolvidas novas formulações, em que combinam princípios ativos de diferentes mecanismos de ação, a fim de aumentar a eficácia do produto. Combinações contendo organofosforados e piretroides são amplamente encontradas comercialmente e seu uso é bastante difundido, pois são produtos que atuam por contato e podem ser aplicados tanto por banhos de imersão, aspersão ou pour-on.

2.6 ANIMAIS RESISTENTES

Vários fatores, morfológicos, fisiológicos e comportamentais, influenciam a resistência dos bovinos aos carrapatos. O impacto do genótipo do hospedeiro no controle do carrapato bovino e nas doenças transmitidas por este parasita é bastante conhecido, porém ainda não está totalmente esclarecido (JONSSON, 2006). As diferenças na capacidade do hospedeiro ser mais resistente a *R. microplus*, em raças zebuínas, ou mesmo dentro das raças de origem europeia, têm sido reconhecidas há muito tempo. Além disso, a capacidade de adquirir resistência pode ser transmitida hereditariamente, com uma taxa estimada de herdabilidade entre 39% e 49% para os animais da raça britânica e até 82% em bovinos *Bos indicus* ou mestiços (PIPER et al., 2009; SEIFERT, 1971).

Bovinos de raças europeias tendem a apresentar uma infestação cerca de 10 vezes maior do que em animais de raças zebuínas e cerca de 2,5 mais carrapatos do que cruzas *Bos indicus* x *Bos taurus* (SEIFERT, 1971). A maior resistência de raças zebuínas frente ao *R. microplus* pode ser atribuída a uma seleção natural devido ao maior tempo de contato com o parasita, visto que o carrapato bovino tem sua origem no continente asiático, possibilitando que esses animais adquirissem maior imunidade com o passar do tempo. Os animais resistentes possuem defesas imunológicas que interferem no parasitismo e devido à degranulação de mastócitos com conseqüente liberação de histamina e infiltração de eosinófilos. A ação irritante resulta em reação alérgica local, inibindo a salivação, a fixação, ingurgitamento e que os carrapatos completem seu ciclo biológico (MORELLI JUNIOR, 2000; PIPER et al., 2009).

Como forma de manter o parasitismo baixos níveis, tem se buscado adaptação dos animais frente à diversidade de ambientes através de cruzamento com raças mais resistentes, como entre raças zebuínas e raças europeias. Além disso, dentro de um rebanho de animais da mesma raça, podem existir animais suscetíveis, que permitam uma quantidade maior de carrapatos chegarem à fase adulta, que é um fator que deve ser considerado para descarte e seleção de animais dentro de um rebanho (JONSSON, 2006). No estado do Rio Grande do Sul, há um predomínio da utilização de raças europeias na bovinocultura de leite e de corte, sendo este um fator que tem culminado na proliferação do *R. microplus* pois ao encontrar hospedeiros e ambiente que favoreçam o seu desenvolvimento, podem atingir a capacidade reprodutiva máxima (FARIAS et al., 2008).

3 ARTIGO

(Artigo a ser submetido para a revista *Veterinary Parasitology: Regional Studies and Reports*)

Status of commercial acaricides of synthetic pyrethroids associated with organophosphates used to control of *Rhipicephalus microplus* in southern Brazil

Reginato, C. Z.^a, Cadore, G. C.^a, Menezes, F. R.^b, Sangioni, L. A.^a, Vogel, F. S. F.^{a,*}

^a Departamento de Medicina Veterinária Preventiva (DMVP), Centro de Ciências Rurais (CCR), Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil

^b Programa de Pós-Graduação em Economia e Desenvolvimento, PNPd/CAPES, UFSM, Santa Maria, RS, Brazil

*Corresponding author: Address: Laboratório de Doenças Parasitárias. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal de Santa Maria, Av. Roraima, n.1000, Prédio 44, Sala 5149, CEP: 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil. Tel.: +55 55 3220 8071.

E-mail address: fefevogel@gmail.com (F. S. F. Vogel)

Abstract

The tick *Rhipicephalus microplus* is responsible for major production losses in cattle herd and the development of acaricides resistance is reported in different countries. This study evaluated the acaricide efficacy of synthetic pyrethroids (SP) associated with organophosphates (OP) against *R. microplus* populations from state of Rio Grande do Sul in southern Brazil. Ticks were collected in 54 cattle farms and tested *in vitro* assays (adult immersion test – AIT), against four commercial acaricides mixture of SP and OP. Only the mixture cypermethrin/chlorpyrifos/fenthion, presented a mean efficiency over 95%, being effective in 94,44% (51/54) of the tested cattle farms. The product with mixture of cypermethrin/chlorpyrifos/citronelall, presented the lowest mean efficacy (62,11%), being effective in 29,62% (16/54) of tested farms. The cattle tick *R. microplus* from the southern Brazil, presents different degrees of resistance to SP and OP mixtures. Additionally, only a combination of cypermethrin/chlorpyrifos/fenthion presented acceptable mean levels of efficacy in the tick population studied. The higher efficacy of this combination can be attributed to fenthion, probably due to its recent commercial availability in Brazil, and consequently lower levels of resistance established in the

population. Thus, is fundamental the monitoring of acaricides resistance, contributing to its rational use for the control of *R. microplus*.

Keywords: ruminants, therapeutic efficacy, cattle tick, multiple resistance, *Boophilus*.

