

## ESTUDIOS DE LA RESISTENCIA A ACARICIDAS ORGANOFOSFORADOS DEL BOOPHILUS MICROPLUS EN EL URUGUAY

### II ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE UNA CEPA DE CAMPO A LOS ACARICIDAS ORGANOFOSFORADOS.

CARDOZO, H.; PETRACCIA, C.; NARI, A. y SOLARI, M.A. \*

#### RESUMEN

La sospecha de resistencia a acaricidas organofosforados originada por fallar en el campo, se confirmó en primera instancia mediante el uso de dosis discriminatorias.

En este trabajo se ratifica el diagnóstico presuntivo aplicando técnicas *IN VITRO* (Stone y Haydock) y técnicas *IN VIVO* (prueba de establo).

Se discuten los resultados de ambas pruebas determinando su coincidencia.

Se muestra el comportamiento de la cepa R4 ante los distintos acaricidas organofosforados en uso en Uruguay y su posibilidad de control a campo.

Palabras Claves: GARRAPATA, BOOPHILUS, ACARICIDA, ANTIPARASITARIO, COMPUESTO ORGANICO DEL FOSFORO.

VETERINARIA 20 (86/87) ene.-jun. 1984

#### SUMMARY

Suspicion of tick resistance to acaricides OP due to failures in the field was confirmed with the use of discriminatory doses.

This study confirms presumptive diagnosis by means of *in vitro* techniques (Stone and Haydock) and *in vivo* ones (stall test).

Both results are discussed and their coincidence is determined.

The behaviour of strain R4 with different OP acaricides used in Uruguay is shown, as well as the possibility of its control under field conditions.

Key Words: IXODIDAE, BOOPHILUS, ACARICIDES, ANTIPARASITIC AGENTS, ORGANICS PHOSPHORUS COMPOUNDS.

VETERINARIA 20 (86/87) 16-22 jan.-jun. 1984

#### INTRODUCCION:

El uso sistemático de acaricidas para combatir la garrapata, ha provocado la aparición de resistencia (6) (8).

Esto se constituye en un grave problema en los países que, como el Uruguay, encaran campañas sanitarias nacionales basadas exclusivamente en el uso de acaricidas (3).

La planificación de estas campañas, tiene que incluir un sistema de vigilancia para poder detectar la resistencia y estudiar hasta qué grado estas cepas se pueden constituir en un problema para la lucha.

El CIVET "Miguel C. Rubino" ha puesto a punto pruebas "*in vitro*" para detectar los problemas en cepas que provienen del campo con sospecha de resistencia.

#### Pruebas *in vitro*:

A los efectos de establecer un diagnóstico primario de resistencia, este Laboratorio ha adoptado la técnica de dosis discriminatorias.

Sin embargo esto no alcanza a los efectos de profundizar en el estudio de casos de resistencia y tratar de caracterizar niveles comparables entre sí. Este conocimiento podría utilizarse en el futuro para establecer posibilidades de control.

Pero, si bien los tests *in vitro* utilizados son satisfactorios para comparar la respuesta de diferentes cepas a los acaricidas, es dificultoso trasladarlos en términos de control a campo (4).

Los objetivos de este trabajo, son:

—Describir la cepa de *Boophilus microplus* denominada R4 en cuanto al estado de resistencia a los organofosforados utilizando métodos *in vitro*.

--Comparar los resultados obtenidos en las pruebas de laboratorio (*in vivo*) con la misma cepa.

#### MATERIAL Y METODOS:

##### 1. Población de interés:

Se trabajó con una cepa llegada al Laboratorio desde el Departamento de Artigas.

Fue extraída de un baño oficial próximo a la capital, por los Servicios Veterinarios de la zona. Esta cepa fue identificada como R4.

Una vez detectada la resistencia por las pruebas *in vitro*, se repicó la cepa sobre bovinos a los efectos de obtener una gran población de larvas que se utilizaron para las pruebas *in vitro* e *in vivo* (11).

##### 2. Técnicas:

*In vitro*: Se aplicó la técnica de Stone y Haydock sobre larvas de 10 a 14 días de nacidas (7).

