



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

Uso del test de inmersión de adultos modificado para fluazurón y del test de paquete de larvas para diagnosticar la resistencia de 14 poblaciones de campo de *Rhipicephalus microplus* a los 6 grupos químicos habilitados en Uruguay

Estudio del perfil de resistencia de 14 poblaciones de campo de *Rhipicephalus microplus*, mediante técnicas in vitro, para a los 6 grupos químicos habilitados en Uruguay, y análisis relacionado a las condiciones y los antecedentes de manejo, vinculados a esta parasitosis, de los establecimientos de origen.

Tatiana Saporiti

TESIS DE MAESTRÍA EN SALUD ANIMAL

URUGUAY

2019



UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA

FACULTAD DE VETERINARIA

Programa de Posgrados

Uso del test de inmersión de adultos modificado para fluazurón y del test de paquete de larvas para diagnosticar la resistencia de 14 poblaciones de campo de *Rhipicephalus microplus* a los 6 grupos químicos habilitados en Uruguay

Estudio del perfil de resistencia de 14 poblaciones de campo de *Rhipicephalus microplus*, mediante técnicas in vitro, para a los 6 grupos químicos habilitados en Uruguay, y análisis relacionado a las condiciones y los antecedentes de manejo, vinculados a esta parasitosis, de los establecimientos de origen.

Tatiana Saporiti

Franklin Riet-Correa
Director de Tesis

Ulises Cuore
Co-director

INTEGRACIÓN DEL TRIBUNAL DE

DEFENSA DE TESIS

**Gonzalo Suarez; DMTV, Phd. Unidad de Farmacología y Terapéutica,
Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario, Facultad de
Veterinaria – UdeLaR, Uruguay.**

**María Angélica Solari; DMV, Departamento de Parasitología,
DILAVE- Montevideo, MGAP, Uruguay.**

Rodolfo Rivero; DMV, Msc. DILAVE- Paysandú, MGAP Uruguay.

ACTA DE EXAMEN

CURSO: Defensa de Tesis de Maestría

LUGAR Y FECHA DE LA DEFENSA: Montevideo, 26 de setiembre de 2019

Tribunal: Dr. Gonzalo Suárez (Presidente), Dra. María Angélica Solari, Dr. Rodolfo Rivero

CI ESTUDIANTE	NOMBRE	CALIFICACIÓN	NOTA
4172386-7	SAPORITI, Tatiana	S.S.S	12

PRESENTADOS	NO PRESENTADOS	APROBADOS	APLAZADOS	INSCRIPTOS
1	0	1	0	1

TRIBUNAL

Dr. Gonzalo Suárez (Presidente)

Dra. María Angélica Solari

Dr. Rodolfo Rivero

FIRMA





NOTA: Las calificaciones de aprobación de la Tesis de Maestría pueden ser:
B.B.B. - 6 , o S.S.S. - 12

Agradezco a quienes orientaron este trabajo, como tutor el Dr. Franklin Riet- Correa y como co- tutor el Dr. Ulises Cuore brindando todo su conocimiento en la temática y su respaldo técnico y personal.

Al Departamento de Parasitología de la DILAVE Montevideo por permitir que se realicen diversos trabajos en su laboratorio y colaborar en estos, permitir el acceso a su biblioteca, brindarnos la cepa susceptible Mozo para trabajar con esta, y apoyar siempre desde lo técnico y lo personal con buena disposición.

Agradezco también al Departamento de Zooterápicos de la DILAVE por colaborar con información para este estudio y ser de gran apoyo logístico y personal.

Agradezco al Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor- Laboratorio de Parasitología, por su colaboración técnica permitiendo realizar una pasantía práctica en su laboratorio, compartiendo su conocimiento con total buena predisposición y hospitalidad.

A los compañeros de INIA que aportaron en lo práctico y personal facilitando el transcurso de este trabajo de una forma grata y cálida.

A los Ing. Enrique Trujillo, Ing. Rocío Hernández y Dra. Camila dos Santos Lagranha por colaborar de forma práctica con el trabajo y hacer la tarea más fácil desde lo personal con una gran predisposición y calidez.

Al Dr. Francisco Martínez Ibañes por compartir información técnica.

A la Mesa de Desarrollo Rural de Tacuarembó por colaborar con el proyecto permitiendo acercarnos a los productores y pudiendo transmitir información relacionada a la temática y a este trabajo en sí.

A los laboratorios Bayer, Microsules, Merial, Grappiolo y Lanodir, por colaborar con insumos de forma desinteresada, con muy buena predisposición y apoyo al trabajo.

A mi familia, Guillermo Arotce, amigos y colegas que apoyaron de forma continua toda esta etapa en la que se llevó a cabo este trabajo aportando desde lo técnico y fundamentalmente desde lo personal.

Esta maestría fue apoyada y financiada por el INIA a través de una Beca de posgrado.

INDICE

1. Resumen	1
2. Summary	1
3. Introducción	2
4. Antecedentes específicos	3
5. Planteamiento del problema	5
6. Hipótesis	5
7. Objetivo	5
7.1. General	5
7.2. Particulares	5
8. Materiales y Métodos	6
8.1. Diseño Experimental	6
8.2. Materiales y Métodos	6
8.2.1. Muestreo de poblaciones de campo	6
8.2.2. Manejo de las garrapatas muestreadas	7
8.2.3. Diagnóstico de resistencia de <i>R. microplus</i> por el TPL	7
8.2.4. Diagnóstico de resistencia de <i>R. microplus</i> al fluazuron	8
8.2.5. Análisis estadístico	9
9. Resultados	10
9.1. Resultados de la caracterización de la cepa susceptible Mozo con el TIAMF ...	10
9.2. Resultados del TIAMF y la encuesta para las poblaciones de campo	10
9.3. Resultados del TPL y la encuesta obtenidos para las poblaciones de campo ...	12
10. Discusión	14
11. Conclusiones	18

1. Resumen

Se estudiaron los perfiles de resistencia de 14 poblaciones de *Rhipicephalus microplus* de Uruguay para cipermetrina, ethión, amitraz, fipronil, ivermectina y flumetrina por medio del test de paquete de larvas. A su vez se caracterizó a una cepa susceptible (Mozo) con el test de inmersión de adultos modificado para fluazuron y posteriormente se utilizó el mismo para evaluar las 14 poblaciones estudiadas con el test de paquete de larvas. Junto con el muestreo de las 14 poblaciones se realizó en cada establecimiento un cuestionario obteniéndose información de características del establecimiento y del manejo de esta parasitosis. Los resultados obtenidos muestran diferentes perfiles de resistencia para los diferentes grupos químicos analizados, observándose poblaciones multirresistentes. Todos estos resultados se discuten según los datos de características del predio y de manejo. Los resultados obtenidos con el test de inmersión de adultos modificado para fluazuron de las 14 poblaciones evaluadas no demuestran ser lo suficientemente precisos para ser concluyentes. A pesar de ello hubo una población que presentó valores de inhibición de la eclosión llamativamente inferior a los de la cepa Mozo, por lo que es necesario continuar con el estudio de la técnica TIAMF así como comparar estos resultados con pruebas *in vivo*. Se considera necesario continuar con el desarrollo de este y otros tests de diagnóstico de resistencia al fluazuron para poder obtener tests de resistencia *in vitro* para todo el espectro de grupos químicos disponibles en Uruguay.

2. Summary

Resistance profiles, for cipermetrin, ethion, amitraz, fipronil, ivermectin and flumetrin, of 14 populations of *Rhipicephalus microplus* from Uruguay were studied by using the larval packet test. It was also characterized a susceptible strain (Mozo) with the modified adult immersion test for fluazuron. This test was later used to evaluate the 14 populations analyzed with the larval packet test. Information related to the characteristics of the farms as well as their management of this disease was gathered by a quiz at the time sampling was being carried out. Results show different profiles of resistance for the different acaricides analyzed including populations with a multiresistant profile. All the results are discussed relating them with the information obtained of the characteristics and management of the different farms. The results obtained by the modified adult immersion test for fluazuron show not to be precise enough to be conclusive. Nevertheless, there was one population that showed remarkable lower levels of hatch inhibition than those shown by the Mozo strain which enhance the importance of studding this technique as well as the importance of comparing these results with an *in vivo* assay. It is necessary to continue developing this and other tests to diagnose fluazuron's resistance in order to count on *in vitro* tests capable of detecting resistance of the complete spectrum of acaricides available in Uruguay.

