



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Veterinarias

Corrientes – Argentina

PROYECTO FINAL DE GRADUACIÓN

MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA

OPCIÓN: CLÍNICA DE GRANDES ANIMALES.

TEMA: Comparación de técnicas de bioensayos garrapaticidas “test de paquete larvario e inmersión de adultas” para evaluar la susceptibilidad de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente a Fipronil.

TUTOR EXTERNO: Dr. Citroni, Daniel.

TUTOR INTERNO: Dra. Lozina, Laura.

RESIDENTE: Perone, Federico Martín.

Email: peronemartinfederico@gmail.com

RESUMEN

En la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE, se realiza el diagnóstico de resistencia a la mayoría de los principios activos utilizados en el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, inclusive a Fluazurón, este último se confirma por prueba biológica. Últimamente, se ha tornado difícil la limpieza de tropa y el control de la garrapata en muchos establecimientos. Fruto de esta situación se incrementó el envío de garrapatas para el diagnóstico de resistencia. En el laboratorio se realiza de rutina la técnica de inmersión de adultas para los garrapaticidas de contacto y el test de paquete larvario para todas las moléculas. Para el caso del Fipronil, se utiliza el test de paquete larvario, sin embargo, y con el fin de obtener un resultado preliminar más rápido se estandarizó una técnica de inmersión de adultas. De las 127 muestras ingresadas al laboratorio de fármacos garrapaticidas, se seleccionaron $n=31$ muestras (por solicitud de los propietarios de los establecimientos) para efectuar el ensayo de Inmersión de Adultas, de ellas 17 fueron sensibles al Fipronil en un 100 %, mientras que 7 tuvieron un % de control mayor o igual al 80% y por último 4 de ellas tuvieron un porcentaje de control menor al 80%. Para el caso de la técnica de LPT, utilizando la dosis discriminatoria se observó la muerte de todas las larvas en las muestras que se mostraron sensibles para la técnica de inmersión de adultas al igual que las de mayor o igual a 80%. Coincidentemente, en las 4 muestras, cuyo porcentaje de eficacia fue menor al 80%, se observó un grado de resistencia en el test de paquete larvario. Por lo expuesto, a partir de este trabajo se compararon las técnicas sobre estadios adultos y larvas y se estableció un punto de cohorte para relacionar estas dos técnicas.

INTRODUCCIÓN

La garrapata común del bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* produce severos perjuicios económicos para la ganadería del norte argentino, donde no es posible obtener una rentabilidad adecuada sin su control (Spath et al., 1994).

El control de este parásito se basa, mayoritariamente, en el uso de acaricidas químicos, los cuales, según su mecanismo de acción se pueden dividir en dos categorías; los que actúan a nivel de neurotransmisores, interfiriendo con la generación y conducción del impulso nervioso, provocando depresión o exacerbación del mismo, dando como resultado la muerte del parásito ya sea por parálisis flácida o hiperexcitabilidad. Dentro de esta categoría se encuentran los Organofosforados, Piretroides Sintéticos, Amidinas, Fenilpirazoles y Lactonas Macroclínicas. Por otro lado, se encuentra el grupo de las Bezoilfenilureas, principalmente Fluazurón, acaricida que actúa interfiriendo en el proceso de muda del ectoparásito inhibiendo la síntesis de quitina e impidiendo así que éste evolucione de su forma de vida larvaria a la de adulto. Estos fármacos se pueden administrar por vía parenteral, por medio de baños de inmersión o aspersión, o por derrame dorsal (pour-on) (Guglielmone et al., 2017).

Aunque el control de las garrapatas se basa principalmente en el uso de productos químicos, el desarrollo de resistencia a estos compuestos es una grave amenaza para la sostenibilidad de este enfoque. El desarrollo de resistencia en artrópodos depende de la frecuencia de aplicación de los insecticidas, así como ciclos de vida de los insectos. La resistencia de *R. microplus* a organofosforados, piretroides sintéticos y amitraz se ha descrito alrededor del mundo, principalmente en Australia y Latinoamérica. Esta resistencia de las garrapatas a los acaricidas es conferida principalmente por dos importantes mecanismos fisiológicos, la insensibilidad del sitio y el incremento en la actividad de enzimas metabólicas, tales como esterasas, oxidasas mixtas y glutatión-S-transferasas (Rodríguez Vivas *et al.*, 2012).

Para el diagnóstico de resistencia se utilizan técnicas *in vitro* las que se basan en bioensayos y se realizan tanto en parásitos adultos (Drumond, 1973) y larvas (Stone y Haydock, 1962), ambas técnicas están validadas por la FAO (siglas en inglés: Food and Agriculture Organization). Estas técnicas permiten obtener un diagnóstico orientativo del perfil de la resistencia generada a campo a los antiparasitarios a partir de distintas poblaciones de garrapatas (FAO, 2004; Cuore, 2014).

Este diagnóstico, es quizás, una de las primeras herramientas que se debería utilizar en un plan de control estratégico de esta parasitosis, ya que permite racionalizar la elección de los garrapaticidas a emplear, tanto la dosis como la concentración utilizada, que evitan no solo la subdosificación sino la sobredosificación, determinar la frecuencia y el momento de las aplicaciones y una correcta rotación de productos (Kunz, 1994). Todo esto resulta en una mayor eficacia en el control de las garrapatas y un incremento en la vida útil de los productos, al evitar la aparición de la etapa de emergencia de la resistencia parasitaria.

El presente trabajo, se realizó a fin de analizar dos técnicas para determinar el diagnóstico de resistencia adquirida a campo de poblaciones de garrapatas al Fipronil, una droga del grupo de Fenilpirazoles, un acaricida de amplio espectro que actúa por contacto e ingestión, tiene efecto sobre el sistema nervioso central interfiriendo en la transmisión GABA (ácido gamma-aminobutírico) sobre los canales de cloro.

