GUILHERME MARCONDES KLAFKE

DIAGNÓSTICO E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A IVERMECTINA EM *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* (ACARI: IXODIDAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2011

GUILHERME MARCONDES KLAFKE

DIAGNÓSTICO E MECANISMOS DE RESISTÊNCIA A IVERMECTINA EM *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* (ACARI: IXODIDAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro.

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker

São Paulo
2011

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

© reprodução total

Klafke, Guilherme Marcondes.
Diagnóstico e mecanismos de resistência a ivermectina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) / Guilherme Marcondes Klafke. -- São Paulo, 2011.

Orientador: Teresinha Tizu Sato Schumaker.

Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Departamento de Parasitologia. Área de concentração: Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro. Linha de pesquisa: Resistência a inseticidas e acaricidas em artrópodes de interesse médico-veterinário.

Versão do título para o inglês: Diagnosis and mechanisms of ivermectin resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).

Descritores: 1. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 2. Ivermectina 3. Resistência a drogas 4. Diagnóstico 5. Mecanismos de resistência 6. Biologia molecular I. Schumaker, Teresinha Tizu Sato II. Universidade de São Paulo. Instituto de Ciências Biomédicas. Programa de Pós-Graduação em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro III. Título.

ICB/SBIB072/2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Candidato(a): Guilherme Marcondes Klafke.

Título da Tese: Diagnóstico e mecanismos de resistência a ivermectina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae).

Orientador(a): Teresinha Tizu Sato Schumaker.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a ...../...../....., considerou

( ) Aprovado(a) **( ) Reprovado(a)**

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Examinador(a): Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

Presidente: Assinatura: .....
Nome: .....
Instituição: .....

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira"
Av. Prof. Lineu Prestes, 2415 – Cep. 05508-900 São Paulo, SP - Brasil
Telefone :(55) (011) 3091.7733 – telefax : (55) (011)3091-7438
e-mail: cep@icb.usp.br

COMISSÃO DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL

Decl. CEEA.008/07

D E C L A R A Ç Ã O

Em adendo ao Certificado 44/05/CEEA, aprovo a inclusão do aluno GUILHERME MARCONDES KLAFKE ao protocolo intitulado: ***"Ectoparasitos de animais domésticos: resistência a antiparasitários e estudos genéticos",*** para uso da espécie animal utilizado e métodos semelhantes, mediante solicitação da Profa. Dra. Teresinha Tizu Sato Schumaker, responsável pela linha de Pesquisa.

São Paulo, 12 de março de 2007.

Prof. Dr. UBIRATAN FABRES MACHADO
Coordenador da CEEA- ICB/USP

Aos meus filhos queridos, Maria Isabel
e Francisco.

AGRADECIMENTOS

À Teresinha Schumaker, por me receber em seu laboratório e ter se tornado mais que uma mestra, uma amiga e confidente.

Aos amigos do Laboratório de Parasitologia Experimental e Comparada do ICB-USP, por todos os momentos de alegria compartilhada, discussões acaloradas e rodadas científicas que ajudaram na minha formação.

A Dra. Elinor Castro, pela mudança positiva que causou no decorrer e no pensar desta tese, com suas críticas, sugestões e filosofias. Muito obrigado.

Ao Departamento de Parasitologia do ICB-USP, por me abrigar durante os últimos oito anos da minha vida e ao seu corpo docente e discente, secretaria e técnicos, por terem colaborado enormemente à minha carreira científica.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade de São Paulo e meus colegas de turma pela minha formação profissional e humana.

Aos colaboradores: Dra. Thais Albuquerque (University of Kansas), Dr. Gustavo Adolfo Sabatini (NPI Pesquisas Clínicas), Dra. Márcia Cristina Mendes (Instituto Biológico de São Paulo), Dr. Robert John Miller (CFTRL-ARS-USDA, Edinburg, TX, EUA), Dr. Felix Guerrero, (ARS-USDA, Kerrville, TX, EUA), Dr. Rodrigo Rosário-Cruz (INIFAP, Morelos, Mexico), Dr. Nicholas N. Jonsson (University of Glasgow, Escócia) Dr. João Ricardo de Souza Martins (IPV-FEPAGRO, Eldorado do Sul, RS), Paula Cristina Pohl (Centro de Biotecnologia da UFRGS, Porto Alegre, RS), M.V. José Roberto Pereira (Pólo Regional do Vale do Paraíba, Pindamonhangaba, SP), M.V. José Amoroso Filho (Fazenda Barra Alegre, Piquete, SP), Profa. Dra. Ana Maria de Azeredo Espin e Dr. Renato Assis (Depto. de Genética, Unicamp).

Aos estagiários: M.V. André Namindome, Larissa M. Nossack e Laís Guimarães pela ajuda fundamental nos bioensaios e coletas de carrapatos.

Aos animais utilizados como hospedeiros durante os experimentos, todo o meu respeito.

Aos meus grandes parceiros e amigos, José Ruivo, Susana Bragatto e Youssef Younes. Obrigado por todos os tons, semitons, acordes perfeitos ou “outs”, melodias, ritmos e outros momentos musicais sublimes.

À todo o “cast” da Amber Produções e seu idealizador Rodrigo Jun Alvarenga por permitirem extravasar todo o conteúdo do meu lado esquerdo do cérebro.

Aos meus pais, irmãs e demais familiares, por tudo.

À minha esposa Mariana, pela paciência, respeito, amor e compreensão nestes cinco anos de relacionamento e pós-graduação ao mesmo tempo. Amo você.

RESUMO

KLAFKE, G. M. **Diagnóstico e mecanismos de resistência a ivermectina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)** 2011. 176 f. Tese (Doutorado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Rhipicephalus (Boophilus) microplus é um ectoparasito que acomete principalmente os bovinos e é causador de prejuízos econômicos para a pecuária nacional na ordem de dois bilhões de dólares/ ano. O uso de acaricidas químicos é o método mais utilizado para o seu controle e geralmente vem acompanhado do desenvolvimento de resistência. A ivermectina (IVM), molécula da classe das lactonas macrocíclicas (LMs), é uma droga amplamente utilizada no Brasil para o controle de *R. (B.) microplus* e na última década, suspeitas de resistência têm sido notificadas no Brasil e em outros países da América Latina. A utilização de técnicas diagnósticas precisas e confiáveis é fundamental para o monitoramento e delineamento de estratégias de manejo da resistência em um programa de controle do carrapato bovino. No presente trabalho, foram padronizados com uma cepa referência suscetível (Mozo) o teste de imersão de adultos (TIA), teste de imersão de larvas (TIL) e teste do pacote de larvas (TPL) para o diagnóstico de resistência. Os testes de larvas foram validados com uma cepa isolada resistente a IVM (ZOR) e convalidados com populações de *R. (B.) microplus* de campo dos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul com ou sem exposição prévia a LMs. Para o diagnóstico de resistência, o TIL se mostrou mais sensível que o TPL. Entre 30 populações testadas pelo TIL, 18 foram consideradas resistentes. Em uma das populações, a resistência a IVM diagnosticada por método *in vitro* foi confirmada através de um teste *in vivo* de eficácia a campo. A resistência a IVM permaneceu em uma população de carrapatos não exposta à droga pelo período de pelo menos um ano. Em laboratório foi possível isolar e manter, sob pressão de seleção, linhagens resistentes a IVM derivadas de população de campo resistente e de cepa suscetível. Os resultados obtidos através do TIL com inibidores enzimáticos permitiram concluir que citocromo P450 oxidases e glutationa-S transferases têm participação na destoxificação da IVM, mas não constituem o principal mecanismo de resistência na cepa estudada (ZOR). Pela primeira vez foi realizada em *R. (B.) microplus* a clonagem e sequenciamento parcial do gene do canal de cloro controlado pelo glutamato, sítio-alvo da IVM. Entretanto, não foram encontradas mutações neste

gene associadas à resistência. O presente trabalho possibilitou o desenvolvimento de ferramenta diagnóstica *in vitro* que vem sendo utilizada por outros centros de pesquisa no continente americano para monitorar a resistência a IVM em *R. (B.) microplus*. Informações básicas aqui obtidas sobre a evolução da resistência, em campo e em laboratório, poderão ser úteis para delinear estratégias para o seu manejo dentro de programas de controle do carrapato bovino. Finalmente, os estudos inéditos conduzidos sobre mecanismos de resistência poderão servir de base para o desenvolvimento de marcadores moleculares para o diagnóstico e monitoramento de resistência a LMs em *R. (B.) microplus*.

Palavras-chave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Ivermectina. Resistência. Diagnóstico. Mecanismos de resistência. Biologia Molecular.

ABSTRACT

KLAFKE, G. M. **Diagnosis and mechanisms of ivermectin resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae)**. 2011. 176 p. Ph. D. thesis (Biology of the Relationship Pathogen-Host) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

Rhipicephalus (Boophilus) microplus is an ectoparasite that primarily affects cattle and causes losses to the Brazilian livestock market in the order of two billion dollars per year. The use of chemical acaricides is the most widely used method for their control and often is accompanied by the development of resistance. Ivermectin (IVM), a molecule from the class of macrocyclic lactones (MLs), is a drug widely used in Brazil for the control of *R. (B.) microplus* and in the past decade, suspicion of resistance have been reported in Brazil and other Latin American countries. The use of accurate and reliable diagnostic techniques is crucial for the monitoring and the planning of strategies for resistance management in the cattle tick control. In this study, were standardized with a reference strain susceptible (Mozo) the adult immersion test (AIT), larval immersion test (LIT) and larval packet test (LPT) for the diagnosis of resistance. The larvae tests were validated against an isolated IVM-resistant strain (ZOR) and with field populations from the states of São Paulo, Rio Grande do Sul and Mato Grosso do Sul, with or without previous exposure to MIs. For the diagnosis of resistance, the LIT was more sensitive than the LPT. Among 30 populations tested by the LIT, 18 were considered resistant. In one population, resistance to IVM diagnosed *in vitro* was confirmed by an *in vivo* field trial. Resistance to IVM remained in a tick population not exposed to drugs for a period of at least one year. In the laboratory it was possible to isolate and maintain, under selection pressure, resistant strains derived from IVM-resistant field population and from a susceptible strain. The results obtained through the LIT with enzyme inhibitors demonstrated that cytochrome P450 oxidases and glutathione S-transferases play a role in the detoxification of IVM, but not consist the main mechanism of resistance in the studied strain (ZOR). For the first time, for *R. (B.) microplus,* it was performed the cloning and partial sequencing of the glutamate-gated chloride channel gene, target site of ivermectin. However, it was not possible to find mutations in this gene associated with resistance. This work enabled the development of *in vitro* diagnostic tools that have been used by other research centers in the Americas to monitor for IVM resistance in *R. (B.) microplus*. Basic information obtained in this work about the

evolution of resistance in field and laboratory, may be useful to devise strategies for its management in cattle tick control programs. Finally, the conducted studies on resistance mechanisms will provide the basis for the development of molecular markers for diagnosis and monitoring of resistance to MLs in *R. (B.) microplus*.

Key words: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Ivermectin. Resistance. Diagnosis. Resistance mechanisms. Biologia Molecular.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1. Mecanismos de resistência determinados para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* aos acaricidas..... **24**

Quadro 2. Caracterização das populações de campo quanto ao perfil de resistência acaricida e histórico de exposição a lactonas macrocíclicas..... **38**

Figura 1. Alinhamento de sequências de RNA mensageiro dos genes codificadores do Canal de Cloro Controlado por Glutamato descritas para *Ixodes scapularis, Rhipicephalus sanguineus* e trecho de sequência transcrita (EST) de *Rhipicephalus (B.) microplus*..... **45**

Figura 2. Atividade comparativa da ivermectina em adultos de *Rhipicephalus (B.) microplus* (cepa Mozo)..... **50**

Figura 3. Relação entre os pesos dos ovos mensurados no sétimo e no décimo quarto dias para a cepa Mozo de *Rhipicephalus (B.) microplus*..... **51**

Figura 4. Curvas concentração-mortalidade para ivermectina, obtidas com o teste de imersão de larvas (TIL) e o teste de pacote de larvas (TPL) com a cepa Mozo de *Rhipicephalus (B.) microplus*..... **52**

Figura 5. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partir do TIL com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* das cepas Mozo (suscetível) e ZOR (resistente a ivermectina, geração F4)..... **54**

Figura 6. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partir do TPL com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* das cepas Mozo (suscetível) e ZOR (resistente a ivermectina, geração F4)..... **54**

Figura 7. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partirde testes de imersão de larvas com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* da cepa Mozo e populações de campo sem exposição prévia a lactonas macrocíclicas..... **60**

Figura 8. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partir de testes de imersão de larvas com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* da cepa Mozo e populações de campo com exposição prévia a lactonas macrocíclicas..... **61**

Figura 9. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partir de testes do pacote de larvas com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* da cepa Mozo e populações de campo com exposição prévia a lactonas macrocíclicas..... **64**

Figura 10. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partir de testes de imersão de larvas com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* da cepa Mozo ou POA das populações de campo PIQ, ZOR e APTA, em diferentes momentos da pesquisa..... **68**

Figura 11. Curvas dose-resposta de *R. (B.) microplus* das cepas Mozo e ROZ (gerações F0 a F5) determinadas a partir do Teste de Imersão de Larvas com ivermectina..... **72**

Figura 12. Fatores de resistência (FR) e valores de slope calculados a partir do TIL com *R. (B.) microplus* de cinco gerações da cepa ZOR..... **72**

Figura 13. Curvas dose-resposta de *R. (B.) microplus* da cepa M.ivm (gerações F0 a F3) determinadas a partir do Teste de Imersão de Larvas com ivermectina..... **76**

Figura 14. Fatores de resistência (FR) e valores de slope calculados a partir do TIL com *R. (B.) microplus* de três gerações da cepa M.ivm..... **76**

Figura 15. Comparação dos fatores de sinergismo obtidos com butóxido de piperonila (PBO) 0,0025%, trifenilfosfato (TPP) 0,01% e dietilmaleato (DEM) 0,05%, no tratamento com ivermectina pelo teste de imersão de larvas com *R. (B.) microplus* das cepas Mozo e ZOR F3..... **79**

Figura 16. Comparação dos fatores de resistência a ivermectina em presença dos inibidores enzimáticos butóxido de piperonila (PBO) 0,0025%, trifenilfosfato (TPP) 0,01% e dietilmaleato (DEM) 0,05%, determinados a partir do teste de imersão de larvas com *R. (B.) microplus* da cepa ZOR F3, calculados em relação aos mesmos tratamentos com a cepa suscetível Mozo..... **79**

Figura 17. Alinhamento entre sequência *GluCl1* de *Rhipicephalus sanguineus* e da EST BEAGZ56 de *R. (B.) microplus*..... **80**

Figura 18. Fotografia sob luz UV, de gel de agarose 2% submetido à eletroforese com produtos de PCR obtidos com os pares de oligonucleotídeos [5F-5R] em DNAg de fêmeas e [Rs1F-E6R] cDNA de larvas de *R. (B.) microplus* da cepa Mozo..... **81**

Figura 19. Alinhamento de sequência predita de aminoácidos do gene *GluCl* de *R. (B.) microplus* da cepa Mozo com genes *GluCl* de *Rhipicephalus sanguineus, Ixodes scapularis* e *Drosophila melanogaster*..... **82**

Figura 20. Alinhamento de sequências de DNA de *R. (B.) microplus* das cepas Mozo e ZOR com EST de *R. (B) microplus*..... **83**

Figura 21. Alinhamento de sequências de cDNA de *R. (B.) microplus* das cepas Mozo e ZOR com EST de *R. (B)microplus*..... **84**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Comparação da toxicidade da ivermectina, determinada a partir do teste de imersão de adultos com diferentes tempos de imersão para a cepa Mozo de *Rhipicephalus (B.) microplus*..... **49**

Tabela 2 – Toxicidade da ivermectina, avaliada através do teste de imersão de larvas (TIL) com a cepa Mozo de *Rhipicephalus (B.) microplus*..... **52**

Tabela 3 – Concentrações letais e fatores de resistência a ivermectina determinados através de testes de imersão de larvas e testes de pacote de larvas para a cepa resistente ZOR (geração F4) e cepa referência suscetível Mozo de *Rhipicephalus (B.) microplus*..... **53**

Tabela 4 – Testes de imersão de larvas com ivermectina, conduzidos com *Rhipicephalus (B.) microplus* oriundos de populações de campo sem exposição prévia a lactonas macrocíclicas..... **56**

Tabela 5 – Testes de imersão de larvas com ivermectina, conduzidos com *Rhipicephalus (B.) microplus* oriundos de populações de campo com exposição prévia a lactonas macrocíclicas..... **57**

Tabela 6 – Testes do pacote de larvas com ivermectina, conduzidos com *Rhipicephalus (B.) microplus* oriundos de populações de campo com exposição prévia a lactonas macrocíclicas..... **59**

Tabela 7 – Acompanhamento da resistência a ivermectina nas populações de campo PIQ e ZOR de *Rhipicephalus (B.) microplus* pelo teste de imersão de larvas conduzido em diferentes momentos da pesquisa..... **66**

Tabela 8 – Acompanhamento da resistência a ivermectina na população APTA de *Rhipicephalus microplus* pelo teste de imersão de larvas conduzido em diferentes momentos da pesquisa..... **67**

Tabela 9 – Contagem diária média de fêmeas *Rhipicephalus (B.) microplus* da população APTA, em bovinos não tratados e tratados com ivermectina e sua eficácia diária..... **69**

Tabela 10 – Inibição de postura e eclosão de larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus* da população APTA exposta a ivermectina, coletadas de bovinos submetidos ao teste de campo..... **69**

Tabela 11 – Recuperação de fêmeas de *R.* (*B.*) *microplus* cepa ZOR (F0 a F5) em sucessivas infestações..... **70**

Tabela 12 – Testes de Imersão de Larvas (TIL) com ivermectina conduzidos com gerações de *R. (B.) microplus* cepa ZOR (F0 a F5)..... **71**