1. Introduction

The *Rhipicephalus microplus* is a great economic threat to the cattle industry in tropical and subtropical areas, mainly in South America. The negative impact of this tick is a combination of direct and indirect effects on bovines such as blood loss, reduced weight gain and milk production, increased risk of myiasis and transmission of tick borne diseases (Jonsson, 2006; Reck et al., 2014). Losses caused by tick can be minimized by treating cattle with acaricides, but the resistance is widespread in countries where the *R. microplus* is a problem (Martins and Furlong, 2001; Davey et al., 2006). The resistance can arise through several mechanisms, which can be classified as target site, metabolic, or reduced penetration (Vatsya and Yadav, 2011; Guerrero et al., 2012).

Chemical control of ticks has been characterized by a continuous increase of resistance proportional to the frequency of acaricide applications (Vargas et al., 2003; Campos Jr and Oliveira, 2005). A chemical product to be used in the control of tick, must present equal or above than 95% efficacy on a sensitive strain of *R. microplus* to be licensed in Brazil (Brazil, 1997). Control of cattle ticks, mainly depends of therapy with synthetic acaricides, but is complicated by emergence of drug resistance (Li et al., 2007; Miller et al., 2007). The intensive use of chemical formulations leads to loss of efficacy of the base molecules with consequent spread of this resistance, making essential a wise administration of these molecules (FAO, 2004). Despite the disadvantages of using acaricides, such as harmful residues, environmental contamination, and toxicity to workers who apply them, these drugs are essential to control tick infestations around the world (De Castro, 1997).

Indiscriminate use with incorrect concentrations of acaricides has probably contributed to the development of resistance in the tick populations, which is aggravated by increasing number of products that combine two or more active ingredients (FAO, 2004). The inefficacy in tick control by chemical products is a major challenge for cattle industry, since the resistance against the main classes

of acaricides it has been reported in several regions (Camillo et al., 2009; Fernández-Salas et al., 2012; Sharma et al., 2012; Reck et al., 2014). One option for control of *R. microplus* is the combination of two different pharmacological bases, and this is largely found at commercial level. Information of prevalence about acaricide resistance against *R. microplus* is limited and farmers in the state of Rio Grande do Sul have reported failure of tick control in their herds. Thus the aim of this study was evaluate the acaricide efficacy of synthetic pyrethroids (SP) associated with organophosphates (OP) against the *R. microplus* populations from state of Rio Grande do Sul in southern Brazil.

2. Materials and Methods

Engorged females of *R. microplus* were collected of dairy and beef cattle from different regions of Rio Grande do Sul state, between november 2015 and august 2016. Ticks were collected directly from animals in fifty-four cattle farms located in twenty-eight counties of the Rio Grande do Sul state in southern Brazil: Alegrete (two farms), Caçapava do Sul (eight farms), Cacequi (two farms), Cachoeira do Sul (two farms), Dilermando de Aguiar (two farms), Encruzilhada do Sul, Faxinal do Soturno (two farms), Jaguari, Jari, Júlio de Castilhos, Lavras do Sul, Nova Esperança do Sul, Nova Palma (two farms), Paraíso do Sul, Pinhal Grande, Restinga Seca, Rosário do Sul, Santa Barbara do Sul, Santa Maria (two farms), Santiago (three farms), São Francisco de Assis (two farms), São Gabriel (five farms), São João do Polêsine, São Martinho da Serra, São Pedro do Sul, São Sepé (five farms), São Vicente do Sul (two farms), Vila Nova do Sul (Figure 1). The in vitro assay adult immersion test (AIT) was used to detect the susceptibility or resistance of different mixtures acaricides. The selection of farms was based on a historical of failure to chemical control of ticks, using only ticks from animals that did not received acaricides in the past 30 days.

Four commercial mixtures acaricides of SP and OP were tested by AIT conducted according to the methods of Drummond et al., 1973 and Camillo et al., 2009. On each ranch, approximately 200 engorged females were taken directly from the infested cattle. *Ectoparasiticide A* - 15% cypermethrin + 25% chlorpyrifos + 1% citronellal - (Colosso[®], Ouro Fino Animal Health), diluted with distilled water to a final concentration of 0.15 mg mL⁻¹, 0.25 mg mL⁻¹ and 0.01 mg mL⁻¹, respectively; *Ectoparasiticide B* - 15% cypermethrin + 30% chlorpyrifos + 15% fenthion - (Colosso FC30[®], Ouro

Fino Animal Health), at final concentrations of 0.188 mg mL⁻¹, 0.375 mg mL⁻¹ and 0.188 mg mL⁻¹; *Ectoparasiticide C* - 50% chlorpyrifos + 6% cypermethrin high-cis - (Flytion[®], Clarion Biosciences Ltda.), at a final concentrations of 0.833 mg mL⁻¹ and 0.1 mg mL⁻¹, respectively; *Ectoparasiticide D* - 16% ethion + 8.5% chlorpyrifos + 5% alpha-cypermethrin - (Potenty[®], MSD Animal Health), at final concentrations of 0.4 mg mL⁻¹, 0.212 mg mL⁻¹ and 0.125 mg mL⁻¹, respectively. All products were commercially available, used according to concentrations and recommendations specified by the manufacturers, following the commercial dosages used by farmers. Distilled water was used for the control group. Each test was performed in triplicate with 10 engorged females per group.

All data were analyzed using SAS software (SAS Institute Inc., Cary, NC) to statistical analysis. The mean efficacy was analyzed using Exact Fisher test with a 95% confidence level.