OBJETIVOS

Objetivos generales:

- Evaluar el perfil de sensibilidad de poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* frente a Fipronil mediante técnicas de Inmersión de adultos y Test de paquete larvario.

Objetivos particulares:

- Estandarizar el test de paquete larvario para Fipronil y obtener la dosis discriminatoria para la cepa “SENASA” de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, de referencia sensible.
- Comparar las técnicas de inmersión de adultos y la de paquete larvario.

- Determinar la resistencia adquirida a campo de poblaciones de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de diferentes establecimientos.

MATERIALES Y METODOS

-Cepa de garrapatas utilizada: El Laboratorio de Fármacos Garrapaticidas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE), mantiene la cepa de garrapatas (*R. microplus*) de referencia sensible, la cual fue originalmente cedida por el Campo experimental del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), Camba Punta. Las larvas que se utilizaron fueron aquellas de entre 14 a 21 días de edad. Teniendo en cuenta que a partir del día en que la hembra adulta, plenamente ingurgitada (teleogina), es puesta a incubar se requieren 14 días para la postura de los huevos, 25 días más, en promedio, para que comience la eclosión de los huevos y posteriormente 14 a 21 días más para que las larvas alcancen la edad establecida. Por lo que, en total, se requieren entre 32 a 45 días. Transcurrido 14 días de incubación la masa de huevos fue separada, pesada y colocada en un tubo de eclosión cerrado por un tapón de algodón en su extremo superior. Una vez iniciada la eclosión de los huevos se esperaron de 14 a 21 días, edad ideal de las larvas para realizar la prueba.



Figura 1: A: Tubo con larvas de cepa seleccionada para la prueba.

- **Test de inmersión de adultos:** Se efectuó la inmersión, durante 5 minutos, de n=10 teleoginas seleccionadas en una solución de 5 ppm de Fipronil y el mismo procedimiento se llevó a cabo para el grupo considerado como control, en este caso la inmersión de las mismas fue solo en agua. Ambos grupos, tratado y control, fueron incubados en placas de petri

durante 14 días, a 27°C y 80% de humedad relativa (HR). Posteriormente, se retiraron las garrapatas (keneoginas) y se pesa la masa de huevos, siendo este la diferencia entre el peso actual y el peso del fondo de la caja. Los huevos se ponen a incubar durante 25 días más. El día +39 se determinó visualmente la eclosión de los huevos incubados, comparando la masa total de huevos eclosionados versus los no eclosionados, expresados en porcentaje de eclosión. Así, se obtuvo el parámetro Reproducción estimada (RE)= peso de los huevos /peso de las hembras incubadas*% de eclosión y posteriormente se calculó el porcentaje de control= RE control-RE tratado/RE control *100. Un tercer grupo, de n=10 garrapatas, fue incubado para la obtención de larvas y la posterior realización del test de paquete larvario.