Tabela 13 – Parâmetros biológicos de fêmeas *R. (B.) microplus* da cepa resistente a ivermectina ZOR (gerações F2, F3 e F4) e cepa Mozo e mortalidade de suas respectivas progênies quando sob tratamento com ivermectina 100ppm..... **73**

Tabela 14 – Recuperação de fêmeas de *R*. (*B*.) *microplus* cepa M.ivm (F0 a F3) em sucessivas infestações..... **74**

Tabela 15 – Testes de Imersão de Larvas (TIL) com ivermectina conduzidos com gerações de *Rhipicephalus (B.) microplus* cepa M.ivm (F0 a F3)..... **75**

Tabela 16 – Parâmetros biológicos de fêmeas *R. (B.) microplus* da cepa M.ivm (gerações F0 e F2) e da cepa Mozo..... **77**

Tabela 17 – Testes de Imersão de Larvas com inibidores enzimáticos e ivermectina conduzidos com *Rhipicephalus (B.) microplus* da cepa suscetível Mozo e geração F3 da cepa ZOR..... **78**

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO **19**

1.1 Biologia e importância econômica do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: aspectos gerais **19**

1.2 Resistência a acaricidas **21**

1.2.1 Desenvolvimento de resistência **22**

1.2.2 Mecanismos de resistência a acaricidas em *R. (B.) microplus* **23**

1.3 Lactonas macrocíclicas: características e resistência **25**

1.4 Diagnóstico da resistência **27**

1.5 Caracterização da resistência **28**

1.5.1 Bioensaios com inibidores enzimáticos **29**

1.5.2 Caracterização molecular **29**

1.6 Justificativa **31**

1.7 Objetivos **31**

2 MATERIAL E MÉTODOS **32**

2.1 Carrapatos **32**

2.1.1 Procedência **32**

2.1.2 Manutenção das colônias **32**

2.1.3 Preparação dos carrapatos **33**

2.2 Bioensaios *in vitro* para diagnóstico de resistência ivermectina **33**

2.2.1 Teste de imersão de adultas **34**

2.2.2 Teste do pacote com larvas **34**

2.2.3 Teste de imersão de larvas **35**

2.2.4 Validação dos ensaios com larvas **36**

2.3 Convalidação dos bioensaios e diagnóstico de resistência a ivermectina em populações de campo **36**

2.3.1 Caracterização das propriedades **36**

2.4 Análise estatística dos bioensaios **39**

2.5 Comportamento da resistência de *Rhipicephalus (B.) microplus* a ivermectina em condições naturais **40**

2.5.1 Avaliação de resistência por bioensaios *in vitro* **40**

2.5.2 Teste de eficácia a campo **41**

2.6 Isolamento de cepas resistentes a ivermectina **42**

2.7 Bioensaios com inibidores enzimáticos **43**

2.8 Clonagem e caracterização parcial do gene codificador do canal de cloro controlado pelo glutamato (*GluCl*) **44**

2.8.1 Análise *in silico* **44**

2.8.2 Amostras **46**

2.8.3 Extração de material genômico **46**

2.8.4 Amplificação de material genômico **46**

2.8.5 Clonagem e sequenciamento **47**

2.8.6 Análise de sequências **47**

3 RESULTADOS **48**

3.1 Bioensaios *in vitro* com ivermectina **48**

3.1.1 Teste de imersão de adultos (TIA) **48**

3.1.2 Testes com larvas (TIL e TPL) **51**

3.1.3 Validação dos ensaios com larvas **53**

3.2 Diagnóstico de resistência a ivermectina no campo **55**

3.2.1 Testes de imersão de larvas **55**

3.2.3 Testes do pacote de larvas **55**

3.3 Comportamento da resistência de *Rhipicephalus (B.) microplus* a ivermectina em condições naturais..... 65

3.3.1 Avaliação de resistência por bioensaios *in vitro*..... **65**

3.3.2 Teste de eficácia..... **65**

3.4 Isolamento de cepas resistentes a ivermectina 70

3.4.1 Cepa ZOR..... **70**

3.4.2 Cepa M.ivm..... **74**

3.5 Bioensaios com inibidores enzimáticos..... 77

3.6 Caracterização parcial do gene *GluCl* de *R. (B.) microplus*..... 80

3.6.1 Amplificação..... **80**

3.6.2 Análise de sequências..... **81**

4 DISCUSSÃO..... 85

5 CONCLUSÕES..... 100

REFERÊNCIAS..... 101

ANEXO A – Alinhamento de sequências de DNA de *R. (B.) microplus* das cepas Mozo e ZOR com EST de *R. (B) microplus*..... **111**

ANEXO B – Alinhamento de sequências de cDNA de *R. (B.) microplus* das cepas Mozo e ZOR com EST de *R. (B) microplus*..... **115**

ANEXO C – Artigos de Periódicos..... **120**

1 INTRODUÇÃO

1.1 Biologia e importância econômica do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: aspectos gerais

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (CANESTRINI, 1887), comumente conhecido como carrapato bovino ou carrapato do boi, é membro da família Ixodidae, gênero *Rhipicephalus*, subgênero *Boophilus*. Os carrapatos do gênero *Boophilus* foram re-classificados recentemente, por meio de um estudo de filogenética molecular, como pertencentes ao gênero *Rhipicephalus* (MURRELL E BARKER, 2003). Neste subgênero existem outras quatro espécies de carrapatos conhecidas: *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus*, *Rhipicephalus (Boophilus) decoloratus*, *Rhipicephalus (Boophilus) kohlsi* e *Rhipicephalus (Boophilus) geigyi* (PEREIRA, 2008).

A linhagem *Rhipicephalus-Boophilus* provavelmente evoluiu na região afrotropical há cerca de quatorze milhões de anos. Após o aparecimento de uma ligação por terra entre o continente africano e a Eurásia, estes carrapatos se irradiaram para a Ásia e Europa (MURRELL; CAMPBELL; BARKER, 2001). A entrada destas espécies no continente americano se deu provavelmente no século dezenove com a chegada de animais vindos do velho mundo (MCCOSKER, 1993). *R. (B.) microplus* é uma das espécies de carrapato com maior distribuição mundial, sendo encontrado em grande parte das zonas tropicais e subtropicais da Ásia, nordeste da Austrália, Madagascar, terras baixas do sudeste da África até a linha do Equador, grande extensão das Américas Central e do Sul, México e Caribe (ESTRADA-PEÑA et al., 2006).

Este ectoparasito exige um único hospedeiro, no qual realiza todas as mudas. Os machos geralmente são encontrados fixos sob as fêmeas que, depois de fertilizadas e ingurgitadas (teleóginas) desprendem-se da pele dos hospedeiros e caem ao solo. Dois a seis dias depois, iniciam o período de postura, que pode durar até 20 dias, findo o qual a fêmea morre. No período de postura, cada fêmea pode botar cerca de 3000 ovos, que eclodem em seis a sete dias, dependendo das condições de temperatura e umidade relativa do ar. As larvas recém eclodidas não têm poder infestante, mas após quatro a seis dias sobem nas hastes dos capins e

aguardam a passagem do hospedeiro podendo parasitá-lo (PEREIRA; LABRUNA, 2008).

A infestação por parasitos, incluindo o carrapato bovino, afeta o comportamento e a saúde dos hospedeiros de forma direta ou indireta, reduzindo a produtividade dos animais. Fatores como a mortalidade, menor valor de mercado (por conta da diminuição da qualidade do couro) redução do ganho de peso e de produção de leite (cerca de 0,7 g por carrapato), força de tração e redução da eficiência na conversão alimentar. Além destes fatores, a diminuição da vida produtiva e a possibilidade de imunossupressão e consequente aumento da suscetibilidade a outras doenças são agravantes da infestação por parasitos. (FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION, 2004)

Como um bovino pode ser parasitado por milhares de carrapatos, as perdas diárias de sangue são elevadas e as substâncias tóxicas inoculadas pelo parasito também contribuem para a alteração da saúde dos animais (FORTES, 1997). Além disso, *R. (B.) microplus* é vetor de patógenos que acometem os bovinos, responsáveis por altos índices de mortalidade: *Babesia bovis*, *B. bigemina*, e *Anaplasma marginale* (SATTLER et al., 1986).

O prejuízo gerado por *R. (B.) microplus*, incluindo as doenças transmitidas pelo carrapato, foram estimados em sete bilhões de dólares (FAO, 2004). Na Austrália o montante ultrapassa cem milhões de dólares por ano (COBON; WILLADSEN, 1990). No Brasil, estima-se que 80% do rebanho bovino encontra-se infestado pelo *R. (B.) microplus* o que leva a um prejuízo de cerca de dois bilhões de dólares anuais, incluindo diminuição de produção de leite e carne, mortalidade de animais, custos com o controle, contratação de mão-de-obra e desenvolvimento de resistência (GRISI et al., 2002).

Para a diminuição destes prejuízos torna-se necessário o controle do ectoparasito no rebanho. Classicamente, este controle é feito com a utilização de acaricidas químicos e requer fundamentalmente um manejo adequado para a obtenção de resultados satisfatórios. A aplicação dos acaricidas pode ser tópica (por pulverizadores manuais ou motorizados, banhos de imersão, aplicação dorsal "*pour on*") ou parenteral (subcutânea).

1.2 Resistência a acaricidas

Os últimos cinquenta anos se caracterizaram pelo desenvolvimento e aplicação, em diferentes áreas do mundo, de numerosas estratégias de controle de ectoparasitos que afetam a produção animal. A maioria delas mostraram-se altamente eficazes, práticas e econômicas para o controle dos parasitos, entretanto incapazes de prevenir e/ou controlar o constante desenvolvimento de resistência aos antiparasitários. A resistência de *R. (B.) microplus* aos acaricidas existe incondicionalmente na maior parte das regiões do mundo onde é realizado seu controle químico e é uma consequência do uso de parasiticidas.

Resistência pode ser definida como uma mudança na frequência de genes em uma população, promovida pela seleção artificial. Sendo que, esta mudança pode ser detectada através do aumento significativo do número de indivíduos desta população que, necessitam de uma dose superior à letal para a maioria dos indivíduos da mesma espécie (FAO, 2004). Este fenômeno é uma capacidade fundamental dos seres vivos, que os possibilita evoluir em condições ambientais sob constante transformação, permitindo-os sobreviver sob novas circunstâncias. A resistência enfim, é uma resposta genético-evolutiva das populações de parasitos expostos a um estresse ambiental severo e contínuo, como são as aplicações frequentes de um produto. Em condições de uma forte pressão seletiva, o desenvolvimento de resistência é um fenômeno inevitável (CONWAY; COMINS, 1979). No campo, se suspeita da presença de resistência quando um produto, que anteriormente se mostrava útil para o controle, já não demonstra o mesmo efeito, desde que utilizado sob condições ótimas de aplicação (dosagem correta, quantidade suficiente de calda acaricida) (BENAVIDES et al., 2001). O uso excessivo de acaricidas, sem o entendimento da ecologia e epidemiologia do carrapato, aliado a falhas na detecção, levou ao desenvolvimento de resistência à quase todas as classes de drogas.

Populações de carrapatos resistentes a organofosforados (OF) e piretróides sintéticos (PS) estão disseminadas por todo o globo (FAO, 2004). A resistência ao amitraz, droga que se mostrou eficiente para controlar populações resistentes a organofosforados e piretróides tem sido relatada (LI et al., 2004; JONSSON; HOPE, 2007). Durante a última década, foram detectadas populações de carrapatos resistentes a lactonas macrocíclicas (MARTINS; FURLONG, 2001; KLAFKE et al.,

2006) e recentemente, foi confirmada resistência a fipronil (CASTRO-JANER et al., 2009a,b, 2010). Entre as drogas disponíveis no mercado, somente o fluazuron e o spinosad ainda não têm relatos de resistência em *R. (B.) microplus*.

Os acaricidas representam uma importante ferramenta, porém não única, para o controle de carrapatos. Entretanto, historicamente, o “fenômeno” resistência foi a alavanca principal do desenvolvimento e busca de drogas novas e eficazes para o controle de pragas. No entanto, não se pode esperar que sempre haja um novo acaricida para solucionar o problema da resistência, já que os custos de desenvolvimento de novos produtos, levando-se em conta a descoberta de possíveis moléculas, pesquisa e desenvolvimento, incluindo aspectos sócio-políticos associados a resíduos nos alimentos, segurança alimentar e toxicidade ambiental, podem chegar a 200 milhões de dólares, despendendo cerca de doze anos para cada nova droga (HENNESSY, 1997). Desta maneira, a vida útil dos produtos químicos disponíveis no mercado tem de ser prolongada o máximo possível, devido ao fato de serem recursos não-duráveis.

Mundialmente, inúmeros esforços têm sido realizados para aprimorar técnicas de diagnóstico de resistência, compreender seus mecanismos e como é transmitida geneticamente. A partir deste conhecimento pode-se tomar ações preventivas e de controle da resistência de maneira sustentável.

1.2.1 Desenvolvimento de resistência

Antes da administração de um acaricida novo, os alelos que conferem a resistência são raros, ocorrendo em cerca de um a cada um milhão ou mais indivíduos (ROUSH, 1993), portanto, a grande maioria dos indivíduos de uma população de carrapatos é suscetível. Quando o acaricida é usado, os resistentes apresentam uma vantagem seletiva: sobrevivem ao tratamento, se reproduzem e dão origem a uma nova geração de carrapatos também resistentes. À medida que novas aplicações do produto são feitas, a parcela suscetível da população fenece e ocorre a predominância de indivíduos resistentes. Consequentemente, esse aumento do número de resistentes é refletido na diminuição da eficácia do produto, sendo que cada tratamento sucessivo é um processo de seleção. O tempo de desenvolvimento da resistência parece ser regido pelo grau de dominância dos

alelos envolvidos e pela frequência e qualidade dos tratamentos (KUNZ; KEMP, 1994).

É aceito que um alto grau de dominância de alelos resistentes leva a uma rápida seleção para resistência. Por exemplo, a alta dominância da resistência ao dieldrin em *R. (B.) microplus* indubitavelmente contribuiu para o desenvolvimento de resistência a este composto em apenas cinco meses (KUNZ; KEMP, 1994). Em contraste, a resistência ao DDT, semi-recessiva em *R. (B.) microplus*, pode ter contribuído com o desenvolvimento mais lento de resistência, cerca de oito anos (STONE, 1981).

Com relação à influência da qualidade e frequência dos tratamentos na velocidade de emergência de resistência, ela ainda não foi precisamente determinada. Sabe-se que a aplicação do acaricida via banheiros de imersão, corredores de aspersão e pulverizadores automáticos ou manuais podem ser igualmente efetivos sob condições ideais, porém a manutenção inadequada dos equipamentos ou o uso inapropriado de algum destes métodos pode aumentar a taxa de seleção para resistência além de aumentar os custos de controle. A diluição inapropriada dos produtos, falhas na mistura, a pulverização de quantidade insuficiente de calda nos animais, dosagem incorreta de medicamentos injetáveis ou orais (endectocidas) e desrespeito ao intervalo entre tratamentos são erros que podem elevar a taxa em que a resistência se desenvolve em uma população de carrapatos além de diminuir a eficácia do controle do parasito (GEORGE, 2000). Na América Latina a expansão da mosca-dos-chifres (*Haematobia irritans irritans*) durante as últimas décadas teve como resultado o frequente tratamento dos bovinos principalmente com o uso de PS. A concentração utilizada para matar as moscas é insuficiente para levar os carrapatos à morte, e este fato pode aumentar a velocidade de evolução da resistência aos acaricidas (FAO, 2004).

1.2.2 Mecanismos de resistência a acaricidas em *R. (B.) microplus*

Dado que a resistência é uma adaptação evolutiva, existem mecanismos comportamentais e fisiológicos que permitem aos indivíduos resistentes a sobrevivência frente à pressão de seleção. A resistência comportamental em carrapatos é pouco conhecida. No entanto, os mecanismos fisiológicos e os genes que os regulam têm sido cada vez mais estudados. Estes mecanismos fisiológicos

são principalmente: a diminuição de penetração cuticular da droga, a resistência metabólica e a resistência por insensibilidade de sítio de ação (FFRENCH-CONSTANT; DABORN; LE GOFF, 2004).

A resistência metabólica é caracterizada por um aumento na capacidade que os indivíduos resistentes têm de destoxificar e/ou eliminar os produtos acaricidas utilizados no tratamento. Esse aumento pode ser resultado: a) do aumento da expressão de enzimas responsáveis pelo metabolismo de drogas, principalmente citocromo-P450 monooxigenases (P450), esterases e glutationa S-transferases (GST) e b) do aumento da especificidade destas enzimas pelo inseticida facilitando sua destoxificação (LI et al., 2007).

A resistência por insensibilidade de sítios de ação é o segundo mecanismo mais encontrado. Caracteriza-se principalmente, por uma mutação de nucleotídeo na região codificadora de um gene. Esta mutação pode conferir uma mudança de aminoácido, e consequentemente, uma alteração tri-dimensional na(s) proteína(s) formadora(s) do receptor. Esta alteração estrutural pode reduzir ou bloquear a capacidade da molécula de se ligar ao sítio de ação, resultando em resistência (SODERLUND; BLOOMQUIST, 1990). Os mecanismos de resistência determinados em *R. (B.) microplus* para diferentes classes acaricidas encontram-se descritos no **Quadro 1.**

Quadro 1. Mecanismos de resistência determinados para *Rhipicephalus (B.) microplus* aos acaricidas.

Classe acaricida	**Mecanismo**	
	Metabólico	**Insensibilidade de sítio de ação**
Piretróides Sintéticos	P450/ Esterases[1]	Canal de Sódio[2]
Organofosforados	Esterases[3]	Acetilcolinesterase[4]
Amitraz	Esterases/ GST[5]	Receptor de octopamina[5]
Dieldrin	-	Canal de Cloro controlado pelo GABA

FONTE: 1. Miller et al., 1999; 2. Guerrero et al., 2001; 3. Vilarino et al., 2003; 4. Foil et al., 2004; 5. Li et al., 2004; 6. Hope; Menzies e Kemp, 2010.