Se preparó una solución madre con una concentración que matara el 100 % de las larvas. Luego, mediante diluciones a la mitad, se fue reduciendo la concentración de cada producto hasta un nivel que provocara una mortalidad nula.

Con cada dilución de cada producto, se impregnaron dos papeles con las características descriptas en la técnica.

El procedimiento se repitió tres veces obteniéndose así seis réplicas en cada caso, con aproximadamente cien larvas en cada una.

*In vivo*: Prueba de establo. (5)

Se realizó en dos etapas. En la primera se trabajó con Asuntol polvo, Supona 40 y Neocidol 60 y, en la segunda, con Elimix II, Dursban 24 E y Fosfotox 1000.

En la primera etapa se infectaron dos vacunos por cada acaricida y dos como testigos con una frecuencia de dos veces por semana y aproximadamente 2500 larvas cada vez.

En la segunda el procedimiento fue similar salvo

\* Médicos Veterinarios, Técnicos del C.I.VET. "Miguel C. Rubino", Ruta 8 Brigadier Gral. Juan A. Lavalleja, Km. 29, Pando, Canelones. Casilla de Correo 6577, Montevideo - Uruguay.

CUADRO 1. GRUPOS DE TRATAMIENTO CON ACARICIDAS ORGANOFOSFORADOS USADOS

	Nº de Terneros de 18 meses	Acaricidas	Principio Activo	Concentración en p.p.m.
PRUEBA I	2	Asuntol polvo	Coumaphos	450
	2	Supona 40	Chlorfenvinphos	600
	2	Neocidol 60	Diazinon	450
	2	Testigos		
PRUEBA II	2	Elimix II	Ethil - Pirimiphos	500
	2	Dursban 24 F	Chlorpyrimiphos	240
	2	Fosfotox 1000	Ethion	1000
	2	Testigos		

que, por permitirlo la disponibilidad de larvas, se infectó con aproximadamente 5000 larvas cada vez.

A los 25 días de la primera infección se bañaron con los acaricidas fosforados a la concentración recomendada para su uso en el campo.

En la prueba 1 se controló por 20 días por tratamiento y en la 2 por 22 días.

3. *Productos químicos:*

Para la prueba *in vitro*, se utilizaron 7 acaricidas organofosforados en uso en Uruguay. Los productos de grado técnico, proporcionados por las empresas que los comercializan, fueron: Coumaphos 100 %, Chlorfenvinphos 97 %, Diazinón 100 %, Ethilpirimiphos 95 %, Chlorpirimiphos 99,7 %, Ethion 100 %, Propentanphos 92 %.

En los baños se usó el garrapaticida formulado para la venta. Se utilizaron todos menos el Propentanphos.

4. *Expresión de resultados:*

4.1. La prueba *in vitro* se representó en papel doble logarítmico colocando en las abscisas las concentraciones crecientes y en las ordenadas los porcentajes de mortalidad.

En la gráfica se estimaron las DL 50 de la cepa R4 para los distintos acaricidas fosforados y, a los efectos de medir el factor de resistencia, en cada caso se las comparó con las correspondientes de la cepa Mozo utilizada como patrón. (1).

$$FR = \frac{DL\ 50\ de\ cepa\ R4\ (problema)}{DL\ 50\ de\ cepa\ Mozo\ (patrón)} \quad (10)$$

4.2. *En la prueba in vitro se calcularon:*

Porcentajes de sobrevivencia de hembras ingurgitadas (P.S.) por día y en los días post-tratamiento controlados, utilizando la fórmula (5):

$$P.S = \frac{A \times D}{B \times C} \times 100$$

Indice de reproducción por día de la teleóginas bañadas (2).

$$I.R. = \frac{Nº\ de\ teleóginas}{Nº\ de\ bovinos} \times \frac{Nº\ de\ teleóginas\ incubadas}{Gr.\ de\ huevos} \times 20.000 \times \% \ de\ eclosión$$

Porcentaje de control sobre larvas, ninfas, adultas y total (12).

$$\% C = \frac{s^* I.R. \ de\ testigos - s^* I.R. \ de\ tratados}{s^* I.R. \ de\ testigos} \times 100$$

s<sup>\*</sup>: Lease sigma.