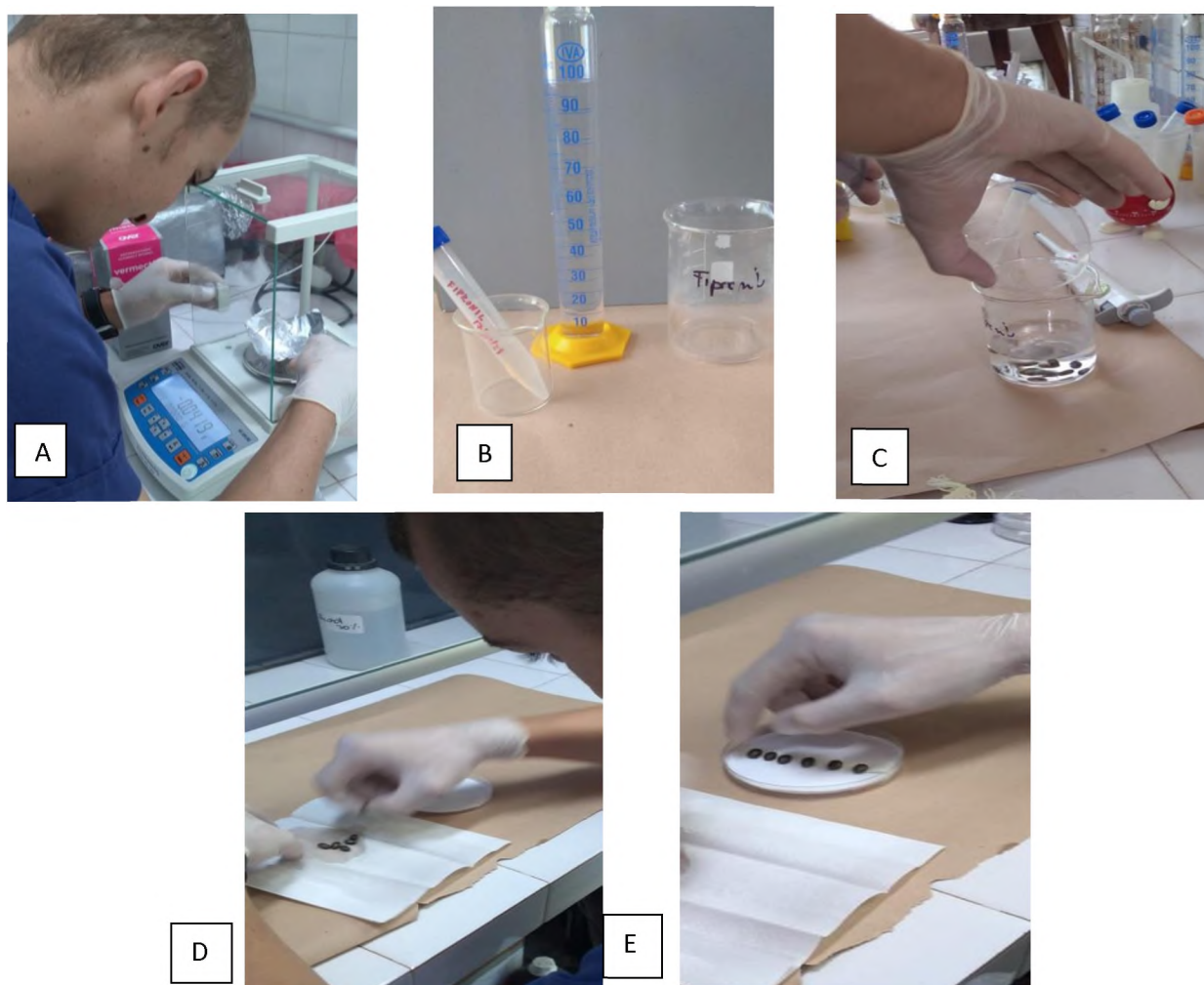


Figura 2: A: Pesaje de droga; B: Solución de Fipronil para inmersión; C: Inmersión de adultas; D: Secado en papel absorbente; E: Teleoginas en placa de petri para incubar.

-Test de paquete larvario: Permite evaluar el perfil de sensibilidad de larvas de garrapatas a partir de su exposición a papeles impregnados con distintas concentraciones del acaricida.

Este ensayo, una vez estandarizado para la obtención de la dosis discriminatoria, utilizando cepa sensible, permite diagnosticar el grado de resistencia adquirido a campo para una determinada población de garrapatas (Stone & Haydock, 1962).

-Preparación de los papeles impregnados con Fipronil: Todo el procedimiento se realizó en campana de extracción de gases y utilizando los elementos de bioseguridad correspondientes. Se empleó papel Wathman N°1 de tamaño 7,5 x 8,5 cm, el cual fue embebido con 0,67ml de una solución conteniendo Fipronil en diferentes concentraciones. Se utilizó una mezcla de solventes, dos partes de tricloroetileno y una parte de aceite de oliva extra virgen. Para impregnar los papeles, éstos, se colocaron sobre un dispositivo metálico, de pequeña superficie, con cuatro puntos de contacto que coincidían con los vértices de cada papel. Con la ayuda de una pipeta, se comenzó con la impregnación de los papeles usados como control (impregnados solamente con la mezcla de solventes antes mencionada), continuándose por las sucesivas diluciones de Fipronil (0.006, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2) de manera ascendente, a modo de minimizar los errores por cambios en las concentraciones de las mismas. Finalmente, con la ayuda de clips tipo Bulldog sujetando los vértices de los papeles, éstos se dejaron secar a temperatura ambiente por 24 horas. Esta metodología se realizó por triplicado, tanto para los papeles control como para las sucesivas diluciones del principio activo. Una vez secos, los papeles fueron guardados en sobres individuales de papel aluminio, y mantenidos en refrigerador, protegidos de elevada humedad, temperatura y exceso de luz hasta el momento de su uso.

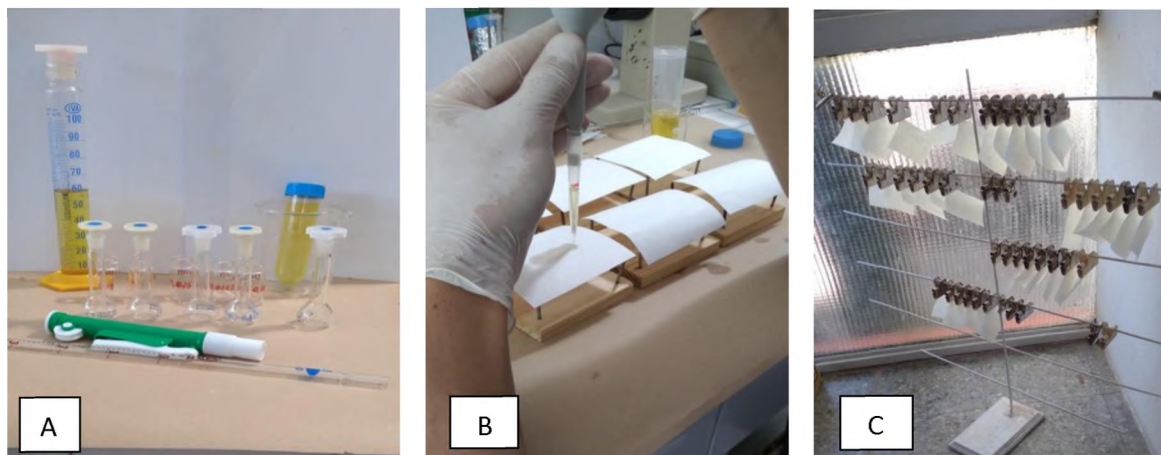


Figura 3: **A:** Diferentes concentraciones; **B:** Impregnación de papeles con ayuda de una pipeta; **C:** Dispositivo para secado de papeles

-Procedimiento para la realización del ensayo: a partir de los papeles impregnados se formaron paquetes, los cuales fueron posteriormente llenados con aproximadamente 100 a 150 larvas cada uno, de 14 a 21 días de edad. Para facilitar este proceso, el tubo conteniendo las mismas se colocó en forma vertical, sobre una base con algodón y agua jabonosa para evitar su fuga, bajo una fuente calórica (lámpara de luz halógena) y se esperó a que las larvas

asciendan. Luego, fueron capturadas del borde superior por medio de un pincel e introducidas en los paquetes con la ayuda de un estilete metálico. La secuencia de llenado fue la misma que la utilizada para la impregnación de los papeles y cada paquete se cerró herméticamente con clips tipo bulldog. Una vez finalizada esta etapa, los sobres se colgaron en un dispositivo, de tal manera que no se toquen entre sí y fueron mantenidos en un cuarto estufa a 27°C y 80% de humedad relativa (HR) durante 24 horas. Transcurrido el tiempo indicado, los sobres se abrieron individualmente, siguiendo el mismo orden en el que fueron preparados, y se contaron las larvas vivas (aquella larva que tiene la capacidad de caminar y trasladarse), luego las muertas (aquella que no presenta movimiento o si lo hace no se puede desplazar). Los valores obtenidos se registraron en planillas ad hoc.