3. Results and Discussion

This study used the AIT to detect resistance in commercial acaricides of SP associated with OP against *R. microplus* in southern Brazil. The commercial *ectoparasiticide A* obtained the lowest (62,11%) and *ectoparasiticide B* obtained highest (98,76%) mean efficiency of all acaricides used (Table 1). Based on the results, three products analyzed exhibited mean efficacy less than 95% (*ectoparasiticides A, C and D* – Table 1). Reports of cattle tick resistance to SP and OP have been recorded through several years (Roulston et al., 1968; Nolan et al., 1977). An alternative to control of the cattle tick is the combination of two different pharmacological bases, and this presentation is largely found at the commercial level. Combinations of different chemical bases generally have better results when compared to single molecule formulations (Vargas et al., 2003). However, these combinations do not always leads to an efficiency greater or equal than 95% (Campos Jr et al., 2005; Mendes et al., 2007). In addition, in the present study, mixture of the cypermethrin/chlorpyrifos/citronellal (*ectoparasiticide A*) and mixture of ethion/chlorpyrifos/alpha-cypermethrin (*ectoparasiticide D*) were not able to produce good levels of efficiency (Table 1).

The results revealed that there was disparity among the products tested, with all ectoparasiticides analyzed exhibiting satisfactory acaricidal efficacy and acaricidal resistance on at least one cattle farm (Figure 2). The *ectoparasiticide B* and *ectoparasiticide C* presented satisfactory

acaricidal efficacy ($\geq 95\%$) in 51 (94,44%) and 44 (81,48%) of 54 cattle farms, respectively ($p=0.034$). On the other hand the *ectoparasiticide A* and *D* presented acaricidal resistance (efficacy $<95\%$) in 38 and 32 of the 54 cattle farms, respectively ($p=0.2267$) (Table 1). The acaricidal efficacy is highly variable and depending on the management system performed on each farm property, mainly related of the frequency of ectoparasiticide use (Rocha et al., 2011).

In this study the chemical compounds utilized belonging to the chemical group of OP were chlorpyrifos, ethion, and fenthion. Within to the chemical group of SP were used cypermethrin, cypermethrin high-cis, and alpha-cypermethrin. The higher efficacy of *ectoparasiticide B* can be attributed to the fact that this product contains fenthion in its formulation. This acaricide is just recently available to cattle tick control in Brazil, thus the population of ticks have been subjected to a lower selective pressure for this chemical when compared to the other acaricides tested (SINDAN, 2016). Given the recent availability of this product, its wise use is strategic to minimize the possibility of resistance. Usually, tick control is done without taking into consideration technical criteria and the characteristics of its biological cycle (Campos Jr et al., 2005; Amaral et al., 2011a; Amaral et al., 2011b), and the most damaging consequences of this incorrect use of control products are the rapid development of resistance to acaricides (Santos et al., 2009).

The chemical control of ticks has been characterized by continuous increase of resistance (Vargas et al., 2003). Only on 11/54 farms tested, ectoparasiticides presented satisfactory efficiency against the *R. microplus* (data not shown). Resistance associated with products containing combination of SP and OP is also reported in other regions of Brazil (Campos Jr et al., 2005; Mendes et al., 2007; Andreotti et al., 2011), and different places at the world (Alvarez et al., 2000; Fernández-Salas et al., 2012; Ghosh et al., 2015; Puerta et al., 2015). Frequent use of chemical treatments increase the chances of selecting resistance among ticks, this being one of main factors in establishing a resistant population of *R. microplus* through the selective pressure to which ticks are exposed (Rodriguez-Vivas et al., 2006; Santos et al., 2009). Another important factor that favors the onset of resistance in populations of *R. microplus* is the incorrect use of spraying products (Bianchi et al., 2003). Thus, the tick control strategies are considered as being a combination of prudent and rational use of the chemical bases currently available and the frequency of its application, leading to the maintenance of

parasite populations below their economic damage threshold, and with a minimal environmental impact (FAO, 2003).

Different levels of resistance were detected to all ectoparasiticides tested. Currently it is common for commercial products to combine active ingredients from different chemical families due to their inefficiency when used separately (Raynal et al., 2003; Andreotti et al., 2011). The prevalence of resistance to acaricides varies between regions, depending on local ecology and acaricides management (Jonsson, 1997). The RS state has a remarkable history of tick resistance to acaricides as it was the first region in Brazil to report resistance to SP and OP (Martins et al., 2006). The breeds of cattle, which are predominantly *Bos taurus taurus*, and high stocking rates are two factors that contribute to the problem of acaricide resistance among populations of *R. microplus* in RS. These factors lead to heavy tick loads, which, in turn, lead to more treatments per year, and consequently more resistance selection (Martins et al., 2006).

4. Conclusions

The cattle tick *R. microplus* populations from the southern Brazil, present different degrees of resistance to SP and OP mixture. However performing of laboratory tests for the use of an acaricide is important, because good efficacy of a product in a farm property does not ensure the same efficiency in another place. Additionally, only a combination of cypermethrin/chlorpyrifos/fenthion presented acceptable mean levels of efficacy at the tick population studied. The higher efficacy of this mixture can be attributed to fenthion, probably due to its recent commercial availability in Brazil, and consequently lower levels of resistance established in the population. Thus, is fundamental the monitoring of acaricides resistance, contributing to its rational use for the control of *R. microplus*.