3. Introducción

Rhipicephalus microplus (*R. microplus*), es la principal ectoparasitosis bovina en Uruguay donde causa pérdidas económicas estimadas entre 32,8 (citado por Cuore, 2017, de informe realizado por IAEA, 1998) y 46 millones de dólares anuales (Muzzio, 2006). Estas pérdidas son a causa de mermas productivas, costos en los que hay que incurrir e incluso las pérdidas debidas a enfermedades transmitidas por estos parásitos (citado por Cuore, 2017, de informe realizado por IAEA, 1998). Existe otra situación grave asociada a los residuos de acaricidas en productos de origen animal. El mal manejo de los acaricidas para controlar esta parasitosis pone en riesgo la inocuidad alimentaria y los mercados comerciales para Uruguay (Nari, 2003), así como para cualquier país exportador de carne y leche. Por lo tanto esta parasitosis se ha considerado un gran problema en la ganadería y es así que su control está legislado adecuándose actualmente la reglamentación por la Ley 18.268, 2008. Dentro de las herramientas que plantea esta ley una de ellas refiere a la zonificación del territorio del país. En la actualidad hay determinadas dos zonas: libre (una superficie geográfica donde no se constata el parásito); y de control (una superficie geográfica donde la garrapata *R. microplus* se encuentra presente y la Autoridad Sanitaria determina las medidas que se deberán tomar para disminuir la presencia de este parásito y de las enfermedades que este trasmite). Una de las medidas que se deberían tomar dentro de un predio en la zona de control es la de realizar un correcto plan sanitario con el objetivo de controlar esta parasitosis, siendo el principal obstáculo para su éxito la resistencia a los garrapaticidas.

La resistencia se podría definir como la reducción en la susceptibilidad de un parásito a determinado acaricida o insecticida cuando es usado a la concentración recomendada y de acuerdo a todas las indicaciones para su uso (FAO, 2004). La utilización de acaricidas reiteradamente y con una alta frecuencia ha llevado a que se den las condiciones para que se desarrolle esta resistencia (FAO, 2004). Se puede determinar si una población de garrapatas *R. microplus* es resistente a determinado acaricida utilizando pruebas *in vivo* y pruebas *in vitro*. Las pruebas *in vivo* se consideran más confiables, por que reflejan realmente lo que sucede cuando un producto es aplicado al animal (Fernandes *et al.* 2012; Whitnall y Bradford, 1947), pero a su vez son más complejas de realizar y también tienen un mayor costo económico. Por otro lado las pruebas *in vitro* son más prácticas de realizar y de menor costo e incluso son las recomendadas para realizar diagnósticos de resistencia a poblaciones de campo (Amaral, 1993). Dentro de los test *in vitro* se han desarrollado diversas técnicas como el Test de Inmersión de Adultos –TIA (Drummond *et al.* 1973), el test de inmersión de larvas –TIL (Shaw, 1966), el Test Tarsal de larvas –TTL (Lovis *et al.* 2011), el TIL con inhibidores enzimáticos (Castro Janer *et al.* 2012) y el Test de Paquete de Larvas –TPL (Stone y Haydock, 1962). Este último es una prueba que, siendo muy práctica, nos permite determinar la resistencia a todas las familias de acaricidas habilitadas en Uruguay menos al Fuazuron (FAO, 2002; FAO, 2004; Castro Janer *et al.* 2009). También es una de las técnicas utilizadas en Uruguay, por la Dirección de Laboratorios

Veterinarios (DILAVE) Montevideo, para el diagnóstico de resistencia, junto con el TIA, y está recomendada por la FAO para el diagnóstico de resistencia de *R. microplus* a los acaricidas (Cardozo, 1996; FAO, 2004). Por último las pruebas moleculares de diagnóstico de resistencia, con las que se cuenta en la actualidad, tienen la ventaja de ser muy sensibles y específicas, pero poseen la gran desventaja que es la dificultad para esclarecer los mecanismos genéticos de resistencia, así como su variabilidad dentro de una población (Sangster *et al.* 2002; FAO 2003).

4. Antecedentes específicos

En Uruguay, el primer antecedente de resistencia fue en 1950 a los arsenicales (citado por Cardozo y Franchi (1994), al que le siguieron los organofosforados en 1978 (Petraccia *et al.* 1983), los piretroides sintéticos en 1994 (Cardozo y Franchi, 1994), las mezclas de piretroides y fosforados en 1994 (Cardozo y Franchi, 1994), el fipronil en 2006 (Cuore *et al.* 2007), el amitraz en 2009 (Cuore *et al.* 2012) y las lactonas macrocíclicas en 2010 (Castro-Janer *et al.* 2010; Cuore *et al.* 2012; Cuore *et al.* 2015). La situación de la resistencia se ha vuelto más difícil debido a la aparición de poblaciones multiresistentes desde 2009 (Cuore *et al.* 2012; Cuore *et al.* 2017). Hay que tener presente que, estando disponible en el mercado desde 1996 hasta la fecha, el fluazuron es el único principio activo sin registros de resistencia en Uruguay (Cuore y Solari, 2014; Cuore *et al.* 2017). Así mismo hasta el momento en Uruguay no contamos con una técnica *in vitro* que nos permita determinar su resistencia.

En 2004 la FAO describió la técnica de inmersión de adultos modificado para fluazuron (TIAMF) y presentó resultados de varias cepas de *R. microplus*. Para la cepa Yeerongpilly (susceptible) se determinó una concentración letal (CL) 50 de 0.0012% y una CL99.9 de 0.004%, para la Ulam (cepa resistente a amitraz) se describe una CL50 de 0.00165% y una CL99.9 de 0.0077%, para la Parkhurst (cepa resistente a piretroides sintéticos) una CL50 de 0.0012%, y una CL99.9 de 0.0039%. Esta técnica fue utilizada por Reck *et al.* (2014) para determinar la susceptibilidad de las cepas Porto Alegre (POA) (susceptible), Jaguar (Resistencia a campo al fluazurón) y Jaguar R (formada a partir de las garrapatas de la cepa Jaguar, presionadas con fluazurón). En este trabajo Reck *et al.* (2014) utilizaron 6 concentraciones crecientes entre 0,05ppm y 500ppm con un factor creciente de 10. Los resultados obtenidos sugirieron que las cepas Jaguar y Jaguar R son resistentes al fluazuron. Por otro lado plantean que se debe continuar investigando con el fin de obtener una dosis discriminatoria y mejores resultados de repetibilidad, para poder determinar la eficacia de fluazuron en poblaciones con alta presión de selección a acaricidas y caracterizar sus mecanismos de resistencia.

El fluazuron es un principio activo que actúa vía sistémica, ingresa vía oral a la garrapata y su mecanismo de acción consiste en una inhibición de la síntesis de quitina afectando así las mudas (de larva a ninfa y de ninfa a adulta) e inhibiendo la eclosión de los huevos (Schmid *et al.* 1994). Esta es una gran ventaja ya que su mecanismo de acción es diferente al de los otros grupos químicos habilitados en Uruguay, por lo tanto, difícilmente exista resistencia cruzada (Roush, 1993). Pero también estas características que presenta plantean una dificultad para la evaluación de su resistencia *in vitro*.

Se ha observado con el correr del tiempo que a medida que surge resistencia a un determinado principio activo se rota a otro para lograr mayor eficacia en los tratamientos (Cardozo, 1995). En la práctica hay evidencias que demuestran que si el nuevo principio activo se utiliza en forma continua e indiscriminada, en un corto período, puede desarrollar resistencia (Rodríguez-Vivas *et al.* 2006). Este accionar ha llevado al desarrollo de poblaciones de *R. microplus* multirresistentes en Uruguay (Cuore *et al.* 2012; Cuore *et al.* 2017). Por el momento en Uruguay no se ha detectado ninguna población de *R. microplus* resistente a fluazuron. Pero debido al aumento en la resistencia de las poblaciones de *R. microplus* y a la aparición de cepas multirresistentes, es esperable un aumento en el uso del fluazuron. Esto se ve reflejado en datos brindados por el departamento de Registro y Control de Productos Veterinarios, del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca de Uruguay, que demuestran que en los últimos 5 años ha habido un aumento en la importación de fluazuron como grado técnico (Figura 1) y como producto comercial. (Figura 2)