1.3 Lactonas macrocíclicas: características e resistência

O grupo das lactonas macrocíclicas (LMs), dividido em avermectinas (ivermectina, abamectina e doramectina) e milbemicinas (moxidectina) são, respectivamente, compostos derivados da fermentação dos actinomicetos *Streptomyces avermetilis* e *Streptomyces cyanogriseus*, possuindo propriedades nemodoticidas, inseticidas e acaricidas (BURG; STAPLEY, 1989; FISHER; MROZIK, 1989). O primeiro membro das LMs a ser comercializado foi a ivermectina, a partir de 1981 (YATES et al., 2003). Dentro de um período de cinco anos, esta droga capturou 16% das vendas mundiais de parasiticidas (BLOOMFIELD, 1988) e no Brasil, em 2005, a venda de avermectinas e milbemicinas representou cerca de 290 milhões de Reais, correspondendo a aproximadamente 500 milhões de doses vendidas destes medicamentos (SINDAN, 2006). Estes valores demonstram a ampla utilização no país destes produtos para o controle de parasitos internos e externos dos animais domésticos. As avermectinas e milbemicinas podem ser encontradas no mercado sob várias apresentações: injetável, oral ou tópica.

Dada a semelhança estrutural e funcional entre avermectinas e milbemicinas, pode-se assumir em alguns casos que as informações obtidas sobre um dos membros desta família podem ser extrapoladas a todos os outros (YATES et al., 2003). A eficácia da ivermectina é atribuída à ligação de alta afinidade do fármaco aos canais de cloro controlados pelo glutamato (GluCl), presentes nas células musculares e nervosas dos invertebrados (CHEESEMAN et al., 2001). A abertura destes canais, promovida pela ligação da ivermectina, resulta em um lento e irreversível aumento da condutância aos íons cloreto na membrana, levando a uma paralisia da musculatura somática (GEARY et al., 1993). Também foi descrita a ligação aos canais de cloro controlados pelo ácido gamaaminobutírico (GABA) após administração de altas doses do fármaco (MCKELLAR; BENCHAOUI, 1996, LUDMERER et al., 2002). A ação da ivermectina no GluCl foi descrita originalmente em *Caenorhabditis elegans* (ARENA et al., 1992) para o qual, genes codificadores de duas subunidades (α e β) do GluCl, foram clonados e expressos em oócitos de *Xenopus sp.*. Após a expressão, foi verificado que as subunidades se reuniram formando canais de cloro ativados pelo glutamato e altamente sensíveis à ivermectina. Os resultados destes experimentos também sugeriram que a

subunidade α constitui o local de ligação da ivermectina, enquanto que o sítio de ligação do glutamato seria a subunidade β.

Em diversas espécies sensíveis a ação da ivermectina, na região transmembrana da proteína GluCl existe um resíduo de Glicina fundamental para a ligação da molécula que, quando inexistente ou substituído, impede a ligação da mesma conferindo insensibilidade do canal a droga (LYNAGH, LYNCH, 2010).

Proteínas GluCl descritas para *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*, espécies sensíveis a ivermectina, apresentam sequências de aminoácidos semelhantes (CULLY et al., 1996). São similares também, a sequências de GluCl descritas para os carrapatos *Rhipicephalus sanguineus* e *Dermacentor variabilis* (LEES; BOWMAN, 2007). Assim, é possível que estas sequências sejam também conservadas em *R. (B.) microplus*. Deste modo, dado que o carrapato bovino é uma espécie sensível a ivermectina, supõe-se que o mecanismo de ação das LMs neta espécie seja o mesmo que o descrito para *Caenorhabditis elegans* e *Drosophila melanogaster*.

A resistência a LMs têm sido relatada em diferentes espécies de helmintos e artrópodes, sendo que o uso intensivo associado à falha da detecção no início de seu desenvolvimento têm sido característicos desta resistência no campo (SHOOP, 1993).

Em helmintos, a resistência a LMs está disseminada em grande parte das regiões em que são utilizadas para o controle de verminoses, sendo descrita em *Haemonchus contortus* (BLACKHALL et al., 2003), *Onchocerca volvulus* (ENG et al., 2006), *Dictyocaulus viviparus* (MOLENTO et al., 2006), *Parascaris equorum* (STONEHAM; COLES, 2006) entre outros. O mecanismo de resistência à ivermectina em *Caenorhabditis elegans* é atribuído a uma insensibilidade do receptor GluCl, impedindo a ligação com o local de ação. Nesta espécie a insensibilidade é causada por uma alteração estrutural da subunidade GluClα (DENT et al., 2000).

Para artrópodes, existem relatos de resistência à ivermectina em *Sarcoptes scabiei* (CURRIE et al., 2004) e *Lucilia cuprina* (RUGG et al., 1998). A resistência a abamectina, molécula análoga da ivermectina, utilizada em larga escala como pesticida agrícola foi relatada em *Blattella germanica* (SCOTT, 1991), *Plutella xylostella* (ABRO et al., 1986) e *Leptinotarsa decemlineata* (ARGENTINE; CLARK; LIN, 1992). Os estudos com estas espécies atribuem como mecanismos de resistência o aumento do metabolismo oxidativo por P450s, conjugação por GST e

hidrólise por esterases (CLARK et al., 1994). A diminuição de penetração cuticular da droga foi descrita somente para *Musca domestica* (SCOTT et al., 1991). A resistência a ivermectina determinada por insensibilidade do GluCl foi descrita em *Drosophila melanogaster* (CULLY et al., 1996) e *Tetranychus urticae* (KWON et al., 2010).

Em carrapatos, a resistência a LMs foi pouco estudada. Existem, até o momento, apenas dois relatos de cepas resistentes a esta classe. Uma delas (cepa São Gabriel) foi detectada através de teste de campo (Martins e Furlong, 2001). Outra população resistente a ivermectina, foi detectada por teste *in vitro* no estado de São Paulo (KLAFKE et al., 2006) e posteriormente isolada em laboratório e mantida sob pressão de seleção com ivermectina (cepa Piquete) (ALBUQUERQUE 2007). Complementarmente, queixas sobre a eficácia de ivermectina são comuns (MENDES[1], 2007 - comunicação pessoal) e dada a ampla utilização desta molécula no Brasil por cerca de 20 anos, é possível que existam outras populações resistentes.

1.4 Diagnóstico da resistência

O diagnóstico da resistência a acaricidas é necessário para identificar o problema, elaborar estratégias para o controle da situação, adotar táticas efetivas na prevenção da emergência de resistência, prevenir a disseminação de carrapatos resistentes e economizar fundos. Segundo a FAO (2004) existem certos requisitos fundamentais que precisam ser satisfeitos no desenvolvimento ou seleção do teste laboratorial ideal. Uma necessidade básica é que o teste seja capaz de detectar o problema de resistência num estágio primário de seu desenvolvimento, e se possível, antes de se tornar um problema maior de controle no campo. O teste deve também ser simples, de fácil realização e de baixo custo. Essencialmente, os resultados devem ser reprodutíveis.

Atualmente a detecção de resistência a acaricidas é realizada através de bioensaios *in vitro* ou *in vivo* (testes de estábulo e de campo). Os bioensaios *in vitro* são baseados nos estágios de vida livre do carrapato, como larvas ou fêmeas ingurgitadas prontas para oviposição (SCOTT, 1995) e os testes *in vivo* são

[1] Dra. Márcia Cristina Mendes, Instituto Biológico, São Paulo - SP, 2007. (comunicação pessoal)

geralmente conduzidos com animais, natural ou artificialmente infestados submetidos ao tratamento com a droga a ser testada. Há mais de 40 anos os bioensaios têm sido utilizados com sucesso no diagnóstico de resistência a acaricidas (FAO, 2004).

Nos bioensaios *in vitro* podem ser utilizadas adultas teleógenas ou larvas delas oriundas. Entre os testes com adultos, o mais utilizado é o teste de imersão de adultas (TIA) desenvolvido por Drummond et al. (1973). As técnicas *in vitro* mais usadas para testar a suscetibilidade de larvas a acaricidas são o teste do pacote de larvas (TPL) (STONE; HAYDOCK, 1962) e o teste de imersão de larvas (TIL) (SHAW, 1966).

Mais recentemente, esforços estão sendo realizados para o desenvolvimento do diagnóstico por marcadores moleculares (GUERRERO; PRUETT, 2003). Estes podem detectar resistência em seu estágio inicial, anterior mesmo aos bioensaios, e possibilitam a distinção genotípica da resistência e a frequência de seus alelos numa população. Estes testes não são influenciados por fatores ambientais que podem interferir nos resultados de um bioensaio. Uma comparação direta entre os dois métodos indica o ensaio molecular como aquele que mais se aproxima do teste ideal. Em carrapatos, já existem técnicas para diagnóstico molecular de resistência. Atualmente é possível determinar a presença de mutações dos genes codificadores dos canais de sódio, que conferem resistência a PS e nos genes que codificam a acetilcolinesterase, responsáveis pela resistência a OF, além de determinar a frequência de indivíduos resistentes em uma população (GUERRERO et al., 2001).

1.5 Caracterização da resistência

Os programas de monitoramento de resistência não devem mais se ater a determinação dos fenótipos resistentes em populações de carrapatos. O manejo eficiente da resistência depende da detecção precoce do problema e de rápida assimilação da informação sobre as populações resistentes para que a escolha racional do produto seja feita. O uso correto de métodos para detecção e caracterização da resistência em um nível de mecanismos pode nos prover de ferramentas poderosas para analisar populações de campo e cepas de laboratório com o objetivo de melhorar a detecção e o manejo da resistência.

1.5.1 Bioensaios com inibidores enzimáticos

Os bioensaios com inibidores enzimáticos são utilizados para inferir sobre os possíveis mecanismos metabólicos de resistência existentes em indivíduos/ populações resistentes. Os testes são realizados utilizando-se inibidores das principais enzimas envolvidas com a resistência metabólica: esterases, P450s e GST. Alguns dos inibidores enzimáticos que podem ser utilizados são o trifenilfosfato (TPP), inibidor de esterases, o butóxido de piperonila (PBO), inibidor de P450s e o dietilmaleato (DEM), inibidor de GST (SCOTT, 1990). Estes ensaios foram utilizados amplamente para a caracterização da resistência metabólica em *Musca domestica* (LIU; YUE, 2000), *Leptinotarsa decemlineata* (ARGENTINE; CLARK, LIN, 1992), *Diaretiella rapae* (WU et al., 2004), *Rhipicephalus sanguineus* (MILLER et al., 2001) e *R.* (*B.) microplus* (MILLER et al., 1999; LI et al., 2004).

1.5.2 Caracterização molecular

A utilização de técnicas de biologia molecular para caracterização da resistência, tem contribuído para o desenvolvimento de ensaios para detecção de genes específicos associados à resistência a acaricidas e desta maneira pode facilitar a identificação de populações resistentes de *R.* (*B.) microplus*. Seria muito útil determinar os status de resistência de amostras de carrapatos com um teste diagnóstico rápido e sensível, que pudesse ser conduzido com somente um indivíduo, e que poderia guiar a seleção de um outro acaricida. Isto é valioso para que se tenha um programa de manejo de resistência prudente e efetivo (GUERRERO; PRUETT, 2003).

Uma técnica de PCR está disponível para a detecção de uma mutação genética específica que está associada a resistência PS, identificando uma substituição de fenilalanina para isoleucina na região codificadora do canal de sódio (GUERRERO et al., 2001). Populações do México, previamente detectadas como resistentes através do TPL, e com resistência metabólica descartada através de ensaios com sinergistas (MILLER et al., 1999) foram genotipadas por PCR, permitindo determinar a frequência de indivíduos resistentes, homozigotos e heterozigotos, além da frequência dos alelos resistentes (GUERRERO et al., 2001). Esta técnica que pode ser realizada em carrapatos individuais, em qualquer estágio

da vida com resultados obtidos em algumas horas, é utilizada de rotina pelo USDA (United States Department of Agriculture) na fronteira entre os EUA e o México visando a identificação de carrapatos resistentes a PS que possam entrar em território estadunidense. Estudos moleculares com cepas de *R.* (*B.) microplus* resistentes e suscetíveis a OF, têm identificado acetilcolinesterases (AChEs) específicas e suas regiões de genes codificadores com mutações que podem ser responsáveis por conferir resistência a estes compostos. Até o momento não existem evidências concretas de que a insensibilidade da AChE seja a responsável pela resistência a OF, já que alguns estudos demonstraram diferenças de aminoácidos nas regiões codificadoras de AChE entre cepas suscetíveis e resistentes da Austrália (BAXTER; BARKER, 2002) e estudos realizados no México não foram capazes de determinar estas diferenças (HERNANDEZ et al., 1999).

Como a resistência a PS e OF encontra-se disseminada por todo o globo, o uso de amitraz e LMs para o controle do carrapato bovino vem aumentando. Estudos realizados na Austrália (BAXTER; BARKER, 1999), não encontraram mutações no gene codificador do receptor de octopamina (possível sítio de ação do amitraz) entre cepa resistente e suscetível a amitraz. Até o momento não existem relatos sobre a identificação do sítio de ação de LMs e possíveis mecanismos de resistência a estes compostos em *R. (B.) microplus.* A identificação, clonagem e sequenciamento do gene codificador do canal GluCl nesta espécie é fundamental para a determinação de um possível mecanismo de insensibilidade de ação conferindo resistência.

Seria valioso desenvolver técnicas de diagnóstico rápido de resistência a LMs antes que o fenômeno se torne um sério problema. O diagnóstico molecular de resistência a estas drogas pode constituir ferramenta muito útil em um programa de manejo da resistência e se essas mutações forem identificadas, um ensaio de PCR poderia ser desenvolvido e usado para detectar a resistência em estado inicial.

1.6 Justificativa

Visto que a resistência a LMs encontra-se em estágio rápido de desenvolvimento em alguns países da América Latina, é muito importante desenvolver e aprimorar técnicas diagnósticas para que sejam mais criteriosas e ainda, compreender os mecanismos pelos quais os carrapatos resistentes conseguem sobreviver ao tratamento com estes compostos. Este conhecimento pode fornecer informações úteis para o manejo da resistência e como consequência um controle químico racional e sustentável de *R. (B.) microplus*.

1.7 Objetivos

O objetivo do presente projeto foi o diagnóstico e a investigação de possíveis mecanismos metabólicos e/ ou moleculares, envolvidos na resistência de *Rhipicephalus (B.) microplus* a ivermectina. Para tal, seguiu os objetivos específicos:

1. Padronizar bioensaios e diagnosticar a resistência em populações de campo;
2. Isolar cepas resistentes mantendo-as sob pressão de seleção;
3. Investigar mecanismos metabólicos envolvidos na resistência;
4. Comparar sequências codificadoras do canal de cloro controlado pelo glutamato de indivíduos de populações resistentes e suscetíveis.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Carrapatos

2.1.1 Procedência

Cepa Mozo: originária do Uruguai, é cepa suscetível referência da FAO para estudos e diagnóstico de resistência na América Latina. Cedida por Dr. João Ricardo Martins (Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul, RS).

Cepa POA: originária de Porto Alegre (RS), cepa brasileira suscetível a acaricidas. Cedida por Prof. Dr. Itabajara Cruz Vaz Silva (Centro de Biotecnologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS).

Cepa ZOR: cepa referência resistente a ivermectina, originária do município de Ipiguá (SP), mantida sob pressão de seleção.

Cepa M.ivm: linhagem da cepa suscetível Mozo, pressionada com ivermectina para seleção de indivíduos resistentes.

Populações de campo: oriundas de 30 estabelecimentos de produção bovina localizadas nos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul, com ou sem histórico de exposição prévia a lactonas macrocíclicas (LM).

2.1.2 Manutenção das colônias

Para a manutenção das colônias de carrapatos foram utilizados como hospedeiros bovinos da raça holandesa. Antes das infestações, os animais foram previamente inspecionados para a presença de carrapatos e tratados preventivamente contra infecções por *Babesia spp.* e *Anaplasma marginale*. Os bovinos ficaram alojados no Instituto Biológico de São Paulo, em baias individuais de alvenaria (dimensões 2,30 m x 3 m) onde permaneceram isolados. Durante o experimento, os animais foram alimentados com feno de alfafa, sal mineral, ração para bovinos e água à vontade. O manejo dos animais foi conduzido de acordo com as regras da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Instituto de Ciências

Biomédicas da Universidade de São Paulo (protocolo No. 44/05-CEEB/ICB) e do Comitê de Ética do Instituto Biológico de São Paulo (registro No. 90/09).

2.1.3 Preparação dos carrapatos

Fêmeas de populações de campo, parcial ou totalmente ingurgitadas foram coletadas diretamente dos animais infestados, imediatamente acondicionadas em recipientes plásticos com tampa perfurada para permitir a passagem de ar, que foram transportados em caixas de isopor até o Laboratório de Parasitologia Experimental e Aplicada do Departamento de Parasitologia / ICB-USP. Fêmeas totalmente ingurgitadas das cepas referência (Mozo e ZOR) foram coletadas após o seu desprendimento natural, entre o 18º e o 25º dias pós-infestação. Após lavagem (água) e secagem (papel toalha), os carrapatos foram pesados e aderidos (dorsalmente), com o auxílio de uma fita dupla face, à tampa de uma placa de petri plástica (100 mm de diâmetro X 22 mm de altura). Esta prática permitiu que os ovos resultantes da postura das fêmeas, que caíram da tampa, fossem coletados de maneira simples, fácil e rápida. O recipiente foi identificado e mantido a temperatura entre 27 - 28 ºC e umidade relativa do ar entre 85 – 90% em uma estufa para que ocorresse a postura dos ovos por duas semanas. Os ovos coletados de cada placa foram misturados com auxílio de uma espátula de aço inoxidável, pesados e incubados em um tubo de vidro (5 ml) fechado com algodão para permitir a passagem de ar e umidade e incubados em estufa sob as mesmas condições descritas previamente para permitir a eclosão das larvas. Para os testes com larvas, foram utilizados espécimes com 14 a 21 dias de vida.