References

- Alvarez, V., Bonilla, R., Chacón, I., 2000. Resistance behaviour to organophosphorus and synthetic pyrethroid acaricides by the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in ten farms in Costa Rica. *Cienc. Vet.* 23(2), 15-24.

- Amaral, M.A.Z., Rocha, C.M.B.M.D., Faccini, J.L., Furlong, J., Monteiro, C.M.O., Prata, M.C.A., 2011a. Strategic control of cattle ticks: milk producers' perceptions. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20(2), 148-154.
- Amaral, M.A.Z., Rocha, C.M.B.M.D., Faccini, J.L., Furlong, J., Monteiro, C.M.O., Prata, M.C.A., 2011b. Perceptions and attitudes among milk producers in Minas Gerais regarding cattle tick biology and control. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20(3), 194-201.
- Andreotti, R., Guerrero, F.D., Soares, M.A., Barros, J.C., Miller, R.J., León, A.P., 2011. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20(2), 127-133.
- Bianchi, M.W., Barré, N., Messad, S., 2003. Factors related to cattle infestation level and resistance to acaricides in *Boophilus microplus* tick populations in New Caledonia. *Vet. Parasitol.* 112(1-2), 75-89.
- Brazil, 1997. Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, Ordinance No. 48, Technical Regulation for licensing and license renewal of antiparasitic products for veterinary use. *Diário Oficial*, n. 92, Section 1.
- Camillo, G., Vogel, F.F., Sangioni, L.A., Cadore, G.C., Ferrari, R., 2009. In vitro evaluation of acaricides efficiency to bovine's ticks of Rio Grande do Sul State, Brazil. *Cienc. Rural.* 39(2), 490-495.
- Campos Jr, D.A., Oliveira, P.R., 2005. In vitro valuation of acaricides efficiency to *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) from bovines at the region of Ilhéus, Bahia, Brazil. *Cienc. Rural* 35(6), 1386-1392.
- Davey, R.B., George, J.E., Miller, R.J., 2006. Comparison of reproductive biology between acaricide-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* 139(1-3), 211-220.
- De Castro, J.J., 1997. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries," *Vet. Parasitol.* 71(2-3), 77-97.
- Drummond, R.O., Ernst, S.E., Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, O.H., 1973. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. *J. Econ. Entomol.* 66, 130-133.

- FAO, 2003. Producción y Sanidad Animal - Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Food and Agriculture, p. 52.
- FAO, 2004. Resistance management and integrated parasite control in ruminants: guidelines. Module 1. Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention, pp. 25-77.
- Fernández-Salas, A., Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.A., 2012. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. Vet. Parasitol. 183(3-4), 338-342.
- Ghosh, S., Kumar, R., Nagar, G., Kumar, S., Sharma, A.K., Srivastava, A., Kumar, S., Kumar, K.G.A., Saravanan, B.C., 2015. Survey of acaricides resistance status of *Rhipiciphalus (Boophilus) microplus* collected from selected places of Bihar, an eastern state of India. Ticks Tick Borne Dis. 6(5), 668-675.
- Guerrero, F.D., Lovis, L., Martins, J.R., 2012. Acaricide mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 21, 1-6.
- Jonsson, N.N., 1997. Control of cattle ticks (*Boophilus microplus*) on Queensland dairy farms. Aust. Vet. J. 75(11), 802-807.
- Jonsson, N.N., 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. Vet. Parasitol. 137(1-2), 1-10.
- Li, A.Y., Chen, A.C., Miller, R.J., Davey, R.B., George, J.E., 2007. Acaricide resistance and synergism between permethrin and amitraz against susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Pest. Manag. Sci. 63(9), 882-889.
- Martins, J.R., Doyle, R.L., Gonzales, J.C., 2006. Principais resultados de testes carrapaticidas *in vitro* empregando-se o teste de imersão de adultos no IPVDF, Eldorado do Sul, RS. Anais 14° Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária, Ribeirão Preto, SP, Brazil, p. 218.
- Martins, J.R., Furlong, J., 2001. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. Vet. Rec. 149(2), 64.

- Mendes, M.C., Pereira, J.R., Prado, A.P., 2007. Sensitivity of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to pyrethroids and organophosphate in farms in the Vale do Paraíba region, São Paulo, Brazil. *Arq. Inst. Biol.* 74(2), 81-85.
- Miller, R.J., Davey, R.B., George, J.E., 2007. First report of permethrin resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected within the United States. *J. Med. Entomol.* 44(2), 308-315.
- Nolan, J., Roulston, W.J., Wharton, R.H., 1977. Resistance to synthetic pyrethroids in a DDT-resistant strain of *Boophilus microplus*. *Pestic. Sci.* 8(5), 484-486.
- Puerta, J.M., Chaparro, J.J., Lopez-Arias, A., Arroyave, S.A., Villar, D., 2015. Loss of in vitro efficacy of topical commercial acaricides on *Rhipicephalus microplus* (Ixodida: Ixodidae) from Antioquian farms, Colombia. *J. Med. Entomol.* 52(6), 1309-1314.
- Raynal, J.T., Silva, A.A.B., Sousa, T.J., Bahiense, T.C., Meyer, R., Portela, R.W., 2013. Acaricides efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 22, 71-77.
- Reck, J., Marks, F.S., Rodrigues, R.O., Souza, U.A., Webster, A., Leite, R.C., Gonzales, J.C., Klafke, G.M., Martins, J.R., 2014. Does *Rhipicephalus microplus* tick infestation increase the risk for myiasis caused by *Cochliomyia hominivorax* in cattle?. *Prev. Vet. Med.* 113, 59-62.
- Rocha, C.M.B.M.D., Leite, R.C., Bruhn, F.R.P., Guimarães, A.M., Furlong, J., 2011. Perceptions of milk producers from Divinópolis. Minas Gerais, regarding *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* control. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 20(4), 295-302.
- Rodriguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.A., Rodriguez-Arevalo, F., Fragoso-Sanchez, H., Santamaria, V.M., Rosario-Cruz, R., 2006. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Vet. Parasitol.* 136(3-4), 335-342.
- Roulston, W.J., Schnitzerling, H.J., Schuntner, C.A., 1968. Acetylcholinesterase insensitivity in the Biarra strain of the cattle tick *Boophilus microplus*, as a cause of resistance to organophosphorus and carbamate acaricides. *Aust. J. Biol. Sci.* 21(4), 759-767.