RESULTADOS:

En los sobres con las soluciones impregnadas, se colocaron un promedio de 96 larvas en cada uno con un rango de 448 a 791 para cada dilución.

En el Coumaphos, Ethion y Propentanphos, se utilizaron siete diluciones; con Diazinón, Pirimiphos y Chlorpyriphos, seis; y con Chlorfenvinphos, cuatro.

Las sumatorias de los resultados para cada dilución así como los porcentajes de mortalidad obtenidos con todos los acaricidas se muestran en el Cuadro Nº 2.

Llevando estos resultados a papel doble logarítmico, obtenemos las gráficas para la Cepa R4 que se muestran en la Figura Nº 1.

Los factores de resistencia calculados se representan en el Cuadro Nº 3.

CUADRO Nº 3. FACTOR DE RESISTENCIA (F.R.) DE LA CEPA R4 ANTE LOS DISTINTOS ACARICIDAS ORGANOFOSFORADOS EN USO EN URUGUAY.

Acaricida	DL 50 R4	DL 50 Mozo	F. R.
Chlorfenvinphos	0,2	0,0236	8,5
Chlorpyrimiphos	0,61	0,01526	65,5
Diazinon	0,064	0,0093	6,9
Ethion	4,1	0,19026	21,5
Ethil-pirimiphos	0,09	0,018	5,0
Propentanphos	0,115	0,0143	8,0
Coumaphos	0,48	0,02517	19,0

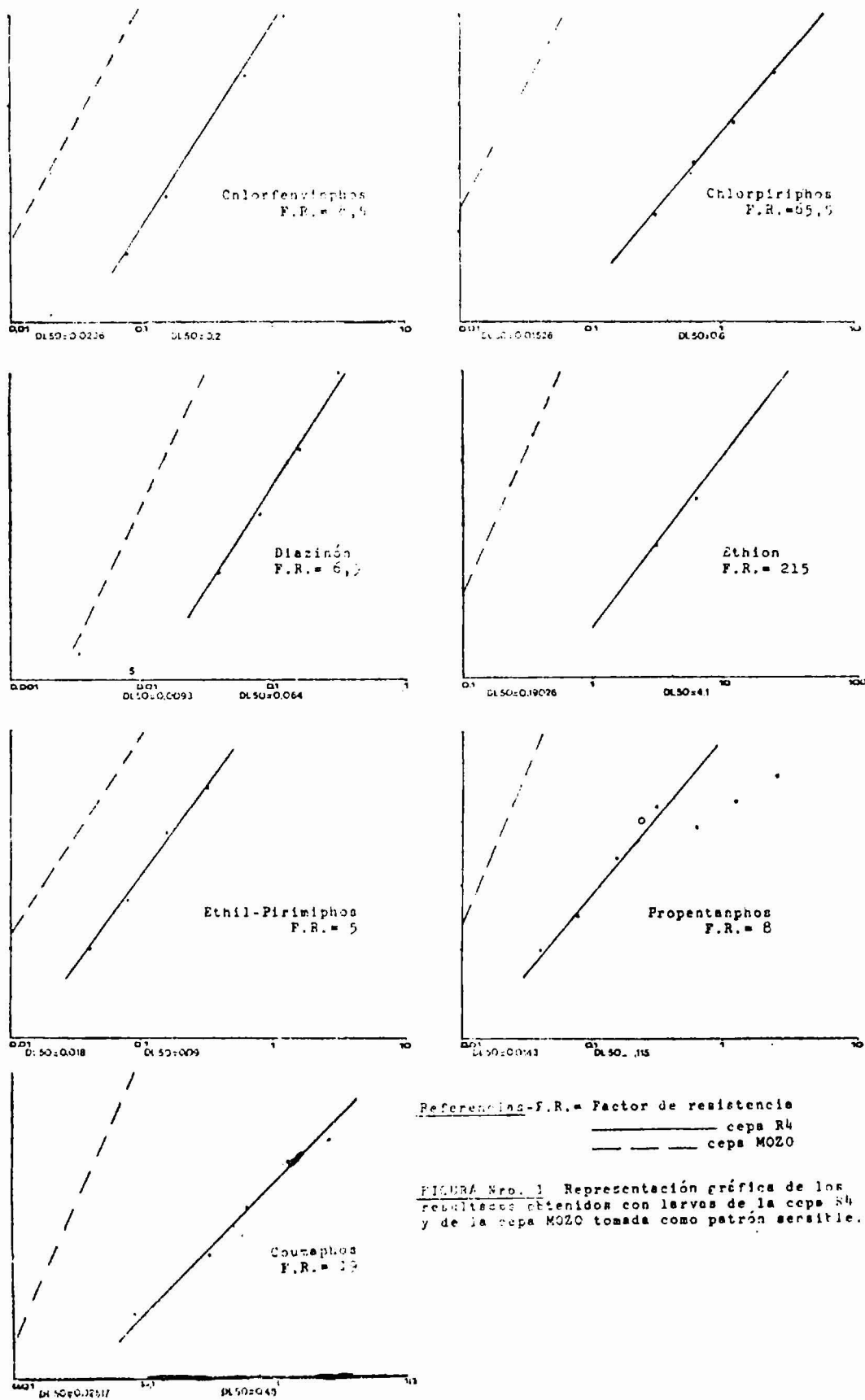
En las pruebas de establo se calculó los porcentajes de sobrevivencia de las teleóginas caídas durante los 20 días post-balneación para Asuntol polvo, Supona y Neocidol 60 y 22 días para Elimix II, Dursban 24 E, Fosfotox.