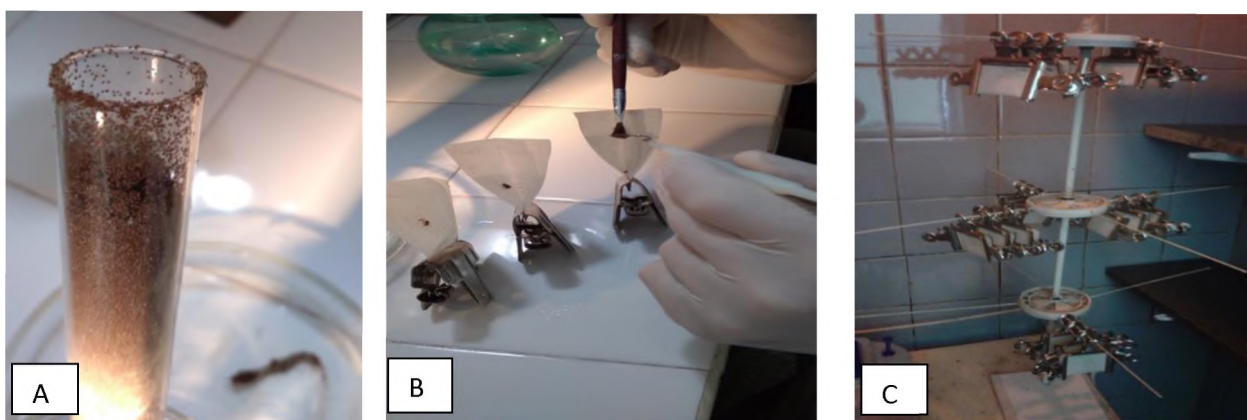


Figura 4: A: Tubo contenedor de larvas de garrapata; B: Procedimiento para el llenado de papeles; C: Dispositivo para incubación de papeles.

Susceptibilidad de poblaciones de campo: garrapatas ingurgitadas fueron recolectadas a partir de bovinos provenientes de treinta y un establecimientos de la provincia de Corrientes. Una vez recibidas las garrapatas, se lavaron con agua con la finalidad de eliminar restos de materia orgánica y se secaron con papel absorbente. Las garrapatas se colocaron bajo una fuente calórica para evaluar su viabilidad y se seleccionaron las más adecuadas para el ensayo, escogiendo las teleoginas y descartando las que se encontraban lesionadas, las que no estuvieron debidamente ingurgitadas, o las que presentaron alteración de color y consistencia. Estas garrapatas fueron sometidas a los bioensayos garrapaticidas por las técnicas de inmersión de adultos y test de paquete larvario, usando las DD.

Determinación de las variables y análisis estadístico: los valores obtenidos a partir del test de paquete larvario fueron utilizados para determinar el porcentaje (%) de mortalidad para cada concentración, el mismo se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Mortalidad: } \frac{\text{N}^\circ \text{de larvas muertas}}{\text{N}^\circ \text{de larvas totales}} \times 100 =$$

Si la mortalidad de los controles resultaba entre 5 a 10% era corregida con la fórmula de Abbot:

$$\text{Mortalidad Corregida: } \frac{(\text{mortalidad grupo tratado} - \text{mortalidad control}) \times 100}{(100 - \text{mortalidad control})} =$$

Los valores de mortalidad fueron representados en el eje de las ordenadas (eje Y) con el título porcentaje de respuesta, y las distintas concentraciones ensayadas en el eje de las abscisas (eje X) con el título dosis. Para la representación gráfica, se utilizó una escala logarítmica para obtener un mejor ajuste. Una vez obtenido los porcentajes de mortalidad correspondientes a la cepa SENASA de referencia sensible, para cada una de las concentraciones ensayadas y con la ayuda del programa estadístico Polo Plus, se determinó la dosis letal 50 (DL₅₀) y dosis letal 99 (DL_{99,9}), a partir de la cual se pudo calcular la dosis discriminatoria (DD) definida como el doble de la concentración de la D L_{99,9}.

Las poblaciones de campo, previamente recolectadas, fueron expuestas a la DD antes mencionada a fin de determinar si las mismas presentaban resistencia al principio activo en estudio. Se consideró dosis letal 50 (DL₅₀) a la concentración de principio activo que provoca la muerte del 50% del total de la población de larvas expuestas al mismo, mientras que dosis letal 99,9 (DL_{99,9}) a la concentración que provoca la muerte del 99,9% del total de la población de larvas expuestas. Finalmente, la dosis discriminatoria (DD) es el doble de la concentración de la dosis que provoca la muerte del 99,9% de las larvas expuestas a la droga.

Finalmente, se analizaron los resultados obtenidos en el test de inmersión de adultos frente al test de paquete larvario sobre poblaciones de *R. microplus* de los diferentes establecimientos ensayados.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

-Caracterización de la Cepa Sensible

La cepa sensible, obtenida del bovino donante, donde se cumple el ciclo parasitario de las mismas, y el extraparasitario logrado en estufas de cultivo, proporcionaron las larvas utilizadas en el presente trabajo. El trabajo de recolección de garrapatas se llevó a cabo durante 24 días a fin de obtener una cantidad adecuada de larvas para la realización del bioensayo. Los resultados obtenidos del test de paquete larvario para los 6 eventos (FIP1, FIP2, FIP3, FIP4, FIP5, FIP6) a las distintas concentraciones de FIP (%), se muestran en la **Tabla 1 y 2.**

Tabla 1: Resultados del test de paquete larvario para los eventos FIP1, FIP2, FIP3.