- Santos, T.R.B., Farias, N.A.R., Filho, N.A.C., Pappen, F.G., Vaz Junior, I.S., 2009. Studies of the management of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in southern Rio Grande do Sul, Brazil. *Pesquisa Vet. Brasil.* 29, 65-70.
- Sharma, A.K., Kumar, R., Kumar, S., Nagar, G., Sing, N.K., Rawat, S.S., Dhakad, M.L., Rawat, A.K.S., Ray, D.D., Ghosh, S., 2012. Deltamethrin and cypermethrin resistance status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from six agro-climatic regions of India. *Vet. Parasitol.* 188(3-4), 337-345.
- SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal), 2016. *Compêndio de Produtos Veterinários*. <http://www.cpvvs.com.br/cpvvs/index.html> (accessed 09.09.16).
- Vargas, M.S., Céspedes, N.S., Sánchez, H.F., Martins, J.R., Céspedes, C.O.C., 2003. In vitro evaluation of a field strain of *Boophilus microplus* (Acari: ixodidae) resistant to Amitraz. *Cienc. Rural* 33(4), 737-742.
- Vatsya, S., Yadav, C.L., 2011. Evaluation of acaricides resistance mechanisms in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from India. *Int. J. Acarol.* 37(5), 405-410.

Table 1: Acaricide efficacy of synthetic pyrethroids associated with organophosphates against the *Rhipicephalus microplus* populations from state of Rio Grande do Sul in southern Brazil.

	A	B	C	D
Percentage of farms with efficacy $\geq 95\%$ (%)	29.62 ^c (16/54)	94.44 ^a (51/54)	81.48 ^b (44/54)	40.74 ^c (22/54)
Mean efficacy (%)	62.11	98.76	92.14	72.06
Amplitude (%)	1.2 - 100	67 - 100	10.2 - 100	4.6 - 100
Standard Error	± 9.31	± 1.46	± 5.4	± 8.42
Lower 95% CI	52.8	97.3	86.74	63.64
Upper 95% CI	71.42	100	97.54	80.48

Distinct small letters indicate statistical differences by Exact Fischer Test ($p < 0.05$). *Ectoparasiticide A* (cypermethrin 0.15 mg mL⁻¹ + chlorpyrifos 0.25 mg mL⁻¹ + citronellal 0.01 mg mL⁻¹); *Ectoparasiticide B* (cypermethrin 0.188 mg mL⁻¹ + chlorpyrifos 0.375 mg mL⁻¹ + fenthion 0.188 mg mL⁻¹); *Ectoparasiticide C* (chlorpyrifos 0.833 mg mL⁻¹ + cypermethrin high-cis 0.1 mg mL⁻¹); *Ectoparasiticide D* (ethion 0.4 mg mL⁻¹ + chlorpyrifos 0.212 mg mL⁻¹ + alpha-cypermethrin 0.125 mg mL⁻¹). *CI*: confidence intervals.