Estos resultados se representan en el cuadro Nº 4 y la figura Nº 2.

CUADRO. Nº 2. PORCENTAJES DE MORTALIDAD OBTENIDOS CON LAS DISTINTAS CONCENTRACIONES EN gr/100 ml. DE LOS ACARICIDAS UTILIZADOS EN LA CEPA R4.

COUMAPHOS:	Concentración	0.039			0.078			0.156			0.312			0.625			1.25			25.		
	de Larvas	M*	V*	T*	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T
	% de mortalidad	25	492	507	36	428	464	91	365	456	124	345	469	381	222	603	499	58	557	546	24	570
		2.95			7.75			19.95			26.43			63.18			89.58			95.78		
CHLORFENVINPHOS:	Concentración	0.078			0.156			0.312			0.625			1.25								
	de Larvas	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T
	% de mortalidad	29	627	656	224	567	791	661	68	729	616	21	637	525	0	525						
		4.42			28.32			90.67			90.70			100								
DIAZINON:	Concentración	0.009			0.019			0.039			0.078			0.156			0.312					
	de Larvas	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T
	% de mortalidad	39	566	605	55	509	564	90	438	528	334	225	559	551	36	587	521	0	521			
		6.45			9.75			17.05			59.75			93.87			100					
PIRIMIPHOS:	Concentración	0.039			0.078			0.156			0.312			0.625			1.25					
	de Larvas	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T
	% de mortalidad	61	559	620	217	372	589	528	99	627	530	14	544	509	10	519	445	3	418			
		9.84			36.84			84.21			97.43			98.07			99.33					
CHLORPYRIPHOS:	Concentración	0.156			0.212			0.625			1.25			2.5			5					
	de Larvas	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T
	% de mortalidad	33	523	556	83	414	497	320	280	600	421	100	521	531	15	546	545	0	545			
		5.94			16.70			53.33			80.81			97.25			100					
ETHION:	Concentración	0.78			1.56			3.12			6.25			12.5			25			50		
	de Larvas	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T
	% de mortalidad	28	457	485	58	458	516	176	348	522	421	181	602	517	13	530	615	7	622	533	0	533
		5.77			11.24			33.33			69.93			97.54			98.87			100		
PROPENTAUPHOS:	Concentración	0.039			0.078			0.156			0.312			0.625			1.25			2.5		
	de Larvas	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T	M	V	T
	% de mortalidad	47	453	500	146	390	536	395	161	556	538	34	578	492	70	562	547	28	575	641	9	650
		5.77			27.23			71.04			94.05			87.54			95.13			98.61		

M\*: Muertas      V\*: Vivas      T\*: Total.