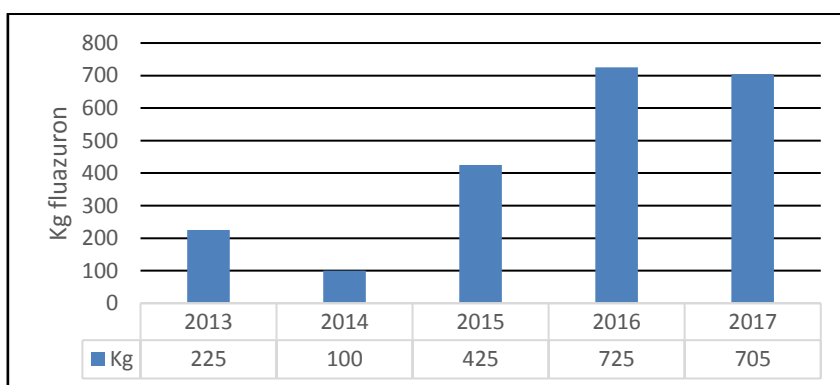


Figura. 1. Kilos de fluazuron, grado técnico, importados por el Uruguay en el periodo 2013-2017

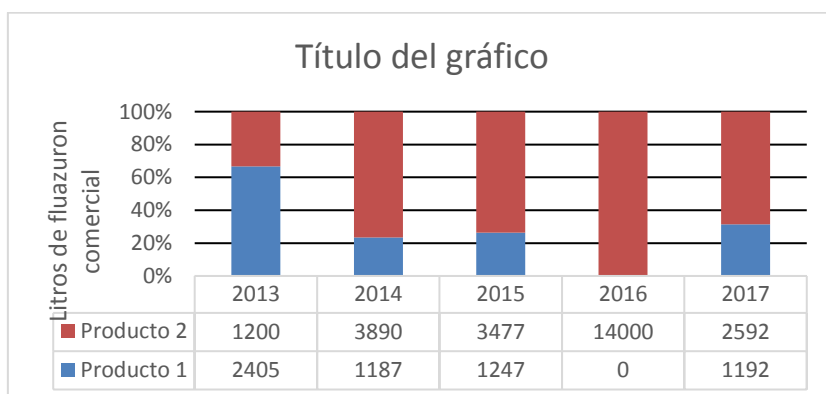


Figura. 2. Litros de dos productos de droga comercial con fluazuron importados en el periodo 2013-2017.

Ese aumento en el uso del fluazuron podría favorecer al desarrollo de resistencia de *R. microplus* a esa droga, la cual es imprescindible detectar a tiempo y tomar las medidas correspondientes para controlar las poblaciones resistentes y evitar su dispersión.

5. Planteamiento del problema

En Uruguay la garrapata *R. microplus* causa pérdidas económicas muy importantes (citado por Cuore, 2017, de informe realizado por IAEA, 1998; Muzzio 2006), tanto es así que su control está legislado adecuándose actualmente la reglamentación por la Ley 18.268, 2008. Hoy en día la principal dificultad para su control es el surgimiento de resistencia a los diferentes acaricidas habilitados en Uruguay. Ante la sospecha de resistencia se puede realizar su diagnóstico, utilizando actualmente el TPL y TIA que se realizan en el departamento de parasitología de la DILAVE Montevideo y permiten confirmar o descartar sospechas de resistencia a los piretroides, organofosforados, amidinas, fenil pirazolas y lactonas macrocíclicas. La posibilidad de descartar una sospecha de resistencia nos permite re direccionar la evaluación de un plan sanitario deficiente, pudiendo deberse esta deficiencia a errores de dosificación (Smith et al., 1999; FAO 2003), o desconocimiento de las características de los acaricidas (Cuore, 2006). Por lo tanto los tests de resistencia brindan información clave para evaluar un plan sanitario y poder tomar decisiones acertadas. Uruguay no dispone, hasta el momento, de una prueba *in vitro* que permita diagnosticar la resistencia al fluazuron permitiendo así conocer el perfil completo de susceptibilidad de una población de *R. microplus*.

6. Hipótesis

El TIAMF es una técnica *in vitro* de la que se puede disponer actualmente para diagnosticar el perfil completo de susceptibilidad, para todos los principios activos disponibles en Uruguay.

7. Objetivo

7.1.General:

Poner a punto la técnica del TIAMF y lograr, junto con TPL, tener herramientas prácticas de diagnóstico de resistencia que permitan cubrir todo el espectro de principios activos actualmente disponibles en Uruguay.

7.2.Particulares:

Caracterizar mediante TIAMF a la cepa susceptible "Mozo".

Evaluar poblaciones de campo mediante el TIAMF y comparar sus resultados con los obtenidos para la cepa "Mozo"

Evaluar los perfiles de resistencia de las poblaciones de campo en relación a la información obtenida mediante un cuestionario.

8. Materiales y Métodos

8.1. Diseño experimental

El diseño experimental aplicado fue enteramente casualizado. Se tomó como unidad experimental a la población de garrapatas por establecimiento. Se realizó un muestreo no probabilístico ya que los predios con los que se trabajó se ofrecieron de forma voluntaria.

8.2. Materiales y Métodos

8.2.1. Muestreo de poblaciones de campo

Entre diciembre de 2017 y mayo de 2018, se muestrearon 14 poblaciones de campo de Uruguay para la determinación del perfil de resistencia de *Rhipicephalus microplus* a la cipermetrina, ethion, amitraz, fipronil, ivermectina y flumetrina mediante el TPL, y fluazuron mediante TIAMF. En cada establecimiento se revisaron todos los animales del predio con el objetivo de obtener 100 ejemplares de *R. microplus* en estadio de teleoginas, plenamente ingurgitadas. Estas se colocaron en cajas de cartón, que contenían en su interior un papel secante humedecido con agua destilada, y estaban selladas con cinta adhesiva dejando libre la tapa por la cual se introdujeron las garrapatas. Una vez finalizado el muestreo se cerraban las cajas, se sellaba la tapa con cinta adhesiva y se agujereaba con una aguja de 18G para permitir la circulación de aire. En estas condiciones eran enviadas al laboratorio para realizar las pruebas de diagnóstico de resistencia *in vitro*.

Al momento del muestreo se realizó una encuesta, detallada en la Tabla I, a los productores o los responsables por el predio para obtener datos de antecedentes de uso de diferentes acaricidas en el establecimiento, cantidad de tratamientos realizados por año para el control de garrapata, sospecha de resistencia a alguno de los acaricidas utilizados y entrada de ganado procedente de otros locales, de establecimientos linderos o tras linderos o por los límites con caminos rurales.

Tabla. I. Encuesta realizada a los productores.

Id. Producto	Veterinario	Fecha de muestreo	Tratamiento pre-muestreo	Sospecha de resistencia	Antecedentes de uso de acaricidas	Nº tratamientos/año	Ingreso de animales al establecimiento
Nº y Nombre	Nombre, celular y e-mail	dd/mm/aa	Principio activo y días previos al muestreo	Principio activo	Historial de uso de cada principio activo	Nº	Origen

8.2.2. Manejo de las garrapatas muestreadas

Para realizar el TIAMF se utilizaron 70 teleóginas (usando 10 garrapatas por dilución) que presentaban las características requeridas para realizar este test (forma uniforme y simétrica, tamaño de no menos de 8 milímetros, coloración marrón, que no fuera amarillenta, rojiza, blanquecina ni negra y capacidad de caminar como signo de viabilidad).

Las teleóginas que no se utilizaron para el TIAMF, se incubaron a 27°C y 85 - 90 % de humedad relativa (HR) dentro de placas de Petri, identificadas con la fecha de muestreo, el nombre del productor y departamento en el que se encontraban los animales de donde fueron extraídas. Pasadas dos semanas se colocó la masa de huevos dentro de tubos de ensayos, que tenían en su interior un algodón humedecido con agua destilada, identificados con una etiqueta conteniendo la misma información que la de la placa de Petri en la que estaban. Se mantuvieron a 27°C y 85% HR y se los monitoreaba diariamente para evaluar su eclosión. Una vez eclosionados los huevos se esperó que las larvas tuvieran entre 14 y 21 días de eclosionadas para poder realizar el TPL.

8.2.3. Diagnóstico de resistencia de *R. microplus* por TPL

Se utilizó el TPL (Stone y Haydok, 1962; FAO, 2004) para diagnosticar resistencia de las 47 poblaciones a la cipermetrina, ethion, amitraz, fipronil, ivermectina y flumetrina. Se utilizó cipermetrina (grado técnico, 93.2 %, cedida por laboratorio Microsules, Montevideo, Uruguay) ethion (analytical standard, Sigma – Aldrich, 45477, Saint Louis, Usa), amitraz (amitraz comercial 12,5%, Acarex, Microsules), fipronil (analytical standard, Sigma – Aldrich, 46451, Saint Louis, USA), ivermectina (ivermectin, Sigma – Aldrich, I8898, Saint Louis, USA) y flumetrina (reference satandard, Bayer, T31100, Monheim, Alemania). Estos se diluyeron en una solución de dos partes de tricloroetileno ($\geq 99\%$, Sigma Aldrich, 24254, Saint Louis, USA) y una parte de aceite de oliva (highly refined-low acidity, Sigma Aldrich, 01514, Saint Louis, USA) a las concentraciones discriminatorias (CD) para la cepa Mozo de cada principio activo descritas en la Tabla II (Cuore y Solari, 2014).