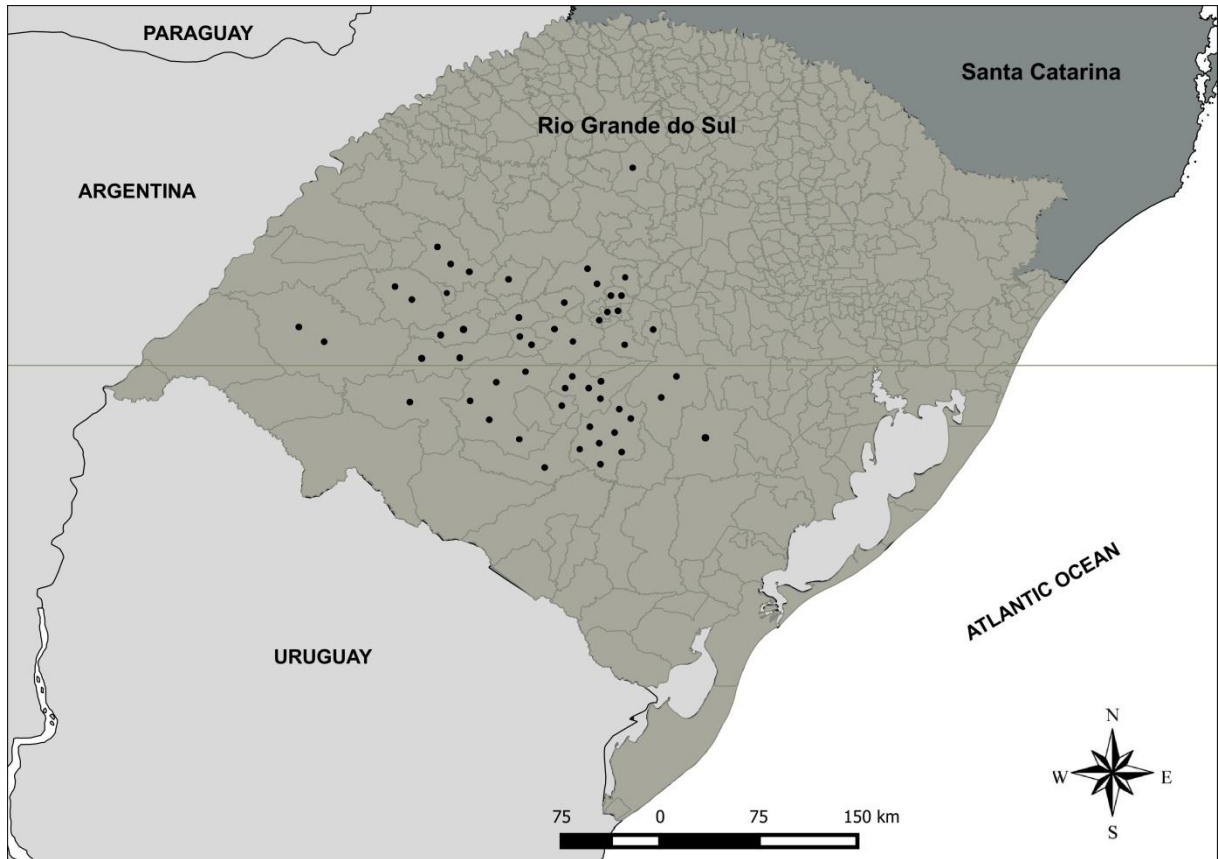


Figure 1: Location of fifty-four cattle farms studied at twenty-eight counties from state of Rio Grande do Sul in southern Brazil where the populations of *Rhipicephalus microplus* were evaluated for efficacy of the ectoparasiticides. Spheres indicate the locations of the farms.

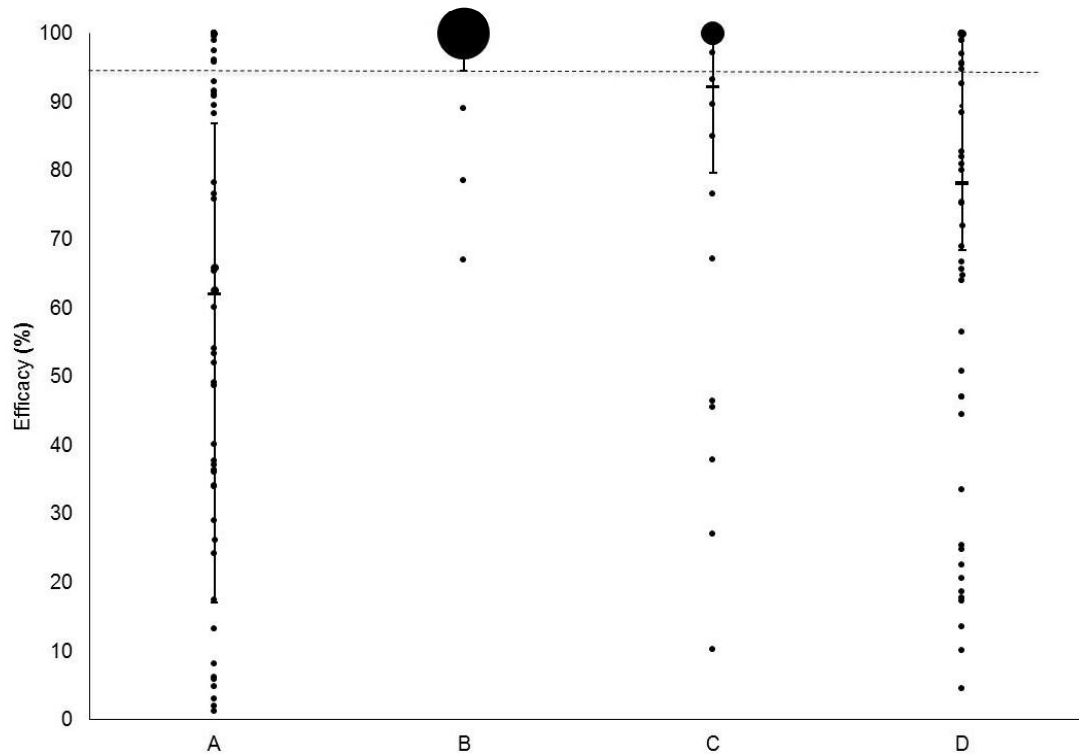


Figure 2: Distribution of acaricide efficacy of different chemicals on cattle farms from state of Rio Grande do Sul in southern Brazil. Lines indicate the mean efficacy and standard error. *Ectoparasiticide A* (cypermethrin 0.15 mg mL⁻¹ + chlorpyrifos 0.25 mg mL⁻¹ + citronellal 0.01 mg mL⁻¹); *Ectoparasiticide B* (cypermethrin 0.188 mg mL⁻¹ + chlorpyrifos 0.375 mg mL⁻¹ + fenthion 0.188 mg mL⁻¹); *Ectoparasiticide C* (chlorpyrifos 0.833 mg mL⁻¹ + cypermethrin high-cis 0.1 mg mL⁻¹); *Ectoparasiticide D* (ethion 0.4 mg mL⁻¹ + chlorpyrifos 0.212 mg mL⁻¹ + alpha-cypermethrin 0.125 mg mL⁻¹).