FIP1	FIP2			FIP3				
Dosis	Vivas	Muertas	Dosis	Vivas	Muertas	Dosis	vivas	Muertas
0	149	11	0	111	1	0	104	6
0	133	6	0	165	12	0	180	22
0	113	10	0	153	14	0	157	11
0.006	17	176	0.006	22	118	0.006	19	136
0.006	13	159	0.006	26	165	0.006	12	130
0.006	28	136	0.006	17	111	0.006	8	142
0.0125	7	123	0.0125	7	168	0.0125	3	148
0.0125	1	193	0.0125	9	157	0.0125	5	145
0.0125	0	161	0.0125	3	193	0.0125	1	120
0.025	1	151	0.025	0	154	0.025	2	145
0.025	1	208	0.025	1	188	0.025	1	187
0.025	1	140	0.025	1	166	0.025	0	121
0.05	1	191	0.05	1	194	0.05	1	164
0.05	0	153	0.05	1	188	0.05	0	207
0.05	1	162	0.05	0	131	0.05	0	224
0.1	0	214	0.1	1	124	0.1	1	186
0.1	1	274	0.1	0	190	0.1	0	190
0.1	1	133	0.1	1	149	0.1	0	160
0.2	0	175	0.2	0	177	0.2	0	173
0.2	0	188	0.2	0	172	0.2	0	155
0.2	0	180	0.2	0	148	0.2	0	166

Tabla 2: Resultados del test de paquete larvario para los eventos FIP4, FIP5, FIP6.

FIP 4	FIP 5			FIP 6				
Dosis	Vivas	Muertas	Dosis	Vivas	muertas	Dosis	vivas	Muertas
0	186	3	0	116	3	0	188	0
0	120	6	0	158	15	0	149	1
0	196	1	0	167	10	0	220	4
0.006	18	176	0.006	14	190	0.006	17	100
0.006	15	188	0.006	53	190	0.006	32	237
0.006	17	181	0.006	18	215	0.006	31	196
0.0125	14	170	0.0125	6	195	0.0125	11	147
0.0125	9	110	0.0125	12	226	0.0125	13	128
0.0125	10	127	0.0125	22	235	0.0125	6	252

0.025	5	153	0.025	4	211	0.025	13	233
0.025	4	217	0.025	8	188	0.025	2	163
0.025	2	128	0.025	7	145	0.025	2	169
0.05	0	113	0.05	0	185	0.05	1	161
0.05	1	170	0.05	0	221	0.05	0	163
0.05	0	178	0.05	0	218	0.05	0	100
0.1	0	130	0.1	0	151	0.1	0	162
0.1	0	115	0.1	0	127	0.1	0	219
0.1	0	166	0.1	0	211	0.1	0	100
0.2	0	127	0.2	0	197	0.2	0	226
0.2	0	155	0.2	0	207	0.2	0	175
0.2	0	136	0.2	0	221	0.2	0	155

Del análisis de los resultados obtenidos en los eventos realizados a fin de obtener la DD, surgen los datos mostrados en la **Tabla 3**, en esta se presentan los valores de la DL_{50} y $DL_{99.9}$ de cada evento, con sus respectivos límites de confianza de 95%, los que se lograron mediante el programa estadístico Polo Plus.

Tabla 3: Resultados de la caracterización de larvas de Cepa Sensible frente a Fipronil

Eventos	DL_{50}	Límite de confianza 95%	$DL_{99.9}$	Límite de confianza 95%
FIP 1	0.002	0.000 – 0.004	0.2	0.07 – 15.6
FIP 2	0.003	0.000 – 0.005	0.17	0.06 – 24.0
FIP 3	0.002	0.000 – 0.004	0.18	0.07 – 4.4
FIP 4	0.002	0.001 – 0.003	0.2	0.1 – 0.6
FIP 5	0.003	0.001 – 0.005	0.2	0.08 – 2.09
FIP 6	0.003	0.001 – 0.004	0.2	0.1 – 0.9

Para favorecer la homogeneidad en los bioensayos, se utilizaron larvas de la cepa sensible de aproximadamente la misma edad, además se minimizaron las posibles causas de error, como variación en la humedad y/o temperatura, la manipulación de distintos operarios y las horas de incubación en estufa, obteniendo finalmente, valores muy próximos entre sí, lo que permite inferir sobre la estandarización de la técnica para la molécula Fipronil, estas consideraciones están reportadas en el capítulo 1 de la FAO. (FAO, 2004).

En la **Fig. 5**, se encuentran representados los porcentajes de mortalidad de las larvas frente a las dosis de FIP (%). Los puntos, en las mismas, representan los datos de mortalidad observados y la línea sólida la regresión “Probit”. A partir de los gráficos, también se puede evidenciar la similitud en los resultados obtenidos experimentalmente en los seis eventos.