Tabla. II. Concentraciones discriminatorias establecidas con la cepa Mozo para cada una de las drogas utilizadas para conocer el perfil de resistencia de las poblaciones de campo.

	Cipermetrina	Ethion	Amitraz	Fipronil	Ivermectina	Flumetrina
CD (%)	0,3	4	0,2	0,3	4	0,008

CD= Concentración discriminatoria en porcentaje

Se cortaron papeles de filtro (papel filtro hoja 50x50 cm. Whatman 1, DIU código: 20 67968) en rectángulos de 8,5 por 7,5 cm y posteriormente se los impregnó con 0,67 ml de las soluciones anteriormente descritas dejándolos evaporar 24 horas en campana de

extracción de gases. A modo de control se impregnaron papeles únicamente con el solvente (2 partes de tricloroetileno y 1 de aceite de oliva). Para el amitraz se realizó el mismo procedimiento, pero se utilizó papel de nylon (2320, Cerex Advanced Fabrics, Pensacola, FL) de acuerdo a Miller *et al.* (2007). Una vez transcurridas las 24 horas de evaporación, los papeles se doblaron a la mitad y se colocó en cada extremo lateral un clip bull dog con los cuales se formaron los sobres. En cada sobre se colocaron aproximadamente 100 larvas (un cluster de 2 mm de diámetro) por sobre, correspondientes a cada una de las 14 poblaciones de campo muestreadas, cerrándolos, posteriormente, con otro clip bull dog. Estos se incubaron por 24 horas a 27°C y 85-90% de humedad relativa (HR) y con 12 horas luz. Posteriormente se contabilizaron las larvas vivas y muertas por sobre. Se realizó una réplica por población de campo para cada principio activo analizado. Posteriormente, se calculó el porcentaje de mortalidad para cada una de las réplicas utilizadas, por población y por principio activo: $(N^{\circ} \text{ larvas muertas} / N^{\circ} \text{ total de larvas}) * 100$. A partir de estos dos valores se calculó el porcentaje de mortalidad media como: $(\text{mortalidad de la réplica 1} + \text{mortalidad de la réplica 2}) / 2) * 100$. Por último, se calculó el porcentaje de resistencia como: $100 - \% \text{ mortalidad media}$. Por población de larvas estudiada se realizaron dos controles que consistían en paquetes de papeles filtro con las dimensiones y características anteriormente mencionadas pero impregnados con el diluyente (2 partes de tricloroetileno y 1 de aceite de oliva). Cuando en los paquetes control la mortalidad de las larvas superó el 5%, los resultados se corrigieron por la fórmula de Abbot ($\% \text{ mortalidad corregida} = ((\% \text{ mortalidad del grupo tratado} - \% \text{ mortalidad del grupo control}) / (100 - \% \text{ mortalidad del grupo control})) * 100$), cuando superó el 10% se descartaron los resultados. A su vez al evaluar cada población, se realizaba una prueba con la cepa susceptible Mozo como control, para descartar cualquier otro tipo de factor que pudiera estar influyendo en los resultados de la prueba.

8.2.4. Diagnóstico de resistencia de *R. microplus* al fluazuron

Se utilizó el TIAMF para caracterizar a la cepa Mozo, susceptible a todos los principios activos habilitados en Uruguay y mantenida por el departamento de parasitología de la DILAVE Montevideo desde 1973, sin ser presionada por acaricidas ni presentar infección con hemoparásitos (DILAVE, 2013). Para esta caracterización se realizaron 7 repeticiones de cada concentración analizada. Posteriormente se realizó el TIAMF para evaluar a las 14 poblaciones de campo muestreadas, utilizándose 70 garrapatas de la cepa Mozo como control y 70 garrapatas de la población de campo a ser evaluada. Esta técnica consistió en diluir el estándar de fluazuron (analytical standard, Sigma- Aldrich, 46113, Saint Louis, USA) al 5% en una solución de 2% de Tritón X-100 (laboratory grade, Sigma Aldrich, X100, Saint Louis, USA) en acetona (grado técnico, Droguería Industrial del Uruguay, Montevideo, 40033, Uruguay). La solución lograda de fluazuron al 5% (50 000 ppm) se diluyó al 1% con agua destilada obteniendo así una solución tope de fluazuron al 0,05% (500 ppm). Para obtener las concentraciones de 0,05ppm, 0,5ppm, 5ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm, se diluyó la solución tope con agua destilada. El procedimiento consistió en pesar 10 teleóginas seleccionadas por las

características anteriormente descritas y posteriormente sumergirlas en una dilución con fluazuron durante 1 minuto. Se las extrajo del agua destilada y se las secó levemente con papel secante. Esto se realizó para cada una de las diluciones de fluazuron que se mencionaron anteriormente y un grupo de 10 teleoginas se sumergió en agua destilada a modo de control. Posteriormente se las colocó en una placa de Petri identificada con la población a la que correspondían, la fecha en la que se realizó la técnica y la dilución utilizada. Las placas se colocaron a continuación en incubadora a 27°C y 85-90% HR durante 2 semanas. Transcurridas las 2 semanas se pesaron los huevos y se volvieron a incubar por 4 semanas más a 27°C y 85-90% HR dentro de tubos de ensayo, de 10cm de largo y 1,5cm de diámetro, que contenían dentro un tapón de algodón humedecido con agua destilada. Los huevos se colocaban en la mitad del largo de los tubos y estos se tapaban con una torunda de algodón. Transcurridas las cuatro semanas se evaluó su porcentaje de eclosión (FAO, 2004; Reck *et al.* 2014). Para obtener el porcentaje de eclosión se secaron los huevos colocando los tubos de ensayo que los contienen en una estufa a 55°C por 48 horas tapado con la torunda de algodón y 24 horas más sin la torunda. Una vez transcurrido este tiempo en estufa se vaciaba el contenido de cada tubo sobre una hoja A4 blanca. Con una espátula se homogeneizó la muestra y luego se esparcieron 50µl de esta sobre las diagonales de un cuadrado de papel centimetrado de 3cm de lado pintado de amarillo flúor, adherido en el revés del fondo de una placa de Petri. Con una lupa estereoscópica se contabilizaba la cantidad de cáscaras y huevos que se encontraban dentro del cuadrado con la ayuda de un estilete. Para cada muestra, se contabilizaron 5 alícuotas de la forma anteriormente mencionada y se calculó para cada una de ellas el porcentaje de eclosión: $(\text{Cáscaras} / (\text{Huevos} + \text{Cáscaras})) * 100$. Luego se realizó el promedio de estas 5 alícuotas para obtener el porcentaje de eclosión por muestra. (comunicación personal Dr. Martínez Francisco; SENASICA, 1994). El porcentaje de inhibición de la eclosión se evaluó como: $100 - \% \text{ de eclosión}$.

8.2.5. Análisis estadístico

Se realizó una estadística descriptiva para presentar los resultados vinculados al perfil de resistencia de las poblaciones de *R. microplus* analizadas para los diferentes principios activos testeados.

Se utilizó el programa R para realizar una curva concentración respuesta tomando en el eje de x los valores de los logaritmos en base 10 de las 6 concentraciones evaluadas (0,05ppm, 0,5ppm, 5ppm, 50ppm, 100ppm, 500ppm) más el control (0ppm) y en el eje de y el porcentaje de inhibición de la eclosión. Para esta curva se ajustaron los valores según los resultados de inhibición de la eclosión obtenidos para el control (0ppm). Posteriormente se obtuvieron los valores de concentración letal (CL) 50%, CL95% y CL 99% de la cepa Mozo (FAO 2004). Se utilizó una estadística descriptiva para describir el comportamiento del porcentaje de inhibición de la eclosión que tuvieron las distintas poblaciones de campo y la cepa Mozo, para las distintas concentraciones de fluazuron analizadas mediante el TIAMF.