2.2 Bioensaios *in vitro* para diagnóstico de resistência ivermectina

Foram determinados os perfis de toxicidade da ivermectina em larvas e adultos de *R. (B.) microplus* da cepa suscetível Mozo, utilizando uma série de diluições de ivermectina técnica (23,24 di-hidroavermectina B1a grau técnico 96%, Agromen Chemicals Co. LTD, Hang Zhou, China. Lote No. 7231104), tendo em vista a sobrevivência do total dos indivíduos testados até a morte de 100% deles. Primeiramente foram conduzidos com a cepa Mozo, testes de imersão de adultas (TIA; n=32), testes do pacote com larvas (TPL; n=9) e testes de imersão de larvas

(TIL; n=23), afim de estabelecer a linha de base para a comparação com as populações de campo.

2.2.1 Teste de imersão de adultas

Para a adequação do TIA com ivermectina foi utilizada a cepa Mozo. Foram testados três tempos de imersão: 1, 5 e 30 minutos. Inicialmente foi preparada uma solução de ivermectina a 4% em etanol a 60%. Diluiu-se o ingrediente ativo primeiramente no etanol e depois foi acrescentada água destilada, afim de evitar a precipitação da droga. Da solução inicial foram feitas diluições seriadas duplas em etanol a 60% para obtenção das soluções de imersão (em % do ingrediente ativo – I.A.): 4; 2; 1; 0,5; 0,25; 0,125; 0,0625, 0,0312 e 0,0156. O grupo controle foi imerso por 1 minuto em uma solução de etanol a 60% sem acaricida. Foram testadas entre 5 e 9 diluições por ensaio, dependendo da disponibilidade de carrapatos. Foram organizados grupos homogêneos em tamanho, peso e vigor de 10 teleóginas por diluição, mais o grupo controle. Cada grupo foi imerso em 10 ml da diluição correspondente, contidos em béqueres de 50 ml de capacidade. Imediatamente após a retirada da solução acaricida, as teleóginas foram secas com papel toalha, colocadas em placas de Petri e incubadas em estufa B.O.D. em temperaturas entre 27 e 28 ^{o}C e umidade relativa do ar entre 80 e 90%. No sétimo e décimo quarto dia foram registrados os números de carrapatos vivos e mortos, considerando-se vivo aqueles que tivessem realizado a postura e, em ambos os dias, foi registrado o peso dos ovos. Na 6a semana, foi registrada a porcentagem de eclodibilidade por estimativa visual (DRUMMOND et al., 1973).

2.2.2 Teste do pacote com larvas

Para o TPL, a ivermectina foi dissolvida numa solução estoque composta por óleo de oliva (OO) (autoclavado e adicionado de anti-oxidante ionol 0,02%) e tricloroetileno (TCE) na proporção de 2:1, de acordo com Stone e Haydock (1962). Inicialmente a ivermectina técnica foi diluída à 1% na solução TCE-OO. Esta solução foi então utilizada para preparar individualmente as soluções de impregnação em TCE-OO com as seguintes concentrações (em ppm de I.A.): 4000; 3000; 2500; 2000; 1800; 1500; 1200; 1000; 800; 500 e 300. O preparo dos pacotes foi realizado

segundo a FAO (2004). Uma alíquota de 0,67 mL de cada solução foi aplicada a um papel de filtro (Whatman Nº1 - dimensões: 750 mm x 850 mm), previamente identificado. Após a evaporação do tricloroetileno (24 h a temperatura ambiente), os papéis foram dobrados na metade e vedados nas laterais com auxílio de clipes de metal formando os pacotes. Aproximadamente 100 larvas foram colocadas com um pincel em cada pacote, que foi então selado por um terceiro clipe. Os pacotes com larvas foram mantidos por 24 h em estufa (27 ºC - 28 ^{o}C/ 80% - 90% U.R.). Após este período, os pacotes foram abertos e as larvas vivas e mortas contadas. Larvas completamente imóveis ou apenas com movimento de seus apêndices, sem deslocamento foram consideradas mortas. O grupo controle foi exposto ao papel impregnado com os solventes orgânicos voláteis, livres de acaricida.

2.2.3 Teste de imersão de larvas

Para o TIL foi utilizado o protocolo proposto por Sabatini et al. (2001) e modificado por Klafke et al. (2006). Inicialmente foi preparado um veículo (diluente) composto de 2% de Triton-X 100 (Sigma-Aldrich) em etanol 100% (Eth-TX2%). Uma solução estoque foi preparada diluindo-se a ivermectina técnica à 1% em 10 ml de Eth-TX2% e conservada a 4 ^{o}C por no máximo uma semana. Na hora do teste, a solução estoque foi diluída 1/ 100 em água destilada obtendo-se uma concentração final de 0,01% (100ppm) de ivermectina, 0,02% de Triton-X 100 e 1% de etanol. Desta solução, foram feitas diluições seriadas de 7 partes para 3 (30%) no veículo a fim de obter as seguintes concentrações de trabalho (em ppm): 70; 49; 34,3; 24; 16,8; 11,7; 8,2; 5,7; 4; 2,8. Como controle, foi usado o veículo sem ivermectina. De cada solução, 500 µl foram transferidos para tubos de microcentrífuga (1,5 ml) aos quais aproximadamente 100 larvas foram adicionadas com um pincel. Após 10 minutos de imersão as larvas foram retiradas do tubo com um pincel limpo, secas em papel toalha e transferidas para um pacote de papel filtro dobrado na metade vedados nas laterais com auxílio de clipes de metal. O pacote foi fechado com um terceiro clipe e incubado por 24 h em estufa (27 ºC - 28 ^{o}C / 80% - 90% U.R.). Após este período, os pacotes foram abertos e as larvas vivas e mortas contadas. Larvas completamente imóveis ou apenas com movimento de seus apêndices, sem deslocamento, foram consideradas mortas.

2.2.4 Validação dos ensaios com larvas

Para validar o TPL e o TIL foi utilizada a quarta geração da cepa ZOR, mantida sob pressão de seleção pelo tratamento dos hospedeiros com ivermectina. Foram realizados 3 ensaios em triplicata com cada uma das técnicas, utilizando a cepa Mozo como controle suscetível.

2.3 Convalidação dos bioensaios e diagnóstico de resistência a ivermectina em populações de campo

Foram utilizadas larvas oriundas de teleóginas procedentes de 30 propriedades de criação bovina dos estados de São Paulo (n=25), Mato Grosso do Sul (n=2), e Rio Grande do Sul (n=3), com ou sem histórico de exposição prévia a LMs. As teleóginas foram coletadas entre os anos de 2007 e 2010.

O TIL foi aplicado em todas as populações coletadas. O TPL foi aplicado somente quando a quantidade de larvas foi suficiente para conduzir ambas as técnicas (8 populações). Para cada população foi realizado um teste em triplicata, em paralelo à cepa Mozo ou POA, controles suscetíveis.

2.3.1 Caracterização das propriedades

No estado de São Paulo, as populações de carrapatos foram coletadas em propriedades de produção leiteira, com exceção de ANT e JEQ, provenientes de fazendas de gado de corte. Seu rebanhos eram compostos por 10 a 150 animais, derivados de cruzamentos entre *Bos taurus taurus* e *Bos taurus indicus*, criados em regime de pastejo exclusivo ou com suplementação. Em geral, os proprietários ou responsáveis relataram histórico de infestações frequentes por *R. (B.) microplus* ao longo do ano, com observação de diminuição do número de carrapatos na época de seca e/ou inverno. Considerando todas as propriedades, todas as classes acaricidas disponíveis haviam sido utilizadas. Entre as populações, foi diagnosticada a resistência a piretróides sintéticos (PS), organofosforados (PS), amitraz (MENDES et al., 2011) e fipronil (CASTRO-JANER et al., 2010) por bioensaios.

As populações do Rio Grande do Sul foram coletadas em grandes propriedades de produção de gado de corte de linhagens européias. Todas

apresentavam dificuldade para controlar *R. (B.) microplus* com acaricidas (inclusive lactonas macrocíclicas) e demonstraram redução de eficácia *in vitro* a OF, PS e amitraz em testes com adultos (MARTINS [2], 2010 - comunicação pessoal).

Do estado do Mato Grosso do Sul, as populações coletadas foram provenientes de grandes propriedades de produção de gado de corte de linhagens cruzadas, com problemas para controlar o carrapato.

Com respeito à exposição dos carrapatos a LMs, oito populações (BDT1, BDT2, BDT3, JS, Prat, StaP, SLU e TRE) foram coletadas em propriedades onde não era utilizado qualquer princípio ativo desta classe para o controle de carrapatos. As populações AGU, ANT, APTA, CAN, CAV, FAR, FIG, JUA, LAC, Lar, PCE, PIQ, POR, Sma, StoA, VIS e ZOR foram expostas a ivermectina por pelo menos três anos antes da coleta de carrapatos. As populações APO, BON, Fer, JEQ e SGA utilizavam a doramectina para o controle de carrapatos por no mínimo 3 anos.

No **Quadro 2** estão identificadas as populações de campo estudadas, seus respectivos locais de origem, perfil de resistência acaricida e histórico de exposição a LMs.

[2] Dr. João Ricardo de Souza Martins, Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor, Eldorado do Sul - RS, 2011. (Comunicação pessoal)

Quadro 2. Caracterização das populações de campo quanto ao perfil de resistência acaricida e histórico de exposição a lactonas macrocíclicas.

População	Município – Estado	Resistência				Exposição LM
		P	O	A	F	
AGU	Bady Bassit-SP	R	R	S	S	IVM
ANT	Piquete-SP	R	S	NT	R	IVM
APO	Caçapava-SP	R	S	NT	R	IVM, DOR
APTA	Pindamonhangaba-SP	R	S	R	NT	IVM
BDT1	Taubaté-SP	R	R	NT	S	-
BDT2	Pindamonhangaba-SP	R	S	NT	S	-
BDT3	São Luiz do Paraitinga-SP	R	R	NT	S	-
BON	Lorena-SP	R	R	NT	R	IVM, DOR
FAR	Cachoeira Paulista-SP	R	S	NT	R	IVM
FER	Regente Feijó-SP	R	R	S	S	IVM, DOR
FIG	Jacareí-SP	R	S	NT	S	IVM
JEQ	Porto Feliz – SP	R	S	R	NT	IVM, DOR
JS	São Roque-SP	R	R	S	R	-
JUA	Jacareí-SP	R	R	R	NT	IVM
LAC	Guaratinguetá-SP	R	S	NT	R	IVM
LAR	Anhumas-SP	R	R	NT	S	IVM
PCE	Santa Cruz do Rio Pardo-SP	R	S	NT	R	IVM
PIQ	Piquete-SP	R	R	R	R	IVM
POR	Cruzeiro-SP	R	R	NT	R	IVM
Prat	São João da Boa Vista-SP	R	R	S	NT	-
Sma	Regente Feijó-SP	R	R	S	R	IVM
StoA	Jacareí-SP	S	S	S	NT	IVM
TRE	Araçatuba-SP	R	NT	NT	R	-
VIS	Jacareí-SP	R	S	NT	R	IVM
ZOR	Ipiguá-SP	R	R	R	R	IVM, ABA
CAN	Campo Grande-MS	R	R	NT	R	IVM
StaP	Ribas do Rio Pardo-MS	R	S	NT	S	-
CAV	Alegrete-RS	R	R	R	NT	IVM
SGA	Eldorado do Sul-RS	R	R	R	NT	DOR, IVM
SLU	Alegrete-RS	R	S	R	NT	-

R: resistente; S: suscetível; NT: não testado; P: piretróides sintéticos; O: organofosforados A: amitraz; F: fipronil; LM: lactonas macrocíclicas; IVM: ivermectina; DOR: doramectina; ABA: abamectina. Estados: São Paulo (SP), Mato Grosso do Sul (MS) e Rio Grande do Sul (RS).

2.4 Análise estatística dos bioensaios

Para a análise dos dados obtidos nos testes de padronização dos ensaios com adultos e larvas da cepa Mozo foi utilizado o programa Intercooled Stata 10 (STATACORP, 2007).

Para o TIA foi determinada a correlação entre o peso dos ovos no sétimo e décimo quarto dia, independentemente do tratamento. Para avaliação da resposta ao tratamento as seguintes variáveis foram comparadas: **a) mortalidade**: teleóginas que botaram ovos foram consideradas vivas e as que não, foram consideradas mortas; **b) peso dos ovos (P.O.)**, calculando-se a CL_{50} como a concentração que reduziu a produção de ovos a 50%; **c) índice de fertilidade (IFER)** = peso da massa de ovos (g) / peso das fêmeas (g); d) **índice de fecundidade (IFEC)** = IFER x percentagem de eclosão.

Nos testes de larvas, foi utilizado o modelo de regressão Probit segundo Finney (1980) através do programa Polo Plus (LEORA SOFTWARE, 2004). Para cada teste, os seguintes parâmetros foram determinados: concentração letal para 50% (CL_{50}) com seus intervalos de confiança de 95% (IC95%) e a inclinação (*slope*) da linha de regressão. Os fatores de resistência (FR) e seus IC95% foram gerados pelo programa Polo Plus. A significância de cada comparação foi determinada quando os intervalos de confiança calculados não se sobrepuseram.

Para a interpretação dos resultados sobre diagnóstico de resistência acaricida em populações de carrapatos foram utilizadas as três categorias estabelecidas por Castro-Janer et al. (2009b): **a) Suscetível**: quando a CL_{50} (IC95%) da população de campo não é estatisticamente diferente da cepa referência suscetível; **b) Resistência incipiente**: quando a CL_{50} da população de campo é estatisticamente diferente da cepa referência suscetível com $1 < FR < 2$; **c) Resistente**: quando a CL_{50} da população de campo é estatisticamente diferente da cepa referência suscetível com $FR \geq 2$.

Para elaboração dos gráficos derivados dos resultados dos testes de larvas foi utilizado o programa Microsoft Excel ® para Mac (MICROSOFT, 2004). Os gráficos dos testes com adultos foram gerados a partir do software Intercooled Stata 10.

2.5 Comportamento da resistência de *Rhipicephalus (B.) microplus* a ivermectina em condições naturais

2.5.1 Avaliação de resistência por bioensaios *in vitro*

As populações PIQ, ZOR e APTA foram utilizadas para o acompanhamento do comportamento da resistência de *R. (B.) microplus* a ivermectina em condições de campo. Foram avaliadas quanto a resistência por bioensaios (TIL) em diferentes momentos da pesquisa.

A população PIQ é originária de uma fazenda de produção comercial de leite que explorava 97 bovinos cruzados (holandês com gir-leiteiro, em diferentes graus), sendo 70 vacas em produção. O sistema de pastejo com suplementação ocupava 10 hectares da propriedade. Apresentava histórico de uso intensivo de ivermectina por dez anos até julho de 2004, quando foi realizado uma primeira avaliação da resistência (FR = 3,78) (KLAFKE et al., 2006). A partir de então, o uso de LMs ficou restrito ao tratamento curativo de *Dermatobia bovis* e à prevenção de miíase de umbigo causada por *Cochliomiya hominivorax* em animais recém nascidos. Foram realizados testes (TIL) em janeiro de 2005 de material coletado das vacas em produção. Em outubro de 2008 e janeiro de 2010 os testes foram realizados com larvas oriundas de fêmeas coletadas somente de animais tratados com ivermectina.

A população ZOR é proveniente de uma unidade de produção leiteira de exploração familiar, com 30 animais da raça holandesa em regime de pastejo rotacionado em 10 hectares. Tinha histórico de utilização de ivermectina há no mínimo três anos para o controle de carrapato. Teleóginas foram coletadas em duas oportunidades, em janeiro e outubro de 2008. Durante este intervalo foi mantido o uso de ivermectina.

A população APTA é proveniente de um rebanho comercial com 150 animais em regime de pastejo com suplementação em 30 hectares. A primeira avaliação de resistência foi realizada em agosto de 2005, após dois tratamentos sequenciais com ivermectina. O uso desta droga foi mantido e foram realizados tratamentos a cada 40 dias até setembro de 2007, quando foi realizada mais uma avaliação pelo TIL. A utilização da ivermectina foi suspensa até outubro de 2008, quando foi realizado mais um TIL.

2.5.2 Teste de eficácia a campo

O teste *in vivo* foi realizado com a população APTA em outubro de 2008, após 13 meses da suspensão do uso de ivermectina. Para tanto, vinte novilhas cruzadas (mantiqueira com holandês em diferentes graus), com idade entre 1,5 e 2 anos, foram selecionadas de e acordo com a média geométrica de contagens de teleóginas de *R. (B.) microplus* (com tamanho entre 4,5 mm e 8,0 mm) do lado esquerdo do animal nos dias -2, -1 e zero. As novilhas foram alocadas em dois grupos de dez animais cada, homogêneos com relação ao número de carrapatos infestantes (aproximadamente 30 por animal). Um grupo foi tratado e o outro mantido sem tratamento (controle) e foram alocados no mesmo piquete. Os animais do grupo tratado receberam ivermectina 1% (Ivermectina 1% Ouro Fino®, Ouro Fino Agronegócio, Cravinhos - SP) injetada subcutaneamente na dose de 200 µg/ Kg de peso vivo. O peso dos animais foi aferido em balança imediatamente antes do tratamento. A eliminação de *R. (B.) microplus* e o efeito do produto foram avaliados pela metodologia proposta pela *World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology* (ROLDSWORTH et al., 2006), Foi realizada a contagem de todas as fêmeas entre 4,5 mm e 8,0 mm de comprimento, presentes no lado esquerdo de cada bovino, sempre pela mesma pessoa (JRP)[3] no mesmo horário (entre 7:00 e 9:00 hs), nos dias 3, 7, 14, 21, 28 e 35 pós-tratamento. A porcentagem de eficácia diária (%EFD) do tratamento sobre as fases de vida parasitária foi calculada segundo a equação:

$$\%EFD = \frac{1 - (Ta \times Cb)}{Tb \times Ca} \times 100$$

Onde :

Ta = número de teleóginas dos animais tratados, no período após o tratamento;

Tb = número de teleóginas dos animais tratados nos 3 dias anteriores ao tratamento;

Ca = número de teleóginas dos animais controle, no período após o tratamento;

Cb = número de teleóginas dos animais controle nos 3 dias anteriores ao tratamento.