4 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho apontam para uma situação de alerta, pois foi observado que a resistência aos acaricidas por parte dos carrapatos a diferentes associações compostas por organofosforados e piretroides sintéticos, encontra-se disseminada no Rio Grande do Sul. As diferentes populações de *R. microplus* estudadas apresentam variados graus de resistência. Os resultados mais satisfatórios foram encontrados para associação entre cipermetrina/ clorpirifós/ fention.

Desta maneira, é fundamental reafirmar a importância de realização monitoramento constante da eficiência carrapaticida, por meio de testes *in vitro*, para diferentes cepas de *R. microplus*, proporcionando uma detecção precoce da resistência parasitária. Além disso, com a disponibilidade cada vez menor de produtos eficazes para controle do carrapato bovino, se torna necessário a implementação de um programa de controle estratégico do carrapato, aliado ao uso racional dos carrapaticidas disponíveis, para assim prolongar a sua vida útil.

5 REFERÊNCIAS

- ABBAS, R. Z. et al. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: the state of play. **Veterinary parasitology**, v. 203, n. 1, p. 6-20, 2014.
- ALONSO-DÍAZ, M. A. et al. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. **Archivos de Medicina Veterinaria**, v. 38, n. 2, p. 105-113, 2006.
- ANDREOTTI, R. et al. **Controle do carrapato por meio de vacina- situação atual e perspectivas**. Campo Grande: Embrapa, 2002, 54p.
- ANDREOTTI, R. **Caracterização de inibidores de serinoproteases (BmTIS) presentes em larvas de carrapatos *Boophilus microplus* e o seu efeito no controle da infestação parasitária em bovino**. Dissertação (Mestrado), 2002. Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP, 2002.
- ANUALPEC. **Anuário da pecuária brasileira 2014**. São Paulo: Maxi Gráfica, 2014.
- BASSO, L. M. S. et al. Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 40, n. 6, p. 595-600, 2005.
- BOWMAN, A. S.; NUTTALL, P. A.; CHAPPELL, L. H. Ticks: biology, disease and control. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S1-S1, 2004.
- BRASIL, Ministério da Agricultura Pecuária e Desenvolvimento. **Regulamento técnico para licenciamento e/ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário**. Secretaria de Defesa Animal, Portaria nº 48 de 12 de maio de 1997. Seção I, n. 92, p. 10165-10169. 1997.
- BRUM, J.G.W. et al. Postura e eclosão de *Boophilus microplus* em diferentes localizações geográficas do RS, Brasil. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.37, n.6, p.581-587, 1985.
- CASTRO-JANER, E. et al. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. **Veterinary Parasitology**, v. 173, n. 3, p. 300-306, 2010.
- CHAPMAN, H. D. Biochemical, genetic and applied aspects of drug resistance in Eimeria parasites of the fowl. **Avian Pathology**, v. 26, n. 2, p. 221-244, 1997.
- DE ALMEIDA, M. B. et al. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-20051. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 26, n. 4, p. 237-242, 2006.
- DE CASTRO, J. J. Sustainable tick and tickborne disease control in livestock improvement in developing countries. **Veterinary Parasitology**, v. 71, n. 2, p. 77-97, 1997.
- DOS SANTOS, M. A. T., AREAS, M. A., REYES, F. G. R. Piretróides – uma visão geral. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, p. 339-349, 2007.

FAO, 2004. **Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants: Guidelines**. Disponível em: <<http://www.fao.org/ag/aga.html>>. Acesso em: 09 out. 2016.

FARIAS, N. A.; RUAS, J. L.; DOS SANTOS, T. R. B. Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato *Boophilus microplus*, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, v. 38, n. 6, p. 1700-1705, 2008.

FARIAS, N.A. Tristeza parasitária bovina. In: RIET-CORREA, F. et al. **Doenças de ruminantes e eqüídeos**. 3.ed. Santa Maria: Pallotti, 2007, p. 524-532.

FURLONG, J.; PRATA, M. C. A. **Conhecimento básico para controle do carrapato dos bovinos. Carrapatos: problemas e soluções**. Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, 2005, p. 9-20.

GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVEY, R. B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S353-S366, 2004.

GONÇALVES, P. M. Epidemiologia e controle da tristeza parasitária bovina na região sudeste do Brasil. **Ciência Rural**, v. 30, n. 1, 2000.

GONZALES, J. C. O. carrapato dos bovinos *Boophilus microplus* (Cannestrini, 1887) (Revisão histórica e conceitual). **A Hora Veterinária**, v. 21, n. 125, p. 23-28, 2002.

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato dos bovinos**. Porto Alegre: Sulina, 1975. v. 1, p. 103.

GRAF, J.F. et al. Tick control: an industry point of view. **Parasitology**, v. 129, n. S1, p. S427-S442, 2004.

GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 2014.

HORAK, I. G., CAMICAS, J., KEIRANS, J. E. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida): a world list of valid tick names. **Experimental & Applied Acarology**, v. 28, n. 1-4, p. 27-54, 2002.

IBGE. **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística**. 2015. Disponível em: <<http://www.sidra.ibge.gov.br/bda/pecua/default.asp?t=2>> Acesso em 01 de out. 2016.