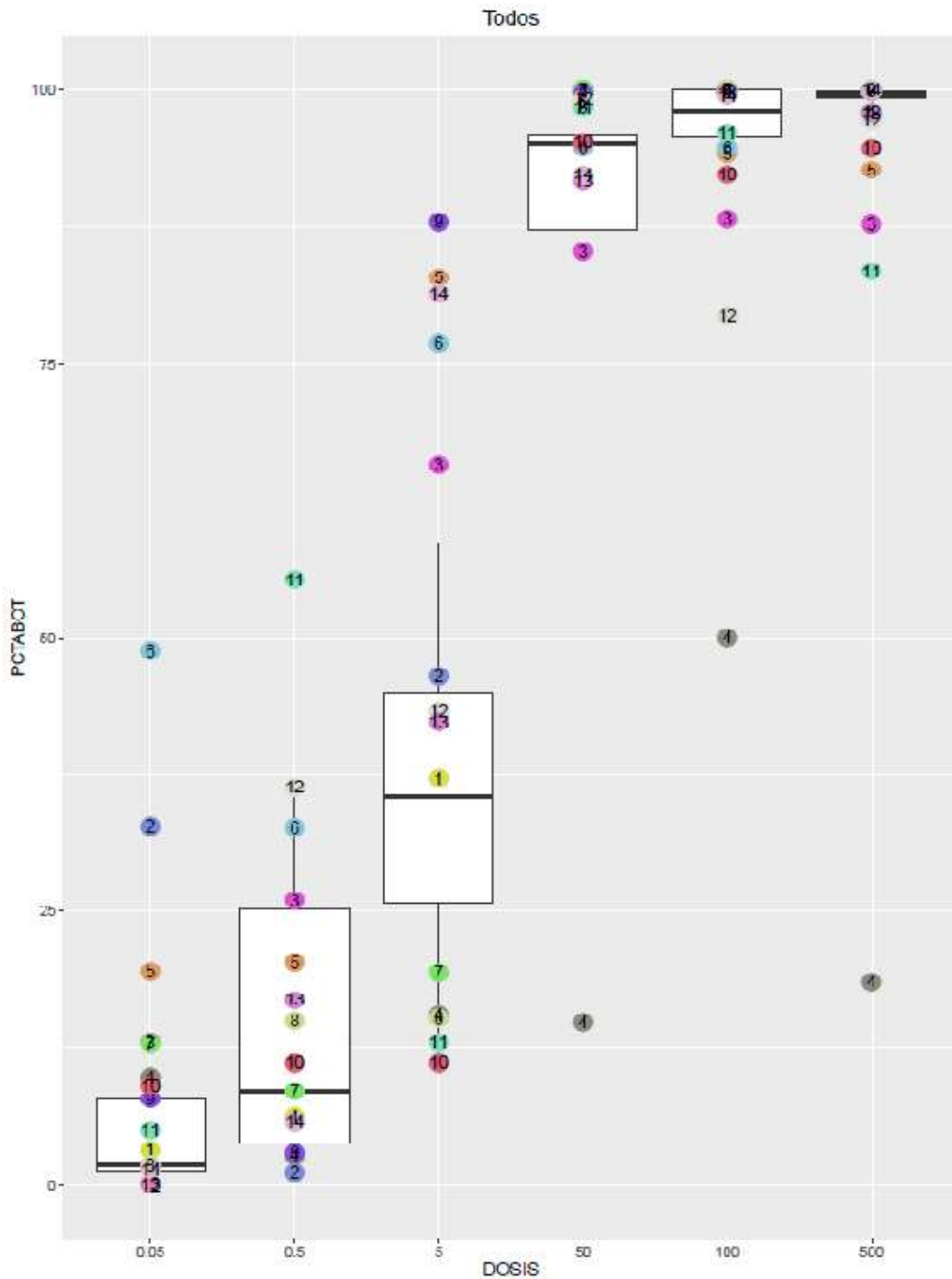


Figura. 4. Distribución de los resultados de eclosión de las poblaciones de campo en relación a los resultados de mediana y desvío estándar obtenidos para la cepa Mozo.

En la Figura 6 se observa que en las distintas concentraciones para las que fue evaluada la cepa Mozo, muchas poblaciones presentaron niveles mayores de inhibición de la eclosión en relación con la cepa Mozo. Por otro lado, hubo poblaciones que presentaron valores de inhibición de la eclosión menores a los observados para la cepa Mozo: para la concentración de 5 ppm la población 10, para la de 50ppm las poblaciones 4 y 5, para la de 100ppm las poblaciones 3, 4, 5, 10, 12. Incluso para la concentración de 500ppm, donde la cepa Mozo alcanza una inhibición de la eclosión de $99,9\% \pm 0,53$, las

poblaciones 1, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 12, 13 presentaron valores inferiores de inhibición de la eclosión. Estas últimas, para la concentración de 500ppm, presentaron relación de inhibición de la eclosión de 1 y 1,2 excepto por la población 4 que fue de 5,4. La población 4, como está detallado anteriormente, también presentó una inhibición de la eclosión inferior a la observada en la cepa Mozo para las concentraciones de 50ppm y 100ppm y se calculó una relación de inhibición de la eclosión de 6,1 y 1,9 respectivamente. A su vez los datos de la encuesta informaron que la población 4 fue la única que tenía sospecha de resistencia a fluazuron. Esta sospecha estaba basada en que cuando se realizaba el tratamiento con fluazuron a la totalidad de animales del predio este tenía un buen resultado exceptuando para los bovinos que se encontraban en un potrero que presentaba frecuentes ingresos de animales de un predio lindero, potrero de donde fueron muestreadas las garrapatas analizadas por el TIAMF.

En algunos casos, para una misma población, se observa que la inhibición de la eclosión a determinada concentración es menor que a concentraciones inferiores. Por ejemplo, en la población 10, la inhibición de la eclosión para las concentraciones de 100ppm y 500ppm son menores que para la concentración de 50ppm, lo mismo se observa para la población 11. También para algunas poblaciones la curva de inhibición de la eclosión en función de las concentraciones se observa de forma irregular. Por ejemplo la población 4 que mantiene un porcentaje de inhibición de la eclosión bajo, que va desde 2,7% a 18,6% para las diferentes concentraciones analizadas, pero para la concentración de 100ppm el porcentaje de inhibición de la eclosión es de un 50%. Lo mismo se observa en la población 12, para la cual se observa que el valor del porcentaje de inhibición de la eclosión tanto para la concentración de 100ppm (79,3%) como de 500ppm (97,2%) es inferior al porcentaje de inhibición de la eclosión a 50ppm (99,1%).

La encuesta demostró que en solo 6 de las 14 poblaciones analizadas se había utilizado anteriormente el fluazuron para su control (hasta 6 tratamientos), siendo una de estas la población 4.

9.3. Resultados del TPL y la encuesta obtenidos para las poblaciones de campo

Los resultados obtenidos mediante el TPL se observan en la tabla III. En esta se puede observar que hay distintas poblaciones con distintos grados de resistencia. Se destaca que los principios activos correspondientes al grupo químico de los piretroides fueron para los cuales se presentaron más poblaciones resistentes (13 resistentes de 14 poblaciones analizadas) y con grados de resistencia más altos. Incluso son los únicos principios activos que presentan poblaciones con grados de resistencia altos.

Se observa a la ivermectina como el principio activo que presenta menores poblaciones resistentes y con menor grado de resistencia.

Tabla III. Poblaciones agrupadas por grados de resistencia para cada principio activo.

Grupo Químico	Principio Activo	Poblaciones por grado de resistencia		
		Alto	Medio	Bajo
Piretroides	Cipermetrina	5	3	5
	Flumetrina	3	1	8
Organofosforados	Ethion	0	2	8
Amidinas	Amitraz	0	2	4
Fenil Pirazolas	Fipronil	0	2	7
Lactonas Macroclílicas	Ivermectina	0	0	5

De las 14 poblaciones analizadas todas presentaron algún grado de resistencia al menos a dos grupos químicos. Más detalladamente se observaron 3 poblaciones con resistencia a 2 grupos químicos de forma simultánea, 7 poblaciones con resistencia a 3 grupos químicos de forma simultánea y 4 poblaciones que presentaron resistencia a 4 grupos químicos de forma simultánea. No hubo ninguna población que fuera susceptible ni resistente simultáneamente a los 5 grupos químicos analizados por TPL.

En la tabla IV se detalla, por principio activo, cuantas poblaciones resultaron resistentes y cuantas tenían antecedentes de haber usado el principio activo. Se puede observar que hay principios activos para los que el número de poblaciones resistentes es mayor al número de poblaciones con antecedentes de uso de este. El caso que más resalta es el de la flumetrina ya que presenta 12 poblaciones resistentes pero no hay antecedentes de uso de este principio activo en ningún establecimiento de origen de estas poblaciones. De las 10 poblaciones que resultaron resistentes al ethion solo para 2 se habían hecho uso de este y para 2 más habían hecho uso de otros principios activos del mismo grupo químico que el ethion (organofosforados). De los 14 establecimientos muestreados 13 de sus poblaciones tenían resistencia a algún principio activo que nunca había sido usado en su establecimiento de origen. Hay que resaltar de la encuesta que hubo poblaciones para las que se utilizó ivermectina y amitraz que sin embargo no se detectaron como resistentes. Hay que tener en cuenta que había establecimientos que tenían pocos registros o registros incompletos de antecedentes de uso de principios activos.