---

[3] José Roberto Pereira, M.V. Laboratório de Parasitologia do Polo Regional da Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios do Vale do Paraíba, Pindamonhangaba (SP).

Nos dias em que se realizaram as contagens de carrapatos, foram coletadas 10 teleóginas por grupo (tratado e controle) para avaliação *in vitro* do desempenho reprodutivo e cálculo da percentagem de inibição de postura (%IP) e de eclosão de larvas, segundo a FAO (2004).

$$\%IP = \frac{\text{P.O. controle} - \text{P.O. tratado}}{\text{P.O. tratado}} \times 100$$

Onde:
P.O. controle = peso dos ovos do grupo controle
P.O. tratado = peso dos ovos do grupo tratado

Para análise estatística, a variância entre as médias de contagens das fêmeas entre os tratamentos e entre o dia do tratamento e após o tratamento (0, 3, 7, 14, 21, 28 e 35) foram analisadas utilizando-se o teste t de Student (α = 0,05) pelo programa Stat Plus:mac 2009 (ANALYSTSOFT, 2009).

2.6 Isolamento de cepas resistentes a ivermectina

As cepas ZOR e M.ivm foram mantidas sob pressão de seleção para resistência através do tratamento do bovino hospedeiro no momento da infestação com ivermectina injetável (Ivomec® injetável - Merial Saúde Animal, Campinas - SP) nas doses de 200 µg/ Kg (cepa ZOR) ou 50 µg/ Kg (cepa M.ivm). A cada geração, o hospedeiro foi artificialmente infestado com 200 mg de larvas (aproximadamente 2.000 indivíduos) liberadas sobre o dorso do mesmo. Cada uma das gerações obtidas das cepas ZOR (n=5) e M.ivm (n=3) foi avaliada quanto à resistência a ivermectina pelo TIL.

Para comparação dos parâmetros biológicos (peso das fêmeas, peso dos ovos e IFER) entre diferentes gerações das cepas, foram amostradas teleóginas das cepas Mozo (n=21), ZOR (F2) (n=70), ZOR (F3) (n=38), ZOR (F4) (n=24) M.ivm (F0) (n=25), M.ivm (F2) (n=53). As teleóginas foram lavadas com água e secas em papel toalha. Cada fêmea foi pesada e em seguida colocada com a parte anterior voltada para o fundo, em um tubo de 1,5 mL previamente pesado, visando a coleta dos ovos

de maneira prática. Os tubos foram fechados com uma tampa de algodão para permitir a passagem de ar e umidade e foram incubados por 14 dias em estufa B.O.D. à uma temperatura de 27-28 ^{o}C e umidade relativa de 80-90%. Após os 14 dias, os tubos foram novamente pesados. O peso dos ovos foi obtido através da diferença entre o peso do tubo com os ovos e o tubo vazio. O IFER foi calculado como anteriormente (**Item 2.4**). As posturas das cepas Mozo e ZOR foram incubadas como descrito acima para a obtenção de larvas. A progênie de cada fêmea foi submetida a um TIL (**Item 2.2.3)** de dose única, com ivermectina 100 ppm e os dados de mortalidade anotados.

As médias dos pesos das fêmeas, pesos dos ovos, IFER e mortalidade de progênies de cada cepa foram comparadas entre si através do programa de análise estatística Stat Plus:mac 2009 (ANALYSTSOFT, 2009), utilizando-se o teste *t* de Student com variâncias desiguais (α = 0,05).

2.7 Bioensaios com inibidores enzimáticos

Foram conduzidos bioensaios com larvas (TIL) de *R. (B.) microplus* utilizando inibidores enzimáticos específicos para esterases (trifenilfosfato - TPP), citocromo P450 oxidases (butóxido de piperonila - PBO) e glutationa S-transferases (dietilmaleato - DEM). Inicialmente, foram determinadas as concentrações máximas de inibidores que não resultaram em mortalidade da cepa Mozo. Estas concentrações foram PBO 0,0025%; TPP 0,01% e DEM 0,05%.

Após esta etapa inicial, foram realizados ensaios (em triplicata), com cada um dos inibidores para determinar o efeito na cepa suscetível Mozo e na cepa resistente ZOR (F3). Usando TIL, foram utilizadas as mesmas concentrações de ivermectina descritas no **item 2.2.3** diluídas em etanol 10% para evitar a precipitação dos inibidores. O grupo controle foi testado somente com ivermectina e outros três grupos com ivermectina adicionada de cada um dos inibidores (TPP, PBO e DEM).

Para a análise dos bioensaios com inibidores enzimáticos foi utilizado o programa Polo Plus (LEORA SOFTWARE, 2004). Os valores de CL_{50} (IC95%) da ivermectina obtidos na presença e ausência dos inibidores foram comparados para obtenção dos Fatores de Sinergismo (FS) através da seguinte equação:

$$FS = \frac{CL_{50}(IC95\%) \text{ sem inibidor}}{CL_{50}(IC95\%) \text{ com inibidor}}$$

Foram considerados estatisticamente diferentes somente os valores de FS que não apresentaram sobreposição dos intervalos de confiança de 95%. Os gráficos demonstrando o fator de sinergismo (FS) e fator resistência (FR) em presença de inibidores foram produzidos através do programa Microsoft Excel ® para Mac (MICROSOFT, 2004).

2.8 Clonagem e caracterização parcial do gene codificador do canal de cloro controlado pelo glutamato (GluCl)

2.8.1 Análise *in silico*

A partir da base de dados TIGR[4] foi identificado um trecho de sequência expressa (*expressed sequence tag* - EST) de *R. (B.) microplus* (clone BEAGZ56 - GenBank id. CV456910.1, 1064 nucleotídeos). A análise desta sequência com o programa BLASTn 2.2.25 (ZHENG et al., 2000) retornou como resultado transcritos com 92% e 87% de identidade, referentes aos mRNAs GluCl1 de *Rhipicephalus sanguineus* (GenBank id. GV659518) e DrosGluCl de *Ixodes scapularis* (GenBank id. XM_002413465.1). O alinhamento destas sequências serviu de base para o desenho de oligonucleotídeos em regiões conservadas entre as três espécies de carrapato, visando a amplificação, clonagem e sequenciamento de trechos do gene GluCl de *R. (B.) microplus.* Para análise de mutações associadas a resistência a ivermectina, foi utilizado um fragmento que corresponde, em sua grande parte, ao domínio transmembrana do GluCl, região determinada como fundamental para a ligação da ivermectina (LYNAGH; LYNCH, 2010) e na qual estão descritas mutações associadas a resistência a lactonas macrocíclicas em outras espécies de artrópodes (CULLY et al., 1996; KWON et al., 2010) (**Figura 1**).

[4] http://compbio.dfci.harvard.edu/cgi-bin/tgi/gimain.pl?gudb=b_microplus

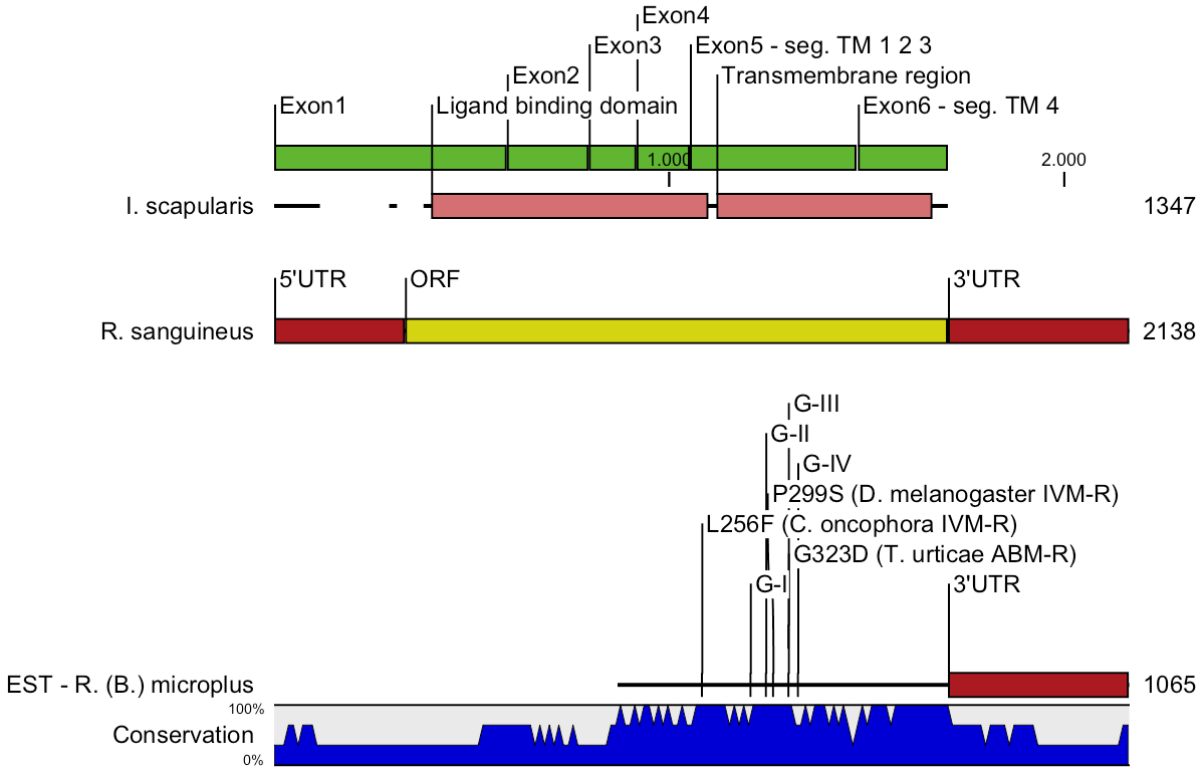


Figura 1. Alinhamento de sequências de RNA mensageiro dos genes codificadores do Canal de Cloro Controlado por Glutamato descritas para *Ixodes scapularis, Rhipicephalus sanguineus* e trecho de sequência transcrita (EST) de *Rhipicephalus (B.) microplus*. Anotações: verde: exons; salmão: domínios de ligação e transmembranar, conservados na superfamilia de genes de canais controlados por ligantes; vermelho: 3' e 5' UTR, regiões não traduzidas 5' e 3'; amarelo: ORF: *open reading frame*; G-I, G-II, G-III e G-IV: códons para Glicina; P299S: posição de mutação em *Drosophila melanogaster* resistente a ivermectina; L256F posição de mutação em *Cooperia oncophora* resistente a ivermectina; G323D posição de mutação em *Tetranychus urticae* resistente a abamectina.

2.8.2 Amostras

Fêmeas pós-postura, conservadas em isopropanol 100% à –20 ^{o}C, da cepa suscetível Mozo (n=10) sem exposição à ivermectina e da cepa ZOR-F4 (n=6) sobreviventes ao tratamento do hospedeiro com a droga.

Larvas sobreviventes da cepa ZOR (F5), após o tratamento por imersão em ivermectina (100ppm).

Larvas mortas da cepa Mozo, após o tratamento por imersão em ivermectina (100ppm).

2.8.3 Extração de material genômico

As fêmeas adultas de ambas cepas foram submetidas à extração do DNA genômico com tampão de NaCl saturado (ALJANABI; MARTINEZ, 1997). Os *pools* com 50 indivíduos (larvas) foram submetidas à extração do RNA com Trizol ® (Invitrogen) segundo as recomendações do fabricante. Para obtenção do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA extraído, foi utilizado o kit para transcrição reversa *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* ® (Applied Biosystems).

2.8.4 Amplificação de material genômico

Os trechos do GluCl de adultas das cepas Mozo e ZOR-F4 foram amplificados a partir de DNA genômico (DNAg). Para tanto, foram utilizados 2 oligonucleotídeos, desenhados a partir da sequência da EST-GluCl de *R. (B.) microplus*: 5F (5' – CCA GAT CTA CAT CCC GTG CT – 3'); 5R (5' – TCC CAT TTC CTC TGC TTC TG – 3'). O trecho de cDNA proveniente dos *pools* de larvas das cepas Mozo, ZOR e das populações de campo, foram amplificados com 2 oligonucleotídeos: 6R (5' – CGG AAG AGG TAG GTT GTC CA – 3') desenhado a partir da sequência EST-GluCl de *R. (B.) microplus*; e Rs1F (5' – TAC ACA GTG CAA ATG ACG TTC – 3') desenhado a partir da sequência GluCl1 de *R. sanguineus*.

As condições de amplificação foram padronizadas e as reações em cadeia por polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*) foram conduzidas em um termociclador GeneAmp PCR system 2700 (Applied Biosystems). A mistura de reação de 50 µL foi preparada com 20mM Tris-HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 1 unidade

de Elongase (Invitrogen), 200 µM de cada dNTP, 1,5 mM de $MgCl_2$ 1 µM de cada oligonucleotídeo e 0,1 µg de DNAg ou cDNA. Apos um período de desnaturação inicial de 1 minuto a 94 ^oC, 35 ciclos se seguiram, cada um incluindo 30 s a 94 ^oC, 30 s a 58 ^oC e 1 min e 30 s a 68^oC, com uma etapa final de 10 min a 68 ^oC para extensão final no amplificado.

2.8.5 Clonagem e sequenciamento

Os produtos de PCR foram purificados para remoção de sais e restos e material nucléico e clonados em um plasmídeo vetor pJET1.2 (Fermentas). Estes vetores foram utilizados na transformação de células eletrocompetentes de *Escherichia coli*, que foram plaqueadas em meio LB ágar com ampicilina sódica (50 µg / ml). Após incubação, os plasmídeos foram isolados (SAMBROOK et al., 1989) e os clones (n=5) de cada amostra foram sequenciados utilizando os oligonuclotídeos pJET1.2F (5' – CGA CTC ACT ATA GGG AGA GCG GC – 3') e pJET1.2R (5' – AAG AAC ATC GAT TTT CCA TGG CAG – 3'. As reações foram conduzidas em um sequenciador automatizado ABI Prism 3.700 (Applied Biosystems).

2.8.6 Análise de sequências

As sequências obtidas de DNAg e cDNA de trechos do GluCl das amostras foram comparadas entre si e às sequências de EST-GluCl de *R. (B.) microplus* e GluCl1 de *R. sanguineus* através do alinhamento com o algoritmo Clustal no programa CLC Main Workbench (CLC BIO, 2010).

3 RESULTADOS

3.1 Bioensaios *in vitro* com ivermectina

3.1.1 Teste de imersão de adultos (TIA)

Os valores calculados das concentrações letais 50 (CL_{50}) para ivermectina de cada uma das variáveis estudadas estão apresentados na **Tabela 1**. Em todos os períodos de imersão, a mortalidade, o peso dos ovos (PO) e o índice de fertilidade (IFER) apresentaram intervalos estreitos de intervalo de confiança de 95% (IC95%). Os maiores coeficientes de regressão foram obtidos para as variáveis PO e IFER, não havendo diferença significativa na CL_{50} determinada para estas duas variáveis. As CL_{50} determinadas para a mortalidade e IFEC apresentaram-se estatisticamente diferentes daquelas calculadas para as variáveis PO e IFER. O índice de fecundidade (IFEC) apresentou maior variação de resultados com amplo IC95%. A toxicidade da ivermectina foi maior conforme o aumento do tempo de imersão para a variável mortalidade. Para as variáveis IFER, PO e IFEC, a toxicidade da ivermectina foi maior no tempo de 5 minutos em relação ao de 1 minuto. Não foram observadas diferenças entre estas variáveis entre os tempos de imersão de 5 e 30 minutos (**Tabela 1**). A **Figura 2** representa a regressão dose-resposta para cada uma das variáveis, obtida a partir dos TIA conduzidos com a cepa Mozo, em cada tempo de imersão testado.

A **Figura 3** representa a correlação entre os pesos dos ovos tomados no sétimo e no décimo quarto dias de postura de todos os grupos experimentais da cepa Mozo. Houve alta associação positiva entre as duas variáveis, indicado pelo coeficiente de correlação (r) de 0,9741. Desta maneira, em se tratando de um parâmetro mais precoce, optou-se pela utilização do peso dos ovos tomado no sétimo dia no cálculo do IFER e IFEC.

Tabela 1 – Comparação da toxicidade da ivermectina, determinada a partir do teste de imersão de adultos com diferentes tempos de imersão para a cepa Mozo de *Rhipicephalus (B.) microplus*.

Tempo (min)	N	n	Variável	Slope ±EP	*t*	R^2	CL_{50}% (IC95%)
1	20	168	Mort	8,71 ±0,48	17,98	0,679	0,089 (0,069 - 0,115)
			PO7d	– 0,05 ±0,002	– 21,59	0,749	0,023 (0,015 - 0,034)
			IFER	– 0,02 ±0,001	– 21,35	0,748	0,023 (0,015 - 0,035)
			IFEC	– 0,015 ±0,001	– 16,29	0,634	0,008 (0,007 - 0,010)
5	8	64	Mort	11,35 ±1,35	8,37	0,659	0,006 (0,004 - 0,009)
			PO7d	– 0,028 ±0,003	– 9,14	0,706	0,009 (0,003 - 0,029)
			IFER	– 0,01 ±0,001	– 9,43	0,719	0,009 (0,003 - 0,029)
			IFEC	– 0,002 ±0,0003	– 6,80	0,574	0,0037 (0,0035 - 0,0038)
30	4	35	Mort	10,25 ±0,92	11,04	0,675	0,0007 (0,0005 - 0,0008)
			Po7d	– 0,018 ±0,001	– 13,04	0,745	0,0102 (0,0052 - 0,0203)
			IFER	– 0,007 ±0,005	– 13,08	0,746	0,0102 (0,0052 - 0,0203)
			IFEC	– 0,004 ±0,0004	– 11,37	0,686	0,0041 (0,0031 - 0,0056)

(min): tempo em minutos; Mort: mortalidade; PO7d: peso dos ovos no sétimo dia; IFER: índice de fertilidade; IFEC: índice de fecundidade; EP: erro padrão; *t*: teste de Student; R^2: coeficiente de regressão; CL: concentração letal; IC: intervalo de confiança.