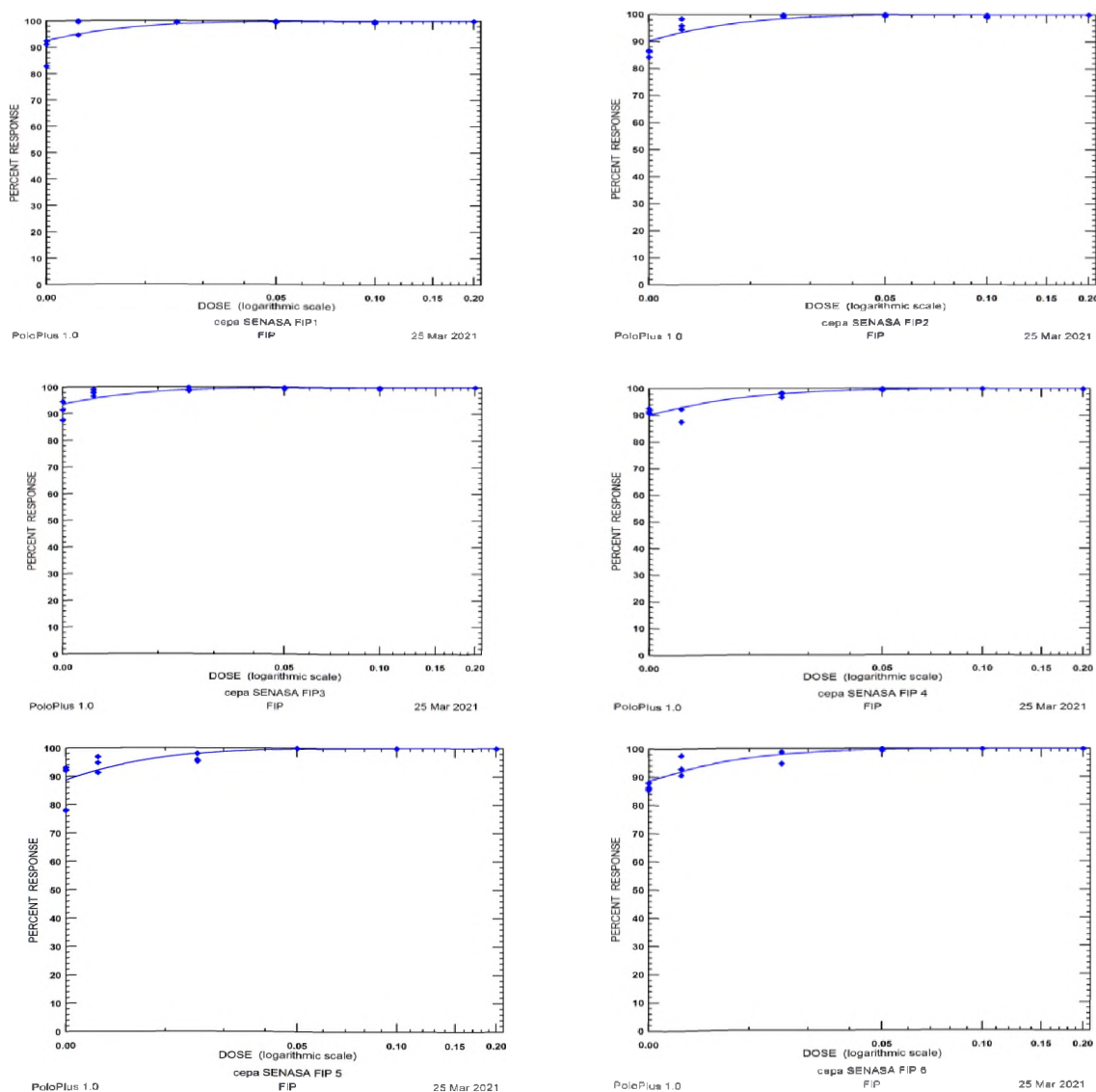


Figura 5: Representación gráfica del porcentaje de respuesta (mortalidad) a diferentes concentraciones (0,006- 0,0125- 0,025- 0,05- 0,1- 0,2 P/V), correspondiente a los bioensayos realizados en larvas de la cepa sensible frente a Fipronil.

Determinación de la Dosis Discriminatoria

A partir de la caracterización de la cepa sensible, se obtuvo la Dosis Discriminatoria (DD), definida como el doble de la concentración de la DL_{99,9}. El resultado de DD obtenida para la cepa de referencia caracterizada en el presente trabajo fue de 0.4%, resultando semejante a la DD de la cepa Mozo, cepa de referencia utilizada en Uruguay, cuyo valor es de 0.3% (*Cuore et al.*, 2014).

La utilización de papeles impregnados a esta concentración permite el diagnóstico de la resistencia adquirida a campo, es así que, si las cepas presentan menos del 100% de mortalidad, a esa concentración, se puede inferir que las mismas han generado una resistencia al principio activo ensayado; por el contrario, si el porcentaje de mortalidad es del 100% las larvas expuestas son sensibles a la droga evaluada. Este sistema intenta agilizar los tiempos de prueba a través de un mayor número de análisis en simultáneo, menor cantidad de muestra e insumos utilizados, permitiendo abaratar el costo de la técnica sin afectar la veracidad de los resultados.

Análisis de las poblaciones de campo: Test de inmersión de adultos y Test de paquete larvario:

De las 127 muestras ingresadas al laboratorio de fármacos garrapaticidas, se tomaron n= 31 muestras para efectuar el ensayo de Inmersión de Adultas, de ellas 17 fueron sensibles al Fipronil en un 100 %, mientras que 7 tuvieron un % de control mayor o igual al 80% y por último 4 de ellas tuvieron un porcentaje de control menor al 80%. Para el caso de la técnica de LPT, utilizando la dosis discriminatoria se observó la muerte de todas las larvas en las muestras que se mostraron sensibles para la técnica de inmersión de adultas al igual que las de mayor o igual a 80%. Coincidentemente, en las 4 muestras, cuyo porcentaje de eficacia fue menor al 80%, se observó un grado de resistencia en el test de paquete larvario.

El grado de resistencia para el test de paquete larvario utilizando las dosis discriminatorias obtenidas para la cepa sensible y utilizando esa concentración, se definió según los estándares de la FAO (2004), donde el grado de resistencia expresa el porcentaje de garrapatas (larvas) que sobreviven al tratamiento, siendo: Bajo: cuando es $\leq$ a 20%; Medio: entre 20% a 50%. Alto: > de 50%.