Tabla IV. Poblaciones con antecedentes de uso del principio activo del total de poblaciones resistentes a este

	Cipermetrina	Flumetrina	Ethión	Amitraz	Fipronil	Ivermectina
Resistentes	13	12	10	6	9	5
Con antecedentes de uso	7	0	2	8	6	10

Como se observa en la tabla V no todas las sospechas de resistencia fueron confirmadas mediante el TPL. Es importante aclarar puntualmente para el caso de la flumetrina que se observaron solo 2 poblaciones resistentes de 3 porque la tercera no se pudo analizar dado al poco volumen de muestra. También hubo poblaciones resistentes que no tenían sospechas de resistencia.

Tabla V. Poblaciones resistentes del total de poblaciones que presentaban sospecha de resistencia ordenadas por principio activo

	Cipermetrina	Flumetrina	Ethión	Amitráz	Fipronil	Ivermectina
Resistentes	5	2	2	3	4	3
Sospecha de resistencia	6	3	3	5	7	7

Mediante la encuesta se detectó que en 8 de los establecimientos muestreados había ingreso de animales.

En cuanto al número de tratamientos realizados por año hubo 3 poblaciones que realizaba hasta 6 tratamientos por año y las otras 11 realizaba 7 o más tratamientos por año, incluso 5 de estas 11 realizaban más de 10 tratamientos por año.

10. Discusión

Se logró caracterizar a la cepa susceptible Mozo con el TIAMF, obteniendo para esta una CL 50 de 8ppm. Los resultados presentados por FAO 2004 para varias cepas de garrapatas analizadas mediante el TIAMF presentan diferentes CL 50 (Yeerongpilly, 12 ppm; Ulam, 16,5 ppm; y Parkhurst, 12ppm) todas ellas superiores a la obtenida en este estudio para la cepa Mozo (4,7 ppm). Si bien el trabajo realizado por Reck *et al.* (2014) que analizó mediante el TIAMF a la cepa POA (susceptible a fluazuron) no determinó la CL 50, describe para esta una inhibición de la eclosión de 86% para una concentración de 0.05ppm; mayor que el porcentaje de inhibición de la eclosión que presenta la Mozo (mediana 1,8%) a esta misma concentración. Estos resultados varían según la cepa evaluada, incluso muestran diferentes CL 50 para las diferentes cepas evaluadas, por lo tanto, es recomendable utilizar cepas regionales susceptibles, para fijar la CL50, como control necesario para el TIAMF.

Otro hecho que ocurrió con la cepa Mozo es que presentó un grado de dispersión para la dosis de 5ppm (muy próxima a la CL 50) muy amplia, que fue disminuyendo hacia las concentraciones extremas (500ppm y 0,05ppm). Esto puede deberse a que las diluciones que se estudiaron presentaban una escala muy amplia, lo que implicó que los resultados de inhibición de la eclosión obtenidos a mayor y menor concentración fueran categóricas. Debido a esto se observó que se logró inhibir casi totalmente la eclosión (99,9%), en el caso de la concentración de 500ppm, y se observó un efecto muy bajo de inhibición de la eclosión (2%), en el caso de la concentración de 0,05ppm, obteniendo

en ambas concentraciones resultados con una menor dispersión para las repeticiones realizadas. Lo mismo se observó en las poblaciones de campo en las que fue más amplia la distribución de los resultados obtenidos para la concentración de 5ppm que para las concentraciones extremas (500ppm y 0,05ppm). Para mejorar este aspecto sería importante realizar nuevas pruebas con mayor número de diluciones, principalmente con concentraciones en torno a la CL 50 para poder determinar el comportamiento de la técnica con el uso de concentraciones que no son tan extremas como la 500ppm y la 0,05ppm.

Otra observación respecto a los resultados obtenidos para las poblaciones de campo analizadas con el TIAMF es que estas se agruparon en torno a la curva obtenida para la cepa Mozo. Para algunas concentraciones puntuales, ante la misma concentración que la cepa Mozo presentan un porcentaje de inhibición de la eclosión mayor. Esto podría deberse a que las poblaciones analizadas provienen de campo, por lo cual podrían estar afectadas por condiciones que se dan a campo como por ejemplo radiación solar, desecación, parasitismo por hongos entomopatógenos (Rodríguez- Vivas *et al.* 2014; Sonenshine *et al.* 2002). Se observan también algunas inconsistencias como que en algunos casos para una misma población se observa para concentraciones más altas un menor porcentaje de inhibición de la eclosión así como respuestas irregulares en cuanto a inhibición de la eclosión. Estas variaciones en la inhibición de la eclosión fueron observadas por otros investigadores en la práctica del TIAMF (Reck y Doyle, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor comunicación personal 2018) y resaltan la necesidad de mejorar la repetibilidad de la técnica (Reck *et al.* 2014). Es probable que algunos de los errores que fueron observados en la técnica y en los resultados obtenidos con esta estén relacionados al mecanismo de ingreso del fluazuron a la garrapata. Normalmente las garrapatas ingieren el fluazuron junto con la sangre por un período determinado de tiempo mientras parasitan al animal tratado, solo parte del producto podría tener una acción transcuticular (Schmid *et al.* 1994). Se debería considerar entonces que el TIAMF consiste en una inmersión de 10 garrapatas por un minuto en una solución con fluazuron, donde es difícil determinar la cantidad de fluazuron que ingiere el grupo de 10 garrapatas utilizado en la técnica, que tan pareja fue esa ingesta y que efecto pueda tener en la garrapata. Anteriormente ya había sido cuestionada la idea de utilizar la técnica de inmersión de adultos para realizar diagnóstico de resistencia principalmente para principios activos que actúan de forma sistémica (Jonsson y Hope, 2007) por lo que es necesario seguir realizando estudios para lograr mejorar la técnica (Reck *et al.* 2014). Resulta importante definir, si es posible, alguna concentración discriminatoria o considerar que para poder determinar la resistencia al fluazuron mediante esta técnica es necesario evaluar varias concentraciones y realizar repeticiones para cada población que se vaya a analizar. Se destaca la población 4 que despierta una sospecha de resistencia ya que no solo demostró tener valores de inhibición de la eclosión menores que los de la cepa Mozo para las concentraciones de 0,5ppm, 5ppm, 50ppm, 100ppm y 500 ppm sino que incluso para las concentraciones de 50ppm, 100ppm y 500ppm presentó una relación de inhibición de la eclosión con la cepa Mozo de 6,1; 1,9 y 5,4 respectivamente. En un trabajo realizado por Reck *et al.* (2014) se evaluó mediante TIAMF a la cepa Jaguar de *R. microplus*, que presentó dificultades al intentar ser

controlada con un tratamiento a campo con fluazuron. Los resultados de dicha evaluación demostraron que esta cepa presentó resistencia al fluazuron ya que para una concentración de 500ppm lograba una inhibición del porcentaje de eclosión de un 52% mientras que en la cepa susceptible POA la inhibición de la eclosión a esta concentración fue de un 99%. Incluso posteriormente se presionaron con fluazuron las garrapatas de la cepa Jaguar que resultaron resistentes al primer TIAMF y se les realizó nuevamente la prueba obteniendo a 500ppm una inhibición de la eclosión de un 20%. Vinculando esto a nuestros resultados podríamos clasificar a la población 4 como resistente al fluazuron ya que el porcentaje de inhibición de la eclosión que esta presentó al ser testeada con el TIAMF para 500ppm fue de 18,6% mientras que para la cepa Mozo fue de un 99,9%. Es de relevancia que la población 4 fue la única que presentaba una sospecha de resistencia al fluazuron, basada en que cuando se trataba con fluazuron a la totalidad de animales del predio este tenía un buen resultado exceptuando para los bovinos que se encontraban en un potrero que presentaba frecuentes ingresos de animales de un predio lindero. Esto estaría fundamentando la sospecha de resistencia pero también se debe considerar que al ser un producto de aplicación por derrame dorsal y efecto sistémico, su eficacia y poder residual puede estar afectado por factores climáticos, estado fisiológico del animal o aplicación del producto. Para comprobar definitivamente la resistencia de esta población a fluazuron es necesario realizar una prueba en boxes.