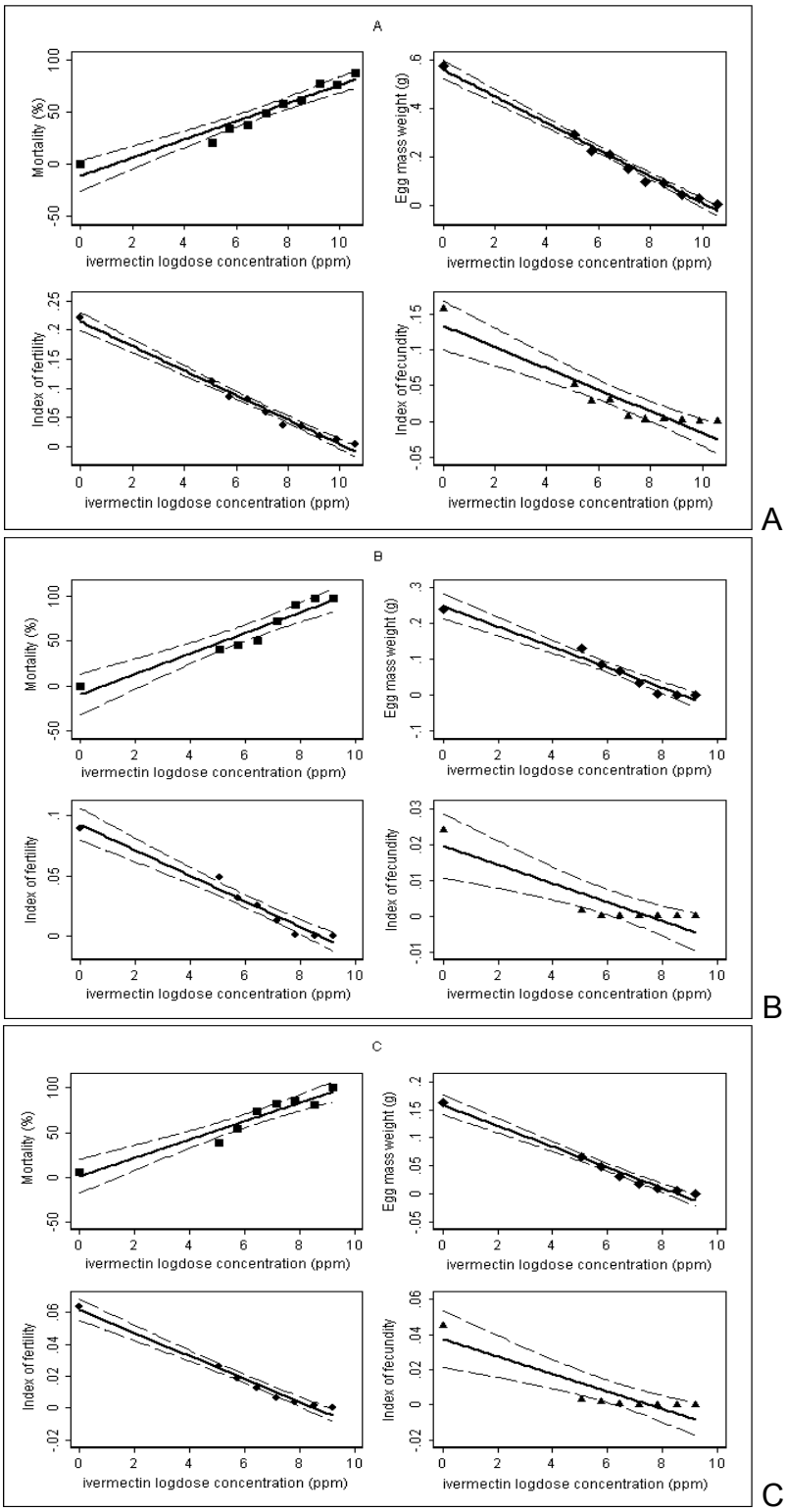


Figura 2. Atividade comparativa da ivermectina em adultos de *Rhipicephalus (B.) microplus* (cepa Mozo). Curvas de concentração versus mortalidade, peso dos ovos, índice de fertilidade e índice de fecundidade, com diferentes tempos de imersão. Linhas tracejadas representam os intervalos de confiança de 95%. A: imersão por 1 minutos; B. imersão por 5 minutos; C: imersão por 30 minutos.

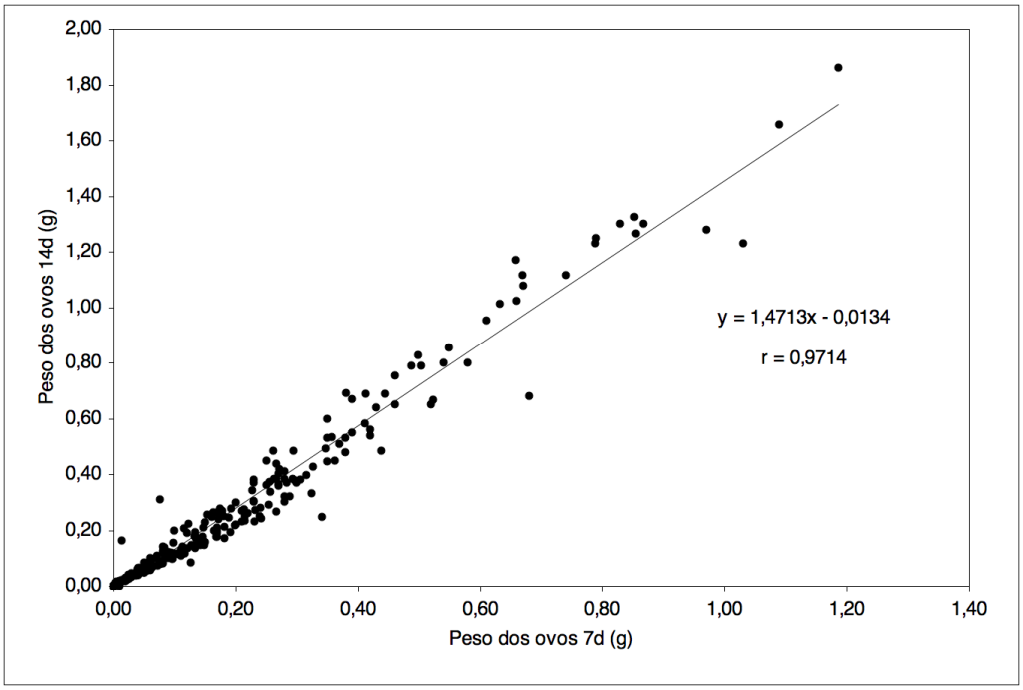


Figura 3. Relação entre os pesos dos ovos mensurados no sétimo e no décimo quarto dias para a cepa Mozo de *Rhipicephalus (B.) microplus*.

3.1.2 Testes com larvas (TIL e TPL)

Os resultados dos testes de imersão e de pacote de larvas conduzidos com a cepa Mozo estão representados na **Tabela 2** e ilustrados na **Figura 4**. Os valores dos coeficientes de regressão (R^2) para o TPL e o TIL foram respectivamente 0,911 e 0,799. A CL_{50} da ivermectina determinada com o TPL (1236,63) foi maior do que a obtida com o TIL (15,59). Testes conduzidos em dias diferentes não influenciaram os resultados (valor de *p* TPL = 0,415; valor de *p* TIL = 0,881), com baixa variância das CL_{50} quando determinadas pelo TPL (*v* = 0,0007) e pelo TIL (*v* = 0,0008).

Tabela 2 – Toxicidade da ivermectina, avaliada através do teste de imersão de larvas (TIL) e teste do pacote de larvas (TPL) com a cepa Mozo de *Rhipicephalus (B.) microplus*.

Teste	N	n	R^2	*t*	Slope±EP	CL_{50}(ppm) (IC95%)
TPL	27	286	0,911	53,37	5,88±0,09	1236,63 (1204,42 - 1268,11)*
TIL	96	957	0,799	37,86	3,57±0,02	15,59 (15,10 - 16,11)

N: número de ensaios; n: número de observações; R^2: valor do coeficiente de regressão; *t*: teste de Student; EP: erro padrão; CL: concentração letal; IC: intervalo de confiança; ppm: partes por milhão do ingrediente ativo.

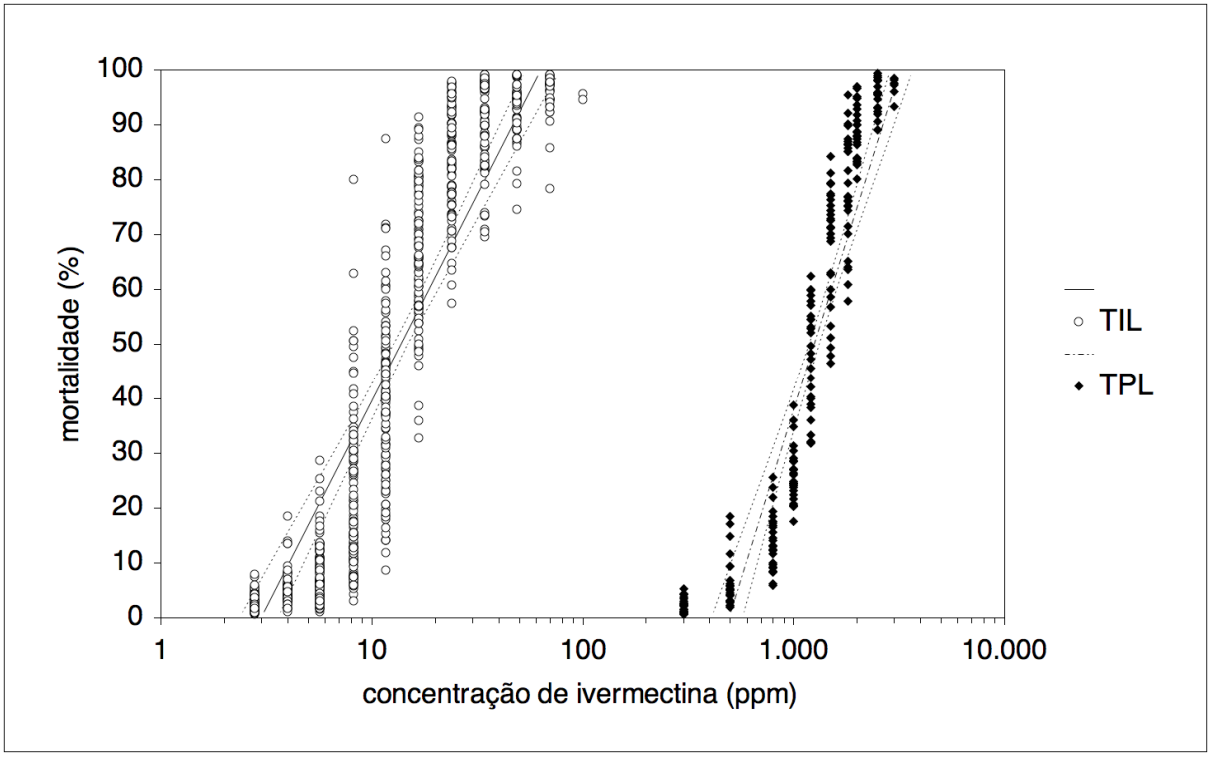


Figura 4. Curvas concentração-mortalidade para ivermectina, obtidas com o teste de imersão de larvas (TIL) e o teste de pacote de larvas (TPL) com a cepa Mozo de *Rhipicephalus (B.) microplus*. Linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança de 95%.

3.1.3 Validação dos ensaios com larvas

Os valores de CL_{50} determinados para a cepa ZOR utilizando-se do teste de imersão de larvas (TIL) ou teste do pacote de larvas (TPL) foram significativamente maiores do que os determinados para a cepa Mozo. Valores de *slope* bem diferenciados não foram obtidos com o TPL. Os fatores de resistência (FR) da cepa ZOR determinados pelo TIL e TPL foram respectivamente 6,73 e 1,49.

Os valores de CL_{50} e FR determinados para cada teste com seus respectivos IC95% para a cepa ZOR estão demonstrados na **Tabela 3**. As curvas concentração-mortalidade obtidas com cada um dos ensaios de validação encontram-se ilustradas nas **Figura 5 e 6**.

Tabela 3 – Concentrações letais e fatores de resistência a ivermectina determinados através de testes de imersão de larvas e testes de pacote de larvas para a cepa resistente ZOR (geração F4) e cepa referência suscetível Mozo de *Rhipicephalus (B.) microplus*.

Teste	Cepa	*N*	R^2	Slope ±EP	CL_{50} (ppm)* (IC95%)	FR (IC95%)
TIL	ZOR	6356	0,867	1,21±0,03	94,82* (80,14 - 113,65)	6,73 (6,31 - 7,31)
	Mozo	4976	0,861	4,09±0,11	13,96 (13,17 - 14,82)	-
TPL	ZOR	9142	0,905	3,49±0,07	2326,96* (2247,47 - 2411,37)	1,49 (1,44 - 1,54)
	Mozo	4249	0,770	4,24±0,13	1558,57 (1454,82 - 1677,35)	-

TIL: teste de imersão de larvas; TPL: teste do pacote de larvas; n: número de larvas; R^2: valor da regressão; EP: erro padrão; CL: concentração letal; ppm: partes por milhão de ingrediente ativo; FR: fator de resistência, IC: intervalo de confiança; * valores estatisticamente diferentes da cepa Mozo ($p<0.05$).

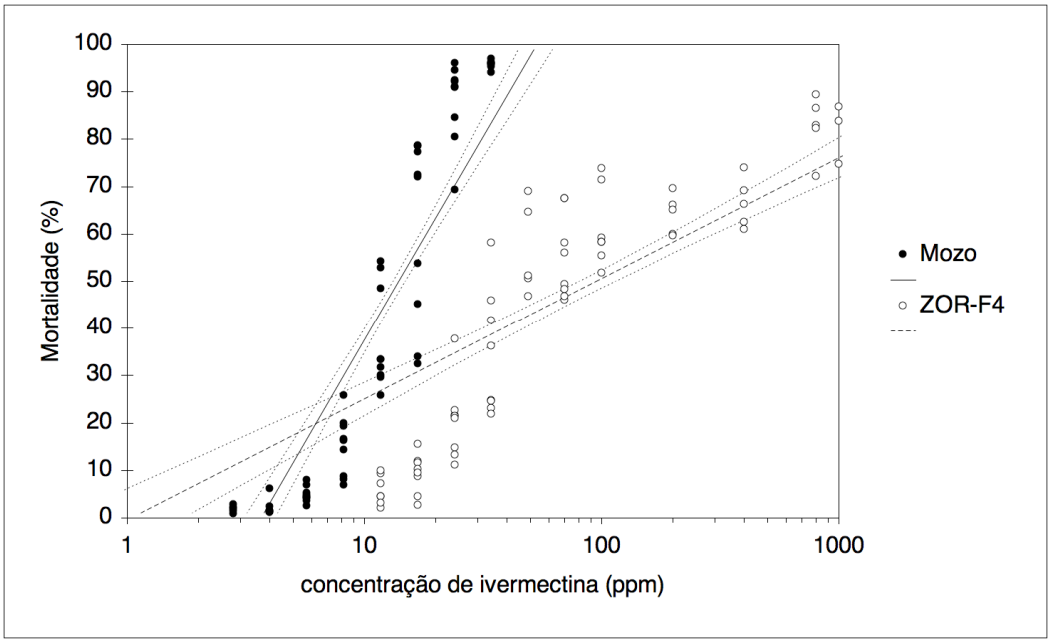


Figura 5. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partir do TIL com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* das cepas Mozo (suscetível) e ZOR (resistente a ivermectina, geração F4). n = 3 ensaios em triplicata. Linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança de 95%.

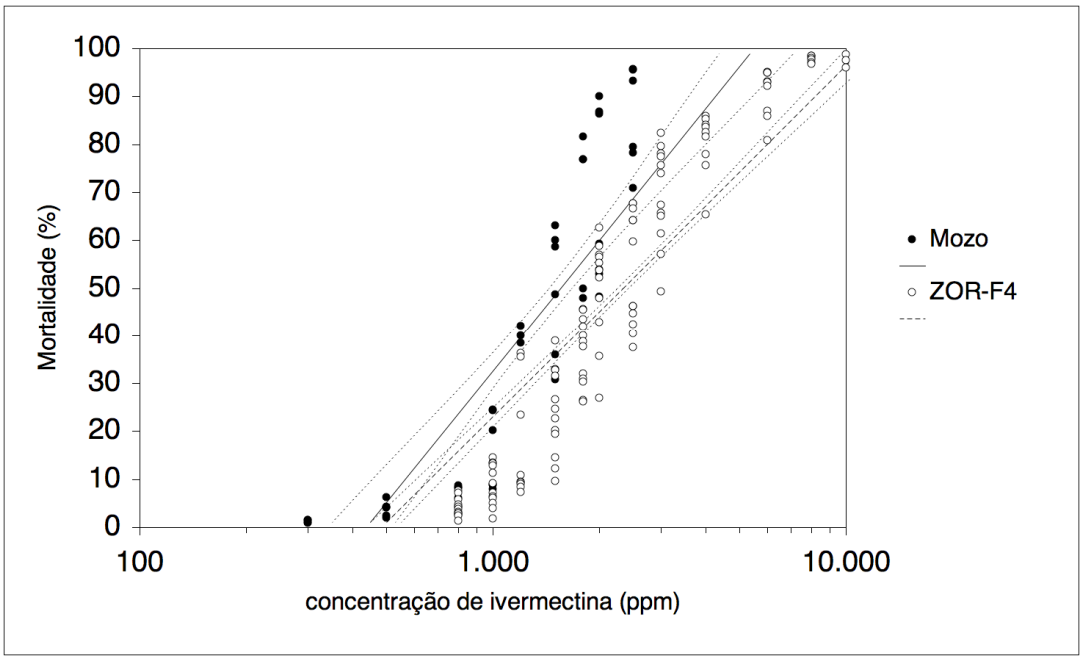


Figura 6. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partir do TPL com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* das cepas Mozo (suscetível) e ZOR (resistente a ivermectina, geração F4). n = 3 ensaios em triplicata. Linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança de 95%.