JAMROZ, R. C. et al. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strains of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. **Journal of Insect Physiology**, v. 46, n. 5, p. 685-695, 2000.

JONSSON, N. N. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. **Veterinary Parasitology**, v. 137, n. 1, p. 1-10, 2006.

JONSSON, N. N. et al. Production effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation of high yielding dairy cows. **Veterinary Parasitology**, v. 78, n. 1, p. 65-77, 1998.

- KLAFKE, G. 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**, 2016.
- LEAL, A. T. et al. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. **Acta Scientiae Veterinariae**. Porto Alegre, v. 31, n. 1, p. 01-11, 2003.
- LEES, K. et al. Functional characterisation of a nicotinic acetylcholine receptor α subunit from the brown dog tick, *Rhipicephalus sanguineus*. **International Journal for Parasitology**, v. 44, n. 1, p. 75-81, 2014.
- LI, A.Y.; PRUETT, J.H.; DAVEY, R.B.; GEORGE J.E. Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 81, n. 3, p. 145-153, 2005.
- LOBATO, J.F.P. et al. Brazilian beef produced on pastures: Sustainable and healthy. **Meat Science**, v.98, n.3, p.336–345, 2014.
- LOVIS, L. et al. Use of the Larval Tarsal Test to determine acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Brazilian field populations. **Veterinary Parasitology**, v. 191, n. 3, p. 323-331, 2013.
- MARITZ-OLIVIER, C; VAN ZYL, W; STUTZER, C. A systematic, functional genomics, and reverse vaccinology approach to the identification of vaccine candidates in the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*. **Ticks and Tick-Borne Diseases**, v. 3, n. 3, p. 179-187, 2012.
- MARTINS, J. R., EVANS, D. E., CERESÉR, V. H., CORRÊA, B. L. Partial strategic tick control within a herd of European breed cattle in the state of Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Experimental & applied acarology**, v. 27, n. 3, p. 241-251, 2002
- MARTINS, J. R.; FURLONG, J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **The Veterinary Record**, v. 149, n. 2, p. 64-64, 2001.
- MENDES, M. C. et al. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 3, p. 383-388, 2011.
- MITCHELL, M. Acaricide resistance—back to basics. **Tropical animal health and production**, v. 28, p. 53S-58S, 1996.
- MORELLI JÚNIOR, J. **Reação de hipersensibilidade cutânea em bovinos *Bos taurus* e *Bos indicus* ao carrapato *Boophilus microplus* (Acarina: Ixodidae)**. 2000. 96 p. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, 2000.
- MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Systematic Parasitology**, v. 56, n. 3, p. 169-172, 2003.

- OLIVEIRA, G. P. et al. Diagnóstico da resistência do *Boophilus microplus*, Canestrine, 1888 (Acarina: Ixodidae) em bovinos leiteiros na região de São Carlos, São Paulo. **Revista de Ciências Agrárias**, n. 38, p. 57-56, 2002.
- PIPER, E. K. et al. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 7, p. 1074-1086, 2009.
- RODRIGUEZ, M. et al. Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in Brazil. **Vaccine**, v. 13, n. 18, p. 1804-1808, 1995.
- PARIZI, L. F. et al. New approaches toward anti-*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick vaccine. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 18, n. 1, p. 1-7, 2009.
- PEREIRA, M.C. et al. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* – **Biologia, Controle e Resistência**. MedVet, São Paulo, 2008, 169 p.
- PÉREZ-GONZÁLEZ, I. E. et al. Effect of new ethyl and methyl carbamates on *Rhipicephalus microplus* larvae and adult ticks resistant to conventional ixodicides. **Veterinary Parasitology**, v. 199, n. 3, p. 235-241, 2014.
- PIPER, E. K. et al. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 16, n. 7, p. 1074-1086, 2009.
- PRUETT, J. H. Immunological control of arthropod ectoparasites—a review. **International Journal for Parasitology**, v. 29, n. 1, p. 25-32, 1999.
- RECK, J. et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1, p. 128-136, 2014.
- RODRIGUES, D.S., LEITE, R. C. Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 65, n. 5, p. 1570-1572, 2013.
- SEIFERT, G. W. Variations between and within breeds of cattle in resistance to field infestations of the cattle tick (*Boophilus microplus*). **Crop and Pasture Science**, v. 22, n. 1, p. 159-168, 1971.
- VATSYA, S.; YADAV, C. L. Evaluation of acaricide resistance mechanisms in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from India. **International Journal of Acarology**, v. 37, n. 5, p. 405-410, 2011.
- VIEIRA, M. I. B., LEITE, R. C., SACCO, A. M. S., & SILVA, J. G. C. Estratégias de controle do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) e influência na estabilidade enzoótica da babesiose bovina. **Revista Brasileira Parasitologia Veterinária**, v. 12, n. 4, p. 139-144, 2003.

WHEELOCK, C. E.; SHAN, G.; OTTEA, J. Overview of carboxylesterases and their role in the metabolism of insecticides. **Journal of Pesticide Science**, v. 30, n. 2, p. 75-83, 2005.

WILLADSEN, P. Tick control: thoughts on a research agenda. **Veterinary Parasitology**, v. 138, n. 1, p. 161-168, 2006.

WILLADSEN, P.; KEMP, D. H. Vaccination with 'concealed' antigens for tick control. **Parasitology Today**, v. 4, n. 7, p. 196-198, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO), 1965. **Technical Report Series** n. 296, p. 29.