En la tabla 4, se detalla el número de ingreso, el nombre del establecimiento, el lugar de procedencia, la relación vivas y totales del grupo de teleoginas expuestas (V/T), porcentaje de sensibilidad o control de la molécula y porcentaje de inhibición de la ovipostura (IO). En las garrapatas que mostraron ser sensibles por la Técnica de inmersión de adultos al Fipronil, se observó un porcentaje de inhibición de ovipostura del 100%. Entre los campos problemas se observó en **Dos hermanas**, que el porcentaje de control obtenido para Fipronil fue del 57%, donde un 50% de las teleoginas que fueron expuestas pusieron huevos los cuales eclosionaron en un 100% dando origen a larvas viables capaces de continuar con el ciclo parasitario. En el caso de **La Taperitas**, hubo un 60% de Control, donde se observaron 5 teleoginas vivas y 5 muertas, por su parte en **San José**, se obtuvo un 72% de control, con 6 teleoginas vivas y 4

mueratas, y en el caso de **Santa Teresa**, que si bien presento luego de la inmersión 9 vivas y 1 muerta, analizando todos los parámetros reproductivos se obtuvo similar porcentaje de control de 72%.

Teniendo en cuenta lo antes dicho, se puede inferir sobre una presión de selección sobre cuatro de las poblaciones de garrapatas estudiadas confirmado por ambas técnicas, por lo que se debería restringir el uso de esta droga, sola o combinada, a una única generación de garrapatas al año y de este modo prevenir el desarrollo de resistencia. Asimismo, los siete establecimientos restantes presentaron una presión de selección de garrapatas resistentes a la molécula, que fue identificado sobre el estadio adulto, el cual no inhibió en un 100% la ovipostura y eclosión, por lo que se tiene que alertar de la misma manera respecto al uso racional de productos que contengan Fipronil.

La evolución de la resistencia parasitaria es consecuencia de dos factores, uno inherente al parásito (genética) el cual es difícil incidir y el segundo relacionado a las prácticas de manejo (tratamientos inadecuados, sin una estrategia racional) donde sí es factible intervenir. Por estos motivos es fundamental encarar el problema de las parasitosis a través de un control integrado (Cuore et al, 2007). En este contexto, Cuore et al, 2012, reporto sobre la aplicación exitosa de alternativas de control sustentable desarrollado en Uruguay para las garrapatas multiresistentes, demostrando ser una herramienta válida a considerar.

Es importante analizar el origen de la resistencia y el seguimiento de estos establecimientos para vislumbrar a partir de estos hallazgos otros establecimientos con el mismo problema y para evitar la dispersión de la resistencia y no seguir presionando a la droga. Se ha descripto, que cuando ciertos parásitos son resistentes a un compuesto, la aparición de resistencia a nuevos grupos químicos con modo de acción similar es muy probable que se desarrollen más rápidamente. En esta situación es posible plantear la hipótesis de que la resistencia al Fipronil, haya sido generada previamente por las lactonas macrocíclicas que tienen un similar sitio de acción (Kunz & Kemp, 1994).

N° ingreso	N° establecimiento	Localidad/ Provincia	V/T	%I0	% sensib ilidad	LPT Grado de resistencia
80	1- Dos hermanas	Lavalle- Ctes	5/10	57	57	Bajo
92	2-Las taperitas	Lavalle- Ctes	5/10	60	60	Bajo
81	3-San José	Saladas- Ctes	6/10	64	72	Bajo
95	4-Santa Teresa	San Roque- Ctes	9/10	54	72	Bajo
63	5-Guayra	Goya- Ctes	5/10	55	80	-

85	6-Almaco	Bella Vista-Ctes	1/10	88	88	-
99	7-El Recuerdo	Goya-Ctes	7/10	62	89	-
98	8-San Fernando	Bella Vista-Ctes	3/10	81	96	-
71	9-Manuel Villas	Goya-Ctes	4/10	82	95	-
69	10-EEA- Eragia	Corrientes-Ctes	2/10	80	90	-
76	11-María Isabel	San Roque-Ctes	3/10	67	96	-

Tabla 4: Resultados de bioensayos sobre poblaciones de campo.

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos, se presentan aquí la ubicación de los establecimientos y los antecedentes de uso de productos los mismos.

Dos hermanas: Ubicación Lavallo- Ctes, cuenta con baño de inmersión el cual no se lo utiliza desde hace más de 2 años. Antiguamente estaba cargado con Derribante® (Amitraz 12,5%). Dentro de los principios activos utilizados en el establecimiento son: Ivervet AD®(Ivermectina 3,15%), Vaquero®(Fipronil 2% e Ivermectina 1%), Acatak® (Fluazuron 2,5%), Vermectin Premium ®(Ivermectin 3,15%), , Ivomec Gold®(ivermectin 3,15%), Ectoline®(Fipronil 1%), Overline ® (Fipronil 1% e Ivermectina 0,5%), Atratrix FC®(Fluazuron 2,5% - Cipermetrina 5%), este último acaricida se administró el 19/03/20.

Las taperitas: Ubicación Lavallo- Ctes, cuenta con baño de inmersión, el ultimo principio utilizado fue Garrathion Max® (Cipermetrina- Ethion), Aspersin® (Cipermetrina2%- Clorpirifos 5%), otros garrapaticidas utilizados son: Overline ® (Fipronil 1% e Ivermectina 0,5%), Acatak® (Fluazuron 2,5%), estos son usados hace 6 años con una frecuencia de administración de 3 veces al año.

San Jose: Ubicación Saladas-Ctes, cuenta con baño de inmersión, el ultimo principio activo utilizado fue Amitraz 12,5%, previamente se utilizaba Aspersin ® (Cipermetrina2%- Clorpirifos 5%), otros utilizados son Fluazuron, Ivermectina 3,15%. En este establecimiento por los antecedentes vistos nunca se utilizó el principio activo Fipronil el cual se muestra presión de selección.