3.2 Diagnóstico de resistência a ivermectina no campo

3.2.1 Testes de imersão de larvas

As concentrações letais para ivermectina obtidas através do TIL estão dispostas nas **Tabelas 4** e **5**. Entre as populações sem exposição prévia a lactonas macrocíclicas (LMs) (**Tabela 4**), todas demonstraram CL_{50} estatisticamente iguais as das cepas Mozo ou POA. Os valores de FR variaram entre 0,77 (BDT1) e 1,01 (Prat) e todas as populações foram consideradas suscetíveis a ivermectina.

Entre as populações com exposição prévia a LMs (**tabela 5**) somente a população Lar não apresentou CL_{50} com diferença estatística em relação à cepa Mozo. Todas as demais populações apresentaram CL_{50} significativamente maiores do que as calculadas para a cepa Mozo. As populações CAN, BON, JUA, StoA, PCE, FAR, POR e SGA se mostraram com resistência incipiente com FR calculados entre 1,39 (SGA) e 1,95 (POR). As populações AGU, Fer, CAV, Sma, FIG, VIS, APO, ANT, LAC e JEQ foram resistentes, com FR variando entre 2,25 (AGU) e 4,94 (ANT). As curvas concentração-mortalidade para as populações avaliadas pelo TIL estão apresentadas nas **Figuras 7 e 8**.

3.2.3 Testes do pacote de larvas

A **Tabela 6** apresenta as concentrações letais e fatores de resistência a ivermectina determinados com o TPL para a cepa Mozo e oito populações com histórico de exposição a LMs. Através desta técnica, nenhuma das populações testadas apresentaram FR maiores que 2. Cinco populações (APTA, CAN, FIG, StoA, VIS e APO) se apresentaram com resistência incipiente (FR < 2) e a população PIQ foi suscetível. As curvas concentração-mortalidade das populações testadas com o TPL estão ilustradas na **Figura 9.**

Tabela 4 – Testes de imersão de larvas com ivermectina, conduzidos com *Rhipicephalus (B.) microplus* oriundos de populações de campo sem exposição prévia a lactonas macrocíclicas.

População	n	Slope±E.P.	χ^2 (gl)	CL_{50} (IC95%) (ppm)	FR (IC95%)
BDT1	2497	2,34±0,07	24,9 (31)	18,20 (16,59 - 19,98)	0,77 (0,71 - 0,83)
BDT2	2006	2,71±0,09	52,9 (31)	22,17 (19,58 - 25,17)	0,94 (0,87 - 1,02)
BDT3	918	2,58±0,13	31,6 (30)	22,91 (18,24 - 28,84)	0,97 (0,87 - 1,08)
Mozo	2333	4,09±0,19	57,2 (30)	23,51 (22,32 - 24,70)	-
TRE	2097	3,05±0,12	71,8 (19)	13,09 (11,69 - 14,78)	0,94 (0,88 - 1)
Mozo	1728	6,61±0,48	17,8 (17)	13,95 (13,35 - 14,63)	-
JS	3278	3,39±0,10	44 (31)	11,87 (11,27 - 12,51)	0,90 (0,85 - 0,96)
Mozo	3189	4,05±0,12	112,9 (30)	13,09 (12,12 - 14,16)	-
Prat	2528	4,17±0,14	57,3 (22)	14,97 (14,02 - 16,03)	1,01 (0,96 - 1,07)
Mozo	2722	4,83±0,20	48,6 (22)	14,77 (13,90 - 15,64)	-
SLU	2981	2,138 (0,11)	45,3 (21)	20,22 (17,08 - 24,78)	1,11 (0,99 - 1,25)
POA	3026	3,44 (0,1)	32,1 (20)	18,14 (16,13 - 20,48)	-
StaP	1858	2,69±0,10	27,1 (22)	18,92 (17,49 - 20,47)	0,87 (0,79 - 0,96)
Mozo	1495	3,23±0,13	23,7 (21)	21,54 (20 - 23,25)	-

Mozo: cepa suscetível controle. n: número de larvas; E.P.: erro padrão; χ^2: valor do qui-quadrado; gl: graus de liberdade; CL: concentração letal; IC: intervalo de confiança; ppm: partes por milhão; FR: fator de resistência.

Tabela 5 – Testes de imersão de larvas com ivermectina, conduzidos com *Rhipicephalus (B.) microplus* oriundos de populações de campo com exposição prévia a lactonas macrocíclicas. (continua)

População	n	Slope±E.P.	χ^2(gl)	CL_{50} (IC95%) (ppm)	FR (IC95%)
AGU	6023	2,03±0,05	189,7 (31)	38,27 (33,78 - 43,76)*	2,25 (2,08 - 2,44)
Mozo	2216	2,62±0,09	113,4 (29)	16,95 (14,93 - 19,20)	-
CAN	2799	1,58±0,06	447 (22)	21,84 (15,26 - 33,49)*	1,74 (1,59 - 1,89)
Mozo	2434	5,60±0,24	30,7 (21)	12,55 (12,04 - 13,05)	-
Fer	3450	1,99±0,08	182,8 (31)	35,78 (30,01 - 43,88)*	2,45 (2,25 - 2,67)
Lar	1535	3,00±0,13	65,13 (31)	11,67 (10,49 - 12,95)	0,80 (0,73 - 0,87)
Mozo	3244	3,68±0,10	39,76 (31)	14,55 (13,86 - 15,29)	-
Sma	2626	2,53±0,09	50,66 (22)	35,34 (31,99 - 39,49)*	2,34 (2,17 - 2,52)
BON	2348	2,88±0,11	43,93 (22)	25,85 (23,80 - 28,30)*	1,71 (1,59 - 1,83)
Mozo	2030	5,12±0,20	39,81 (21)	15,08 (14,29 - 15,91)	-
FIG	2168	2,51±0,10	22,7 (31)	47,49 (44,37 - 51,03)*	4,48 (4,11 - 4,8)
StoA	2218	2,55±0,08	24,8 (31)	19,69 (18,52 - 20,93)*	1,86 (1,71 - 2)
VIS	2289	1,68±0,07	27,3 (31)	48,90 (44,25 - 54,59)*	4,62 (4,11 - 5,19)
Mozo	2365	3,94±0,14	16,2 (30)	10,57 (10,07 - 11,10)	-

Mozo: cepa suscetível controle. n: número de larvas; E.P.: erro padrão; χ^2: valor do qui-quadrado; gl: graus de liberdade; CL: concentração letal; IC: intervalo de confiança; ppm: partes por milhão; FR: fator de resistência; * Valores estatisticamente diferentes da cepa Mozo suscetível ($p < 0,05$).

Tabela 5 – Testes de imersão de larvas com ivermectina, conduzidos com *Rhipicephalus (B.) microplus* oriundos de populações de campo com exposição prévia a lactonas macrocíclicas. (conclusão)

População	**n**	**Slope±E.P.**	**χ^2(gl)**	**CL_{50} (IC95%) (ppm)**	**FR (IC95%)**
APO	2211	1,78±0,07	61,5 (31)	39,03 (34,44 - 44,81)*	2,98 (2,68 - 3,32)
Mozo	1810	4,45±0,22	42,2 (24)	13,06 (12,28 - 13,82)	-
ANT	2549	1,81±0,07	141,3 (31)	56,64 (46,77 - 71,95)*	4,94 (4,45 - 5,49)
Mozo	2166	4,48±0,15	122,1 (21)	11,44 (10,38 - 12,66)	-
PCE	1455	1,83±0,08	47,5 (31)	20,36 (16,98 - 24,65)*	1,42 (1,27 - 1,59)
Mozo	3267	2,86±0,10	39,6 (30)	14,29 (13,17 - 15,43)	-
FAR	2538	1,95±0,06	138,0 (31)	18,94 (16,32 - 21,99)*	1,92 (1,77 - 2,08)
POR	2000	2,11±0,07	72,31 (31)	19,26 (17,18 - 21,66)*	1,95 (1,79 - 2,12)
LAC	2571	1,77±0,07	110,6 (31)	46,81 (39,82 - 56,63)*	4,74 (4,29 - 5,23)
JEQ	2896	1,89±0,06	57,9 (31)	31,02 (28,15 - 34,32)*	3,14 (2,89 - 3,41)
Mozo	2316	4,17±0,14	48,6 (24)	9,86 (9,28 - 10,48)	-
CAV	2261	2,14±0,17	72,1 (30)	57,96 (49,01 - 68,72)*	3,2 (2,87 - 3,57)
JUA	2613	2,40±0,01	32,1 (21)	31,38 (27,07 - 37,29)*	1,73 (1,6 - 1,87)
SGA	3091	2,39±0,082	24,3 (12)	25,24 (23,49 - 27,03)*	1,39 (1,29 - 1,5)
POA	4218	3,37±0,13	68,4 (10)	18,14 (16,13 - 20,48)	-

Mozo: cepa suscetível controle. n: número de larvas; E.P.: erro padrão; χ^2: valor do qui-quadrado; gl: graus de liberdade; CL: concentração letal; IC: intervalo de confiança; ppm: partes por milhão; FR: fator de resistência; * Valores estatisticamente diferentes da cepa Mozo suscetível ($p < 0,05$).

Tabela 6 – Testes do pacote de larvas com ivermectina, conduzidos com *Rhipicephalus (B.) microplus* oriundos de populações de campo com exposição prévia a lactonas macrocíclicas (n=8).

População	**n**	**Slope±EP**	**χ^2 (gl)**	**CL_{50} (ppm)* (CI95%)**	**FR (CI95%)**
APTA	2167	3,22±0,17	25,9 (27)	1564,9* (1469,3 - 1659,9)	1,41 (1,27 - 1,56)
Mozo	2437	4,16±0,25	22,6 (21)	1110,8 (1017,6 - 1210,2)	-
CAN	2086	2,75±0,11	23,7 (26)	1587,8* (1499,8 - 1684,3)	1,45 (1,32 - 1,59)
Mozo	1837	2,97±0,25	26,8 (22)	1096,7 (1001,3 - 1193,9)	-
PIQ	3235	3,27±0,09	157,2 (27)	1282,4 (1155,7 - 1427,9)	1,17 (1,07 - 1,28)
Mozo	1837	4,12±0,25	26,8 (22)	1096,7 (1001,3 - 1193,9)	-
FIG	1744	3,96±0,21	25,9 (21)	2061,1* (1967,3 - 2169,7)	1,73 (1,64 - 1,83)
VIS	2104	4,09±0,25	23,2 (26)	2050,2* (1964,4 - 2142,8)	1,72 (1,63 - 1,81)
StoA	1911	3,73±0,20	22,5 (28)	1381,9 (1313,3 - 1448,9)	1,16 (1,10 - 1,23)
Mozo	1731	5,74±0,27	27,2 (25)	1193,4 (1147,1 - 1238,2)	-
APO	3073	5,64±0,29	52,2 (28)	1339,1* (1255,2 - 1413,8)	1,68 (1,59 - 1,78)
Mozo	1834	6,38±0,39	77,9 (15)	797,7 (714,2 - 862,6)	-

Mozo: cepa suscetível controle. n: número de larvas; E.P.: erro padrão; χ^2: valor do qui-quadrado; gl: graus de liberdade; CL: concentração letal; IC: intervalo de confiança; ppm: partes por milhão; FR: fator de resistência; * Valores estatisticamente diferentes da cepa Mozo suscetível ($p < 0,05$).

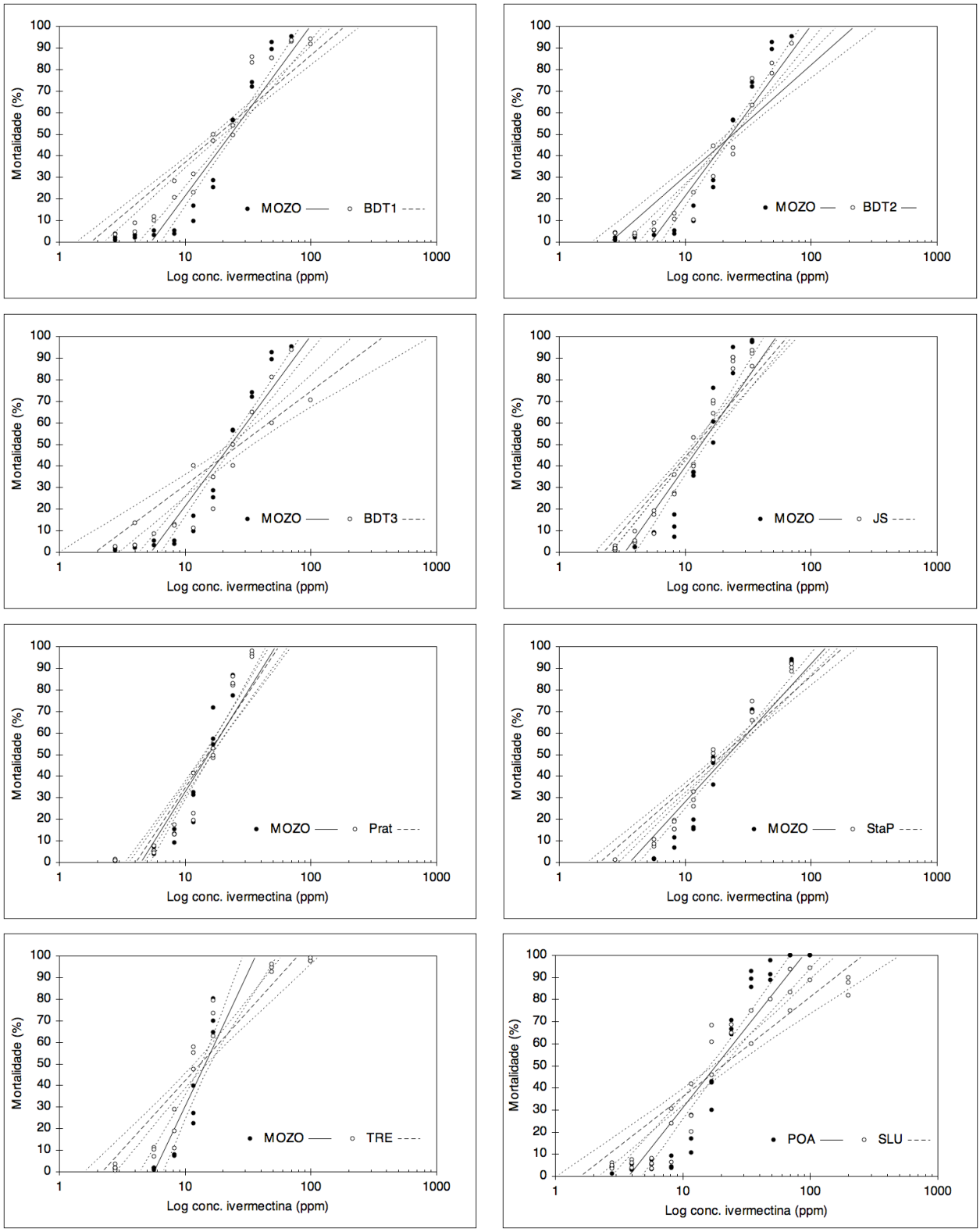


Figura 7. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partir de testes de imersão de larvas com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* da cepa Mozo e populações de campo sem exposição prévia a lactonas macrocíclicas. Linhas descontínuas representam o intervalo de confiança de 95%.