En cuanto a los resultados obtenidos para las poblaciones de campo mediante el TPL se observó una situación diversa en torno a la resistencia de *R. microplus* a los acaricidas. Por un lado hay grados variables de resistencia para los diferentes grupos químicos analizados, y por el otro cada uno de los predios presentó algún grado de resistencia al menos a dos de los grupos químicos analizados. Esta situación puede deberse a que hace más de 50 años que se comenzaron a usar moléculas acaricidas. Al comienzo se utilizaban los arsenicales, para los cuales se comenzó a detectar resistencia en 1950. Según el departamento de Zooterápicos del Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP, datos no publicados) en la década del 60 se registraron los organofosforados. A este grupo químico le siguió el de las amidinas registradas por primera vez en 1979 y a continuación el de los piretroides y las combinaciones de organofosforados y piretroides en 1985. En el año 1988 se registraron las lactonas macrocíclicas, en 1996 el fluazuron y en 1997 los fenilpirazoles. A medida que han ido surgiendo las moléculas mencionadas anteriormente se han ido incorporando como herramientas de control de esta parasitosis. La variación en el uso de estas a lo largo del tiempo ha dependido de factores como la resistencia a estas moléculas y aspectos económicos o comerciales (Cardozo, 2007; Cuore, 2016). Por otro lado, es importante tener en cuenta que los establecimientos que se utilizaron para este estudio pertenecen a productores que se ofrecieron de forma voluntaria a participar, probablemente porque presentaban alguna dificultad en el manejo de esta parasitosis, y con sospechas de resistencia a algún acaricida.

Hubo poblaciones que presentaron resistencia a principios activos para los que no contaban con registros de haber sido utilizados en sus predios de origen. Esto podría deberse al ingreso de animales al establecimiento ya que hubo 8 de los 14 predios muestreados en los que se declaró ingreso de animales en la encuesta. En el momento

que ingresan animales parasitados a un establecimiento pueden introducir garrapatas al predio. Considerando que la capacidad de resistencia se transmite genéticamente a la descendencia (Alonso y col, 2006) estas garrapatas podrían introducir a la población genes resistentes a principios activos que no hayan sido utilizados en el establecimiento. Esta situación podría favorecer la difusión de la resistencia en el país que a su vez resulta muy difícil de manejar debido al pelo de los animales y el tamaño de las larvas (1mm de diámetro) lo que hace que estas suelen no verse y animales que se consideran libres en realidad pueden presentar esta parasitosis. Es por esto que resulta imprescindible que los productores adopten medidas de bioseguridad al momento de la introducción de ganado al predio y medidas de prevención de ingreso de animales, como tener los alambrados en buenas condiciones y realización de cuarentena. Esto también puede deberse a que hubo establecimientos que contaban con registros incompletos de antecedentes de uso de principios activos, por lo tanto, podrían haber utilizado principios activos con anterioridad para los cuales no tuvieran registro.

La frecuencia de tratamientos es uno de los principales factores para el desarrollo de resistencia (Denholm y Rowland, 1992; FAO, 2003). En Uruguay para el control de la garrapata utilizando el tratamiento generacional se recomiendan 5 o 6 tratamientos por año (Cuore et al., 2009). De los 14 establecimientos evaluados 11 realizaban 7 o más tratamientos por año excediendo el número recomendados y así pudiendo favorecer al desarrollo de resistencia. Esto puede deberse a la presencia de resistencia a los acaricidas, y la consecuente disminución en su eficacia, pero también podría deberse al desconocimiento de la correcta forma de uso y actuación de los acaricidas (Cuore, 2006). Para dilucidar la causa es recomendable realizar pruebas de resistencia a las garrapatas y determinar entonces las drogas a ser utilizadas para poder aplicar utilizando el tratamiento generacional.

Se observaron diferentes situaciones en relación a la sospecha de resistencia, ya que para todos los principios activos hubo sospechas de resistencia que no se confirmaron por TPL. Esto puede tener diversas explicaciones, por ejemplo un mal cálculo de dosis o concentración del acaricida con el que estamos tratando a los animales (Smith et al. 1999; FAO, 2003). Otra causante puede ser el desconocimiento de que factores climáticos, como la irradiación solar, las lluvias inmediatamente posteriores al tratamiento (Cuore et al. 2008) y las altas temperaturas capaces de descomponer el producto (FAO, 1996), pueden concluir en animales subdosificados. También el desconocimiento del modo de uso del producto y de su acción, pueden llevar a falsas sospechas de resistencia (Cuore, 2006). Un ejemplo claro es cuando productores esperan ver un efecto de volteo en productos que no lo tienen. Para aquellos acaricidas que se administran de forma sistémica es también importante resaltar que su efecto puede variar ampliamente entre animales (según su peso, condición corporal y estado fisiológico) (Schmid et al. 1994) así como entre formulaciones (Cuore et al. 2016). Puntualmente para el caso de Ivermectina y firponil debemos tener en cuenta que la técnica utilizada para estudiar estos principios activos no es la más sensible (Castro y col., 2012), sin embargo nos permite determinar poblaciones con un grado avanzado de resistencia.

La cipermetrina y la flumetrina presentaron una distribución similar en cuanto al número de poblaciones resistentes y el grado de resistencia que estas presentan. Ambos principios activos pertenecen al mismo grupo químico, los piretroides, lo cual puede explicar esta situación como un caso de resistencia cruzada. La resistencia cruzada se da debido a que dos principios activos presentan un mecanismo de resistencia similar, por lo cual la generación de resistencia a uno de ellos lleva a la resistencia al otro (Roush, 1993). Esto también se ve reflejado en los resultados relacionados a sus antecedentes de uso, ya que sin encontrarse ninguna población con antecedentes de uso de flumetrina hay 12 de 14 poblaciones resistentes (teniendo en cuenta que hubo una población a la que no se le pudo hacer la prueba por el poco volumen de muestra). Esto probablemente pueda explicarse por la resistencia cruzada generado por aquellas poblaciones que sí han hecho uso de cipermetrina. También tanto la cipermetrina como la flumetrina, son los principios activos que presentan más poblaciones con un grado de resistencia alto y solo una población sensible lo que sugiere que la resistencia a este grupo químico de acaricidas está diseminada. Esto puede explicarse por la resistencia cruzada pero también porque los mismos fueron utilizados ampliamente para el control de *R. microplus* desde su surgimiento, liderando el mercado principalmente debido a razones comerciales, hasta que comenzaron a surgir los primeros problemas de resistencia (Cardozo, 2007) y teniendo el primer diagnóstico oficial de resistencia en 1994 (Cardozo y Franchi, 1994).

11. Conclusiones

Aunque es necesario seguir trabajando en poner a punto el TIAMF, para disponer de una técnica de diagnóstico in vitro de resistencia al fluazuron, los resultados obtenidos para la población 4 muestran que esta presenta una clara sospecha de resistencia. Para poder confirmarla es necesario poder realizar pruebas en boxes.

Seguir trabajando esta técnica para su validación permitirá complementar al TPL para lograr disponer de técnicas in vitro que permitan obtener resultados de todo el espectro de acaricidas disponibles en Uruguay.

Se destaca que en todos los predios analizados se observan diversos grados de resistencia de *R. microplus* a los 6 principios activos analizados con el TPL (Cipermetrina, Ethión, Amitraz, Fipronil, Ivermectina, Flumetrina). Considerando que son ampliamente utilizados para el control de *R. microplus* constituye un problema importante para el control de este parásito.

La introducción de ganado con garrapatas resistentes a los establecimientos es un factor importante para el control de esta parasitosis en los predios.