CUADRO N° 4. PORCENTAJES DE SOBREVIVENCIA (P.S.) DE TELEOGINAS DE LA CEPA R4 EN LOS DIAS POST-TRATAMIENTO.

Acaricidas	Asuntol polvo	Supona 40	Neocidol 60	Elimix II	Dursban 24 E	Fosfotox 1000
Días + 1	52	100	100	74	100	100
2	63	100	40	59	50	67
3	64	100	34	57	50	41
4	36	90	8	17	53	36
5	100	100	9	1	36	16
6	26	72	13	3	57	24
7	85	100	56	2	62	25
8	90	100	17	1	17	6
9	100	100	3	1	22	9
10	100	100	39	1	34	8
11	100	100	18	2	46	9
12	100	97	13	3	40	12
13	82	100	47	9	51	24
14	54	30	26	3	45	16
15	44	25	19	4	35	18
16	19	6	9	5	28	21
17	13	0	0	4	27	23
18	6	0	0	2	16	10
19	4	0	0	1	9	4
20	0	0	0	3	17	6
21	—	—	—	3	12	11
22	—	—	—	2	14	6

El estudio del comportamiento reproductivo de las teleoginas caídas en los días postbaleación, comparándolo con los testigos, nos permite ver el porcentaje de control para adultos, larvas y ninfas así como el control total (Cuadro N° 5).

#### DISCUSION:

Los individuos resistentes de una población de *Boophilus microplus* pasan inadvertidos en el campo hasta que éstos constituyen aproximadamente un 10 % (9). Desde el punto de vista genético forman una población heterogénea. Es por esto que, uniendo los puntos de la gráfica obtenida con la prueba de larvas, se logra una curva sinusoidal y no una recta como la que se obtendría con una cepa pura (13).

Realizado el estudio de las larvas de una cepa que dé factores menores que 6, no impedirían el control a campo, mientras que, a medida que ese parámetro se aleja de 6, aumentando, el control se dificulta cada vez más.

De acuerdo a los resultados de la prueba de establo representados en el Cuadro N° 4, la cepa R4 se podría controlar a campo en forma aceptable con productos a base de Ethil-pyrimiphos y Diazinón y no sería controlada con los restantes fosforados.

Si analizamos las pruebas *in vivo* vemos que el control sobre larvas fue inferior que sobre ninfas y adultos y, considerando el % de control total vemos que confirma los datos obtenidos por la prueba de larvas *in vitro* (Cuadro N° 3).

El Neocidol 60 (% C 95) y el Elimix II (% C 94) controlaron, de una manera aceptable, a la población de parásitos presentes en el momento del

hago mientras que Supona 40 (% C 81) ya no se considera aceptable.

El Fosfotox 1000 (% C 71), Asuntol polvo (% C 59) y Dursban 24 E (% C 59) no son suficientes para controlar a campo las poblaciones de la Cepa R4.

Es sabido que los acaricidas persisten por un período mayor sobre ganado estabulado que en ganado a campo, pero ello se considera insuficiente para invalidar la comparación de efectividad de acaricidas (5).

Si se recomienda el Neocidol 60 y el Elimix II para el control de la Cepa R4 en el campo, habría que mantener una buena vigilancia pues es de esperar que la eficacia de estos acaricidas baje en corto plazo.

Sería el momento entonces de utilizar otros núcleos químicos no fosforados.

#### CONCLUSIONES:

El diagnóstico presuntivo de resistencia a los acaricidas organofosforados hecho por el uso de una dosis discriminadora, fue confirmado por el estudio de la cepa problema determinando su factor de resistencia por la prueba *in vitro* y estudiando su comportamiento ante una prueba de establo *in vivo*.

Existe coincidencia en los resultados obtenidos con ambas técnicas.

Se determinó que la Cepa R4 puede ser controlada a campo por Diazinón y Ethil-pyrimiphos.

Fallan en su control los fosforados Coumaphos, Chlorfenvinphos, Chlorpyrinphos, Ethion y Propentaphos, éste último no confirmado por prueba de establo.