Santa teresa: Ubicación San Roque-Ctes, cuenta con baño de inmersión no se utiliza hace 6 años, antiguamente estaba cargado con Derribante® (Amitraz 12,5%), otros productos utilizados en el establecimientos: Ivervet AD® (Ivermectina 3,15%), Acatak® (Fluazuron 2,5%), Ectoline® (Fipronil 1%), este último utilizado ocasionalmente para limpieza de tropa.



CONCLUSIONES

El mantenimiento y caracterización de una cepa de referencia susceptible de la garrapata común del bovino, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, representa una ventaja para el diagnóstico de resistencia adquirida a campo de diferentes poblaciones de este ectoparásito.

En el presente trabajo se logró conocer el perfil de susceptibilidad de la cepa de *R. microplus* de referencia sensible y hallar la dosis discriminatoria que permitió evaluar la resistencia adquirida a campo de muestras de garrapatas obtenidas de distintos establecimientos de la provincia de Corrientes. Esto se efectuó, mediante el Test de Paquete larvario (LPT), alcanzando resultados reproducibles y extrapolables a las poblaciones en estudio.

El hallazgo de la Dosis Discriminatoria (DD), así como la estandarización de la técnica, permitió evaluar varias muestras de poblaciones de campo en simultáneo, lo que significó menor tiempo empleado para un mismo operador y un menor costo final en la técnica.

El bioensayo con larvas es una efectiva herramienta para monitorear “*in vitro*” las variaciones de susceptibilidad o resistencia de diferentes poblaciones de *R. microplus*, teniendo un valor orientativo y permitiendo un diagnóstico de los casos de resistencia obtenidos a campo en las distintas poblaciones de garrapatas, permitiendo un control más adecuado de las mismas.

Asimismo, la técnica de inmersión de adultos representa un ensayo versátil, rápido de realizar reproducible y extrapolable a las poblaciones de garrapatas de campo. Se estableció un punto de cohorte para la inmersión de adultos y el ensayo en larvas para poder brindar una adecuada interpretación de los resultados.

BIBLIOGRAFIA

- 1- Castelli, M. E., Mangold, A. J., Guglielmone, A.A. (2008) Estudio de la susceptibilidad –resistencia a la Cipermetrina de poblaciones de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *INTA EEA Rafaela CC 22 -2300*, 15.
- 2- Castelli, M.E. Mangold, A.J. Nava, S. Guglielmone, A.A. (2013) Determinación de la concentración letal 50 para *Rhipicephalus (boophilus) microplus* de la formamidina (amitraz) en diferentes poblaciones de la argentina. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias 12 (1 - 2,8-14*.
- 3- Cuore, U ; Trelles, A. ; Sanchis, J. ; Gayo, V. ; Solari, M.A. (2007) Primer diagnóstico de resistencia al fipronil en la garrapata común del ganado Boophilus microplus Veterinaria, (Montevideo) 42 (165-166) 35 - 41
- 4- Cuore U, Altuna M, Cicero L, Fernández F, Luengo L, Mendoza R, Nari A, Pérez Rama R, Solari MA, Trelles A. (2012). Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de Rhipicephalus (Boophilus) microplus en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)* 48:5-13.
- 5- Cuore, U., & Solar, M.A. (2014) Poblaciones multirresistentes de garrapatas rhipicephalus (boophilus) microplus en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 51(193), 4-13.
- 6- FAO (2003). Resistencia a los Antiparasitarios: Estado actual con énfasis en América Latina. *Estudio FAO producción y sanidad animal*. 157 (1), 1-59.
- 7- FAO (2004) Module 1. Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management And Prevention pp53.
- 8- Guglielmone, A.A., Castelli, M.E., Mangold, J.A., Aguirre, D.H., Alcaraz, E., Cafrune, M.M., Cetrá, B., Luciani, C.A., Suárez, H.V. (2017) El uso de acaricidas para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (canestrini) (acari: ixodidae) en la Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 36 (1), 155-167.
- 9- Guglielmone, A.A, Giorgi, R, Sodiro, A, Gay, R, Canal, A, Mangold, A. J. (2003). Aptitud ecológica de los departamentos de Castellanos y Las Colonias, Santa Fe, para sustentar hipotéticas poblaciones de la garrapata común del vacuno, Boophilus microplus (Acari: Ixodidae). *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 32 (3), 75-92.
- 10- Kunz, S.E., Kemp, D.H. (1994) Insecticide and acaricides: resistance and environmental impact. *Review Scientific Technology*. OIE 13,1249-1286.
- 11- Mangold, A.J., Castelli, M.E., Nava, S., Aguirre, D.H., Guglielmonechi, A.A. (2004) poblaciones de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistentes a los piretroides en Córdoba y Salta, Argentina. *Revista FAVE - Ciencias Veterinarias 3 (1-2)*, 56-59.
- 12- Nava, S., Morel, N., Mangold, A.J., Guglielmone, A.A. (2018) Un caso de resistencia de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) al fipronil detectado en pruebas de campo en el este de Santiago del Estero, Argentina. *Revista FAVE – Sección Ciencias*

<https://doi.org/10.14409/favecv.v17i1.7158>.

- 13- Spath, E.J. Guglielmone, A.A., Signorini, A.R., Mangold, A.J. (1994) Estimación de las pérdidas económicas directas producida por la garrapata *Boophilus microplus* y las enfermedades asociadas en la Argentina. *Therios*. 23, 454-468.
- 14- Stone, B.F. (1972) The genetics of resistance by ticks to acaricide. *Aust. Vet. J.* 48, 345-350.
- 15- Stone, B.F. & Haydock, K.P. (1962). A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *boophilus microplus* (can.). Queensland, Australia. *Commonwealth Agricultural Bureaux*. 53 (3), 563-577.
- 16- Apellidos. (fecha de consulta). Título de la pagina web. Nombre de la pagina. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-11242012000500004