Los test de resistencia permitieron confirmar y descartar sospechas de resistencia, brindando de esta manera información al productor para la selección de principios activos al momento de encarar un plan sanitario contra *R. microplus*. Es por esto que cuanto más completa sea esta información más útil será para el productor.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alonso- Díaz MA, Rodríguez- Vivas RI, Fragoso- Sánchez H, Rosario- Cruz R, (2006) Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. Arch. Med. Vet 38(2): 105- 113.
2. Amaral N.K. (1993). Guidelines for de evaluation of ixodicides against the cattle tick *Boophilus micróplus* (Canestrini,1887) (Acari:Ixodidae). Rev. Bras. Parasitol. 2 (2):144-151.
3. Cardozo H. (1995). Situación de resistencia de *Boophilus microplus* en Uruguay. Medidas para controlarla. III Seminario internacional de parasitología animal, "Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria", 11-13, Octubre, Acapulco, México, P 30-38.
4. Cardozo H. (1996). Situación de la resistencia del *Boophilus microplups* en Uruguay. Medidas para controlarla. Veterinaria 32 (132):15-19.
5. Cardozo H y Franchi M. (1994). Epidemiología y Control de *Boophilus microplus*. En: Nari A. & Fiel C. Enfermedades parasitarias de importancia económica en Bovinos; Bases epidemiológicas para su prevención y control en Argentina y Uruguay. Ed. Hemisferio Sur 1^{da} ed. Montevideo, Cap. 18, pp.369-402.
6. Cardozo N. (2007). Resistencia de la garrapata (*B. microplus*) a los acaricidas. Disponible en: http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/104-resistencia.pdf (verificado el 21 de Noviembre de 2018).
7. Castro-Janer E, Rifran L, González P, Piaggio J, Gil A, Schumaker T.T.S. (2010). *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) fipronil resistance reports in Uruguay and its evaluation by *in vitro* bioassays. Vet Parasitol 169: 172–177.
8. Castro-Janer E, Rifran L, Piaggio J, Gil A, Miller R.J, Schumaker T.T.S. (2009). *In vitro* tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. Vet Parasitol 162: 120–128.
9. Castro- Janer E, Schumaker T.T.S, Klafke G.M, Rifran L, González P, Niell C, Namindome A, Gil A, Piaggio J, Martins J.R, Mendes M.C, Miller R.J. (2012). Garrapata: Resistencia a fipronil e ivermectina en rodeos vacunos de Uruguay y Brasil. Disponible en: <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2830/1/18429230712114518.pdf> (verificado 08 de Noviembre de 2019).
10. Cuore U. (2006). Resistencia a los acaricidas, manejo y perspectivas. XXXIV Jornadas Uruguayas de Buiatría, 8-10, Junio, Paysandú, Uruguay, P 30-35.
11. Cuore U, Acosta W, Bermudez F, Da Silva O, Garcia I, Perez Rama R, Luengo L, Trelles A, Solari M.A. (2015). Tick generational treatment. Implementation of a methodology to eradicate *Rhipicephalus microplus* tick resistant to macrocyclic lactones in a population management. Veterinaria 51 (198): 14-25.
12. Cuore U, Altuna M, Cicero L, Fernandez F, Luengo L, Mendoza R, Nari A, Perez Rama R, Solari M.A, Trelles A. (2012). Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de *Rhipicephalus microplus* en Uruguay. Veterinaria 48 (187): 5-13.

13. Cuore U, Cardozo H, Trelles A, Nari A, Solari M.A (2008). Características de los garrapaticidas utilizados en Uruguay. Eficacia y poder residual. *Veterinaria* 43 (169): 13-24.
14. Cuore U, Trelles A, Sanchís J, Gayo V, Solari M.A, (2007). Primer diagnóstico de resistencia al Fipronil en la garrapata común del ganado *Boophilus microplus*. *Veterinaria* 42: 35-41.
15. Cuore U, Solari M. A, Císero L, Gayo V, Nari A, Trelles A. (2009). Tratamiento generacional de la garrapata. Disponible en: http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/multimedia/1804_20_tratamiento_generacional_de_la_garrapata.pdf (Verificado el 09 de Abril del 2019).
16. Cuore U y Solari M.A. (2014). Poblaciones multirresistentes de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. *Veterinaria* 50:4-12.
17. Cuore U, Solari MA, Piaggio J, Chelle B, Di Rienzo D, Machado N, Politi P, Trelles A, Rampoldi O. (2016). Comportamiento biológico y farmacocinético de dos formulaciones comerciales de ivermectina 3,15% en bovinos. *Veterinaria* 52 (201): 13-22.
18. Cuore U, Solari M A, Trelles A. (2017). Situación de la resistencia y primer diagnóstico de poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistente a cinco principios activos en forma simultánea en Uruguay. *Veterinaria* 53: 13-19.
19. Denholm I. y Rowland M.W. (1992). Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: Theory and Practice. *Anu. Rev. Entomol* 37: 91-112.
20. Drummond R.O, Ernst S.E, Trevino J.L, Gladney W.J, Graham O.H. (1973). *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory test of insecticides. *J. Econ. Entomol* 66:130-133.
21. FAO (1996). Manual sobre el almacenamiento y el control de existencias de plaguicidas. Colección Fao: Eliminación de Plaguicidas 3: 1-35.
22. FAO (2002). Pruebas diagnósticas de resistencia en *Boophilus microplus*. 1^{er} Curso Taller Regional, 20-22, Noviembre, Montevideo, Uruguay, P 1-51.
23. FAO (2003). Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. *Estudio FAO, producción y Sanidad Animal* 157:1-51.
24. FAO (2004). Ticks: Acaricide resistance: Diagnosis, Management and prevention. En FAO Agriculture Department (2004). *Guidelines Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants*. Ed. FAO. Roma, Cap. 1, pp 25-77.
25. Fernandes É.K.K, Bittencourt V.R.E.P, Roberts D.W. (2012). Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Exp parasitol* 130: 300-305.
26. Jonsson N.N. y Hope M. (2007) Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet. Parasitol* 146: 193-198.
27. Lovis L, Perret J.-L, Bouvier J, Fellay J.-M, Kaminsky R, Betschart B, Sager H. (2011). A new *in vitro* test to evaluate the resistance level against acaricides of the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Vet Parasitol* 182:269-280.

28. Miller RJ, Davey RB, White WH, George J.E. (2007). A comparison of three bioassay techniques to determine amitraz susceptibility in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Entomol.* 44(2): 283-94.
29. Muzzio, F. (2006) Programa de la lucha contra la garrapata. I Seminario Taller – Aportes a la lucha contra la garrapata, 15, Noviembre, Durazno, Uruguay, P 1-69.
30. Nari A, Eddis C, Martins J, Benavides E. (2003). Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. Estudio FAO, producción y Sanidad Animal 157, Roma, FAO, 52.
31. Petraccia C, Cardozo H, Nari A, Solari M.A. (1983). Estudios de resistencia a garrapaticidas organofosforados (OF) en *Boophilus microplus*. *Veterinária* 19:5-9.
32. Reck J, Klafke M.G, Webster A, Dall’Agnol B, Scheffer R, Araújo Souza U, Bamberg Corassini V, Vargas R, Silveira dos Santos J, Ricardo de Souza Martins J. (2014). First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet Parasitol* (201): 128–136.
33. Rodríguez-Vivas R.I, Alonzo- Díaz M.A, Rodríguez-Arévalo F, Fragoso- Sánchez H, Santamaría V.M, Rosario- Cruz R. (2006). Prevalence and potential risk factors for organophosphates and piretroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the state of Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol* 136: 335-342.
34. Rodríguez- Vivas R.I, Rosado-Aguilar J.A, Ojeda-Chi M.M, Pérez-Cogollo L.C, Trinidad-Martínez I, Bolio-González ME. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recur agropecuarios* 1 (3); 295-308.
35. Roush RT. (1993). Occurrence, Genetics and Management of Insecticide Resistance. *Parasitology Today* 9: 174-179.
36. Sangster N, Batterham P, Chapman H.D, Duraisingh M, Le Jambree L, Shirley M, Upcroft J, Upcroft P. (2002). Resistance to antiparasitic drugs: the role of molecular diagnosis. *Int. J. Parasitol* 32:637-653.
37. Schmid H, Oechslein W, Hess E, Kobel W, Mayer W. (1994) Technical Summary for Registration. Acatak Pour-On Tick Development Inhibitor. Ed. CIBA-GEIGY.
38. SENASICA, Secretaría de Agricultura y Recursos Hídricos (1994) NORMA Oficial Mexicana Nom-006-ZOO-1993. Requiritos de efectividad biológica para los ixodidas de uso en bovinos y método de prueba. *Diario Oficial* 55-71.
39. Shaw R.D. (1966). Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Canestrini) and assesment of its resistance spectrum. *Bull. Ent. Res* 56 (4):389-406.
40. Smith, G, Grenfell, B.T, Isham, V. & Cornell, S. (1999). Anthelmintic resistance revisited: under-dosing, chemoprophylactic strategies, and mating probabilities. *International Journal for Parasitology* 29: 77-91.
41. Sonenchine D.E, Lane S.R, William L.N, (2002) Ticks (Ixodida). En Mullen G. y Durden L. (2002) *Medical and Veterinary Entomology*. Academic Press 1st ed, Boston, Cap. 24, pp 517-558.
42. Stone B. F y Haydock K.P. (1962). A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Bull. Ent. Res* 53:563-578.
43. Whitnall A.B. y Bradford B. (1947). An arsenic resistant tick and its control with gammexane dips. *Bull. Entomol. Res* 38:353-372.