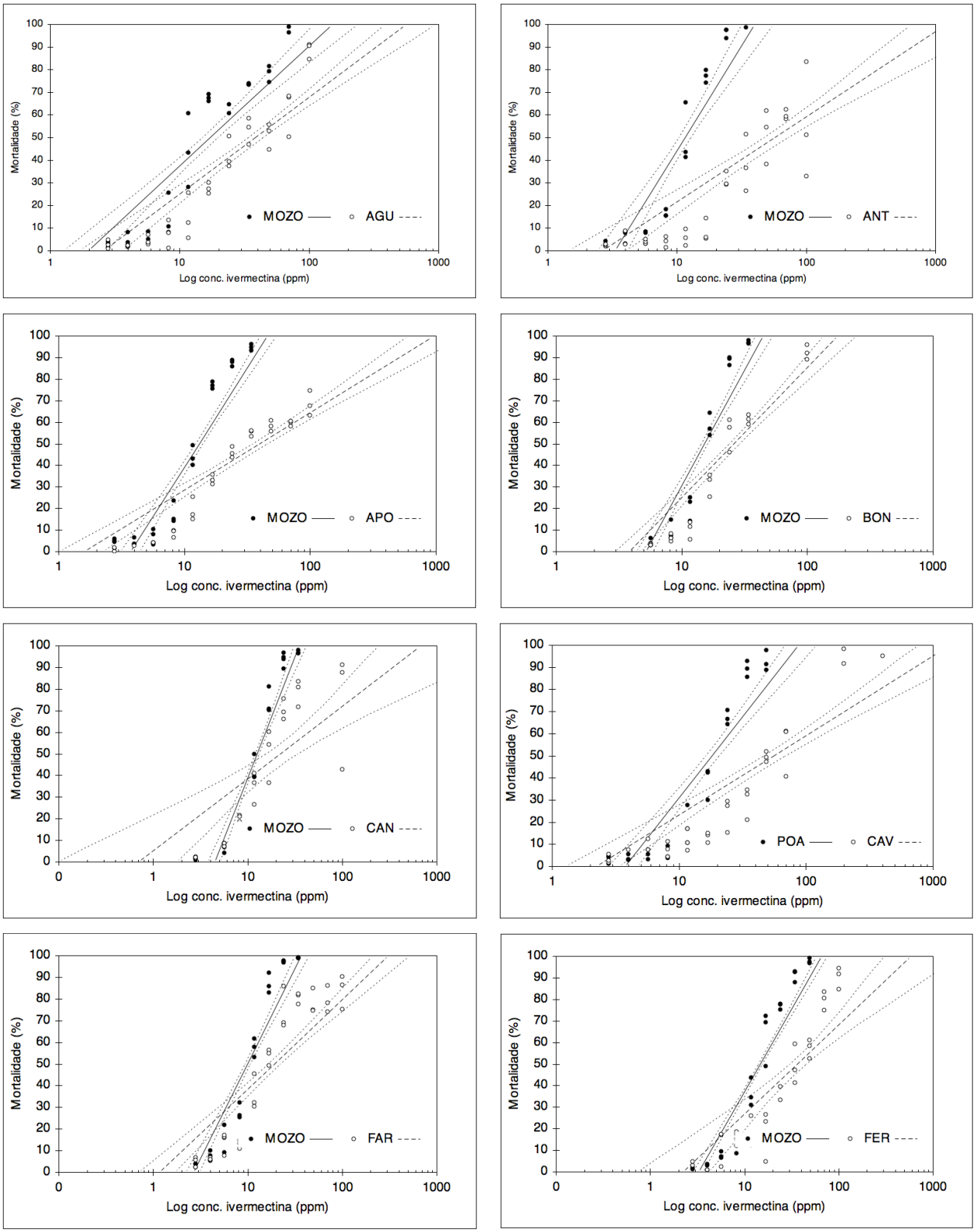


Figura 8. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partir de testes de imersão de larvas com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* da cepa Mozo e populações de campo com exposição prévia a lactonas macrocíclicas. Linhas descontínuas representam o intervalo de confiança de 95%. (continua)

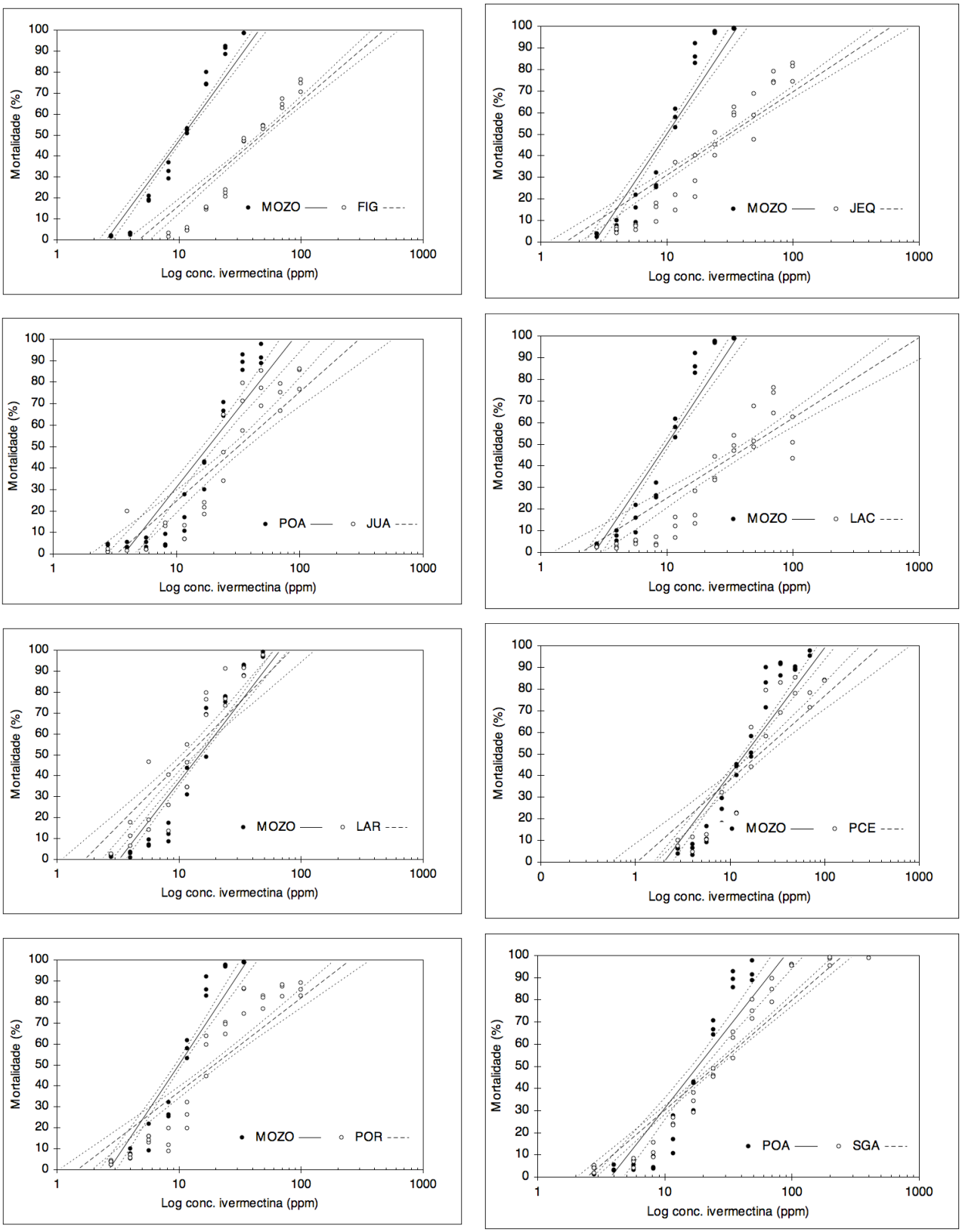


Figura 8. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partir de testes de imersão de larvas com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* da cepa Mozo e populações de campo com exposição prévia a lactonas macrocíclicas. Linhas descontínuas representam o intervalo de confiança de 95%. (continua)

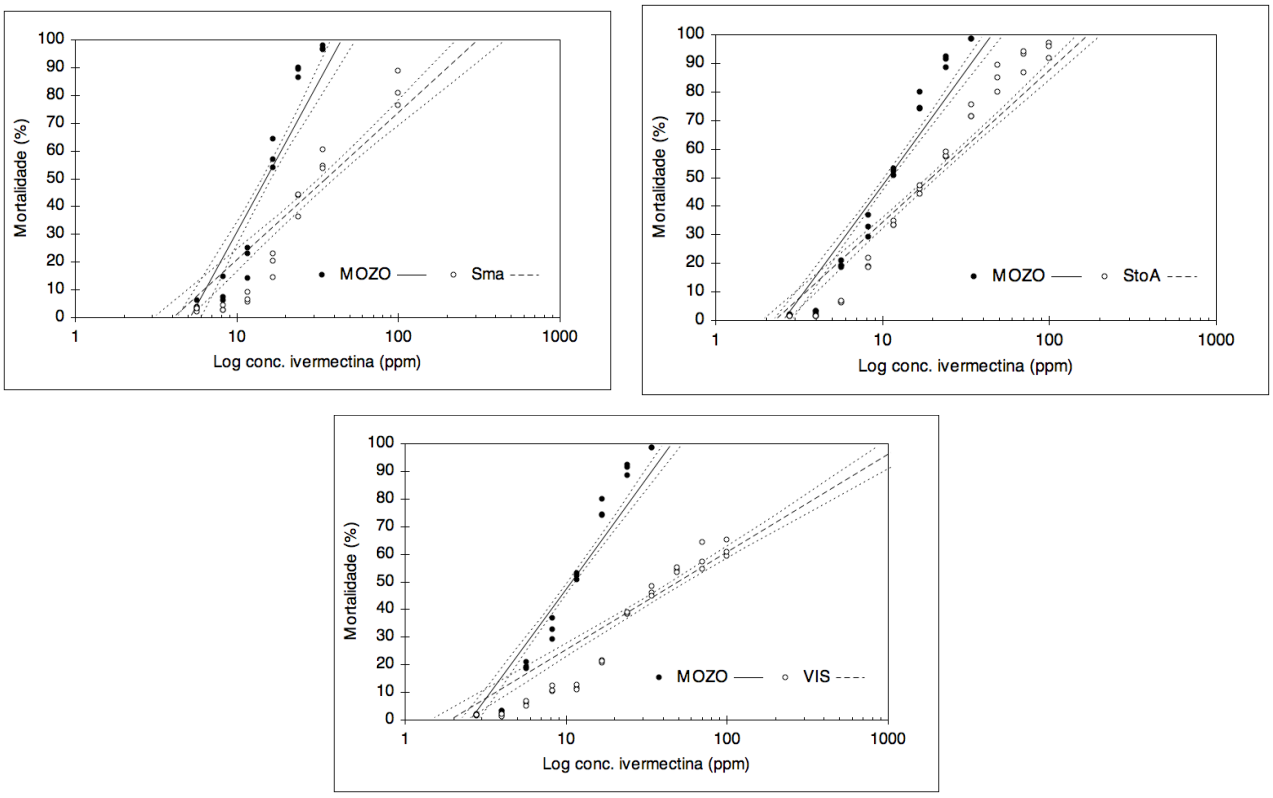


Figura 8. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partir de testes de imersão de larvas com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* da cepa Mozo e populações de campo com exposição prévia a lactonas macrocíclicas. Linhas descontínuas representam o intervalo de confiança de 95%. (conclusão)

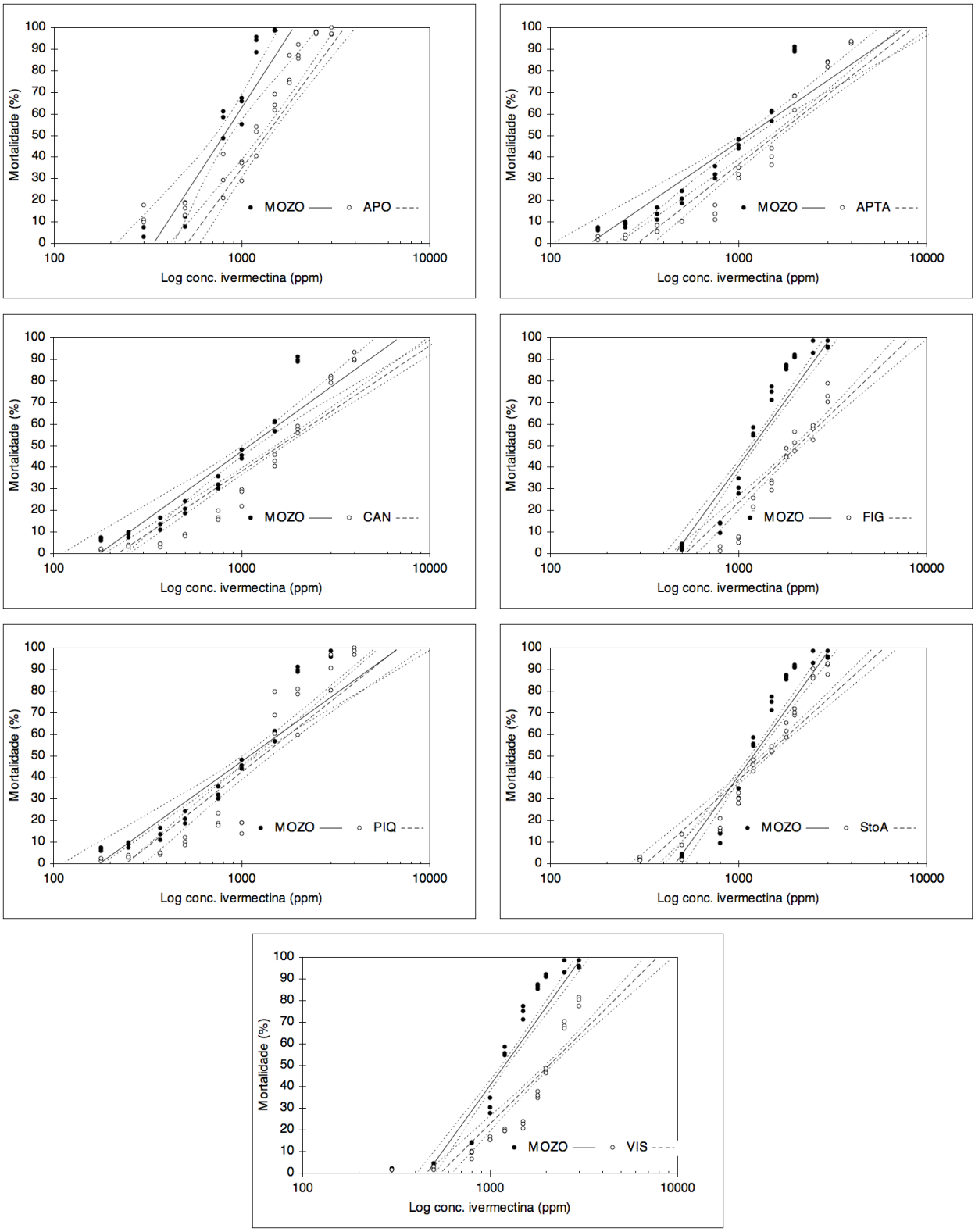


Figura 9. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partir de testes do pacote de larvas com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* da cepa Mozo e populações de campo com exposição prévia a lactonas macrocíclicas. Linhas descontínuas representam o intervalo de confiança de 95%.

3.3 Comportamento da resistência de *Rhipicephalus (B.) microplus* a ivermectina em condições naturais

3.3.1 Avaliação de resistência por bioensaios *in vitro*

Os resultados obtidos com os TIL para as populações de campo PIQ e ZOR estão dispostos na **Tabela 7** e APTA na **Tabela 8**.

As análises com a população PIQ resultaram em FR de 3,78 (julho de 2004), 1,37 (janeiro de 2005), 2,27 (outubro de 2008) e 3,37 (fevereiro de 2010). A população ZOR apresentou FR de 3,51 em janeiro e 2,33 em outubro de 2008. A população APTA apresentou FR de 1,82 (agosto de 2005) e 3,29 (setembro de 2007). Em outubro de 2008, o FR determinado para as larvas oriundas de teleóginas coletadas no dia zero do tratamento com ivermectina foi de 1,83 e o FR das larvas oriundas de teleóginas coletadas sobre os mesmos animais, 21 dias após o tratamento foi de 3,61. As curvas concentração-mortalidade para estas populações, obtidas a partir dos TIL estão apresentadas na **Figura 10.**

3.3.2 Teste de eficácia

Os resultados do teste de eficácia a campo da ivermectina estão apresentados nas **Tabelas 9** e **10**. A eficácia percentual diária máxima da ivermectina contra os estadios parasitários da população APTA foi de 85,76% (21º dia pós-tratamento) e a eficácia percentual média foi de 73,08% (entre o 3º e o 35º dias pós-tratamento) (**Tabela 9**). A inibição máxima da produção de ovos na população tratada foi de 62,22% (3º dia pós-tratamento). A inibição de produção de ovos média foi de 27,32% (entre o 3º e o 35º dias pós-tratamento) (**Tabela 10)**. A eclosão de larvas oriundas das fêmeas expostas a ivermectina foi maior ou igual a 80% em todos os dias avaliados (**Tabela 10)**.

Tabela 7 – Acompanhamento da resistência a ivermectina nas populações de campo PIQ e ZOR de *Rhipicephalus (B.) microplus* pelo teste de imersão de larvas conduzido em diferentes momentos da pesquisa.

População	**n**	**Slope±E.P.**	**χ^2(gl)**	**CL_{50} (IC95%) (ppm)**	**FR (IC95%)**
PIQ[A jul/04]	2092	2,07±0,07	52,1 (9)	16,01 (13,52 - 19,23)*	3,78 (3,47 - 4,12)
POA	1041	6,32±0,32	16,8 (11)	4,21 (3,94 - 4,51)	-
PIQ[B jan/05]	2204	3,35±0,14	23,2 (26)	7,28 (5,62 - 10,9)*	1,37 (1,09 - 1,98)
POA	1041	4,34±0,11	22,5 (28)	5,31 (5,14 - 5,49)	-
PIQ [out/08]	2546	3,76±0,15	15,68 (22)	28,85 (27,54 - 30,31)*	2,27 (2,14 - 2,41)
Mozo	2588	5,65±0,20	161,1 (21)	12,67 (11,57 - 13,90)	-
PIQ [fev/10]	2727	2,13±0,09	75,2 (15)	63,69 (53,42 - 76,54)*	3,37 (3,10 - 3,67)
POA	4218	3,37±0,13	68,4 (10)	18,85 (17,10 - 20,87)	-
ZOR [fev/08]	2148	1,44±0,06	147,7 (16)	27,48 (20,17 - 38,75)*	3,51 (3,14 - 3,93)
Mozo	1630	3,51±0,15	47,7 (14)	7,8 (6,95 - 8,76)	-
ZOR [out/08]	2089	2,20±0,09	113,9 (22)	28,68 (24,99 - 33,20)*	2,33 (2,12 - 2,54)
Mozo	2051	4,02±0,15	111,4 (20)	12,31 (11,21 - 13,54)	-

Mozo ou POA: cepas suscetíveis controle; A: dados publicados por Klafke et al., 2006; B: dados publicados por Klafke et al., 2010; n: número de larvas; E.P.: erro padrão; χ^2: valor do qui-quadrado; gl: graus de liberdade; CL: concentração letal; IC: intervalo de confiança; ppm: partes por milhão; F.R.: fator de resistência; * Valores estatisticamente diferentes da cepa Mozo suscetível ($p < 0,05$)

Tabela 8 – Acompanhamento da resistência a ivermectina na população APTA de *Rhipicephalus (B.) microplus* pelo teste de imersão de larvas conduzido em diferentes momentos da pesquisa.

População	**n**	**Slope±E.P.**	**χ^2(gl)**	**CL_{50} (IC95%) (ppm)**	**FR (IC95%)**
APTA[A ago/05]	1023	4,02±0,27	13,2 (10)	7,71 (7,08 - 8,48)*	1,82 (1,68 - 1,98)
POA	1362	6,15±0,3	63,8 (10)	4,22 (3,74 - 4,78)	-
APTA [set/07]	1183	2,51±0,13	25,3 (10)	21,2 (18,5 - 24,42)*	3,29 (2,99 - 3,63)
POA	1153	3,99±0,2	18,2 (10)	6,42 (5,90 - 7,02)	-
APTA out/08 - D0	2407	2,31±0,09	107,3 (21)	22,97 (19,89 - 26,96)*	1,83 (1,70 - 1,97)
Mozo	2434	5,60±0,24	30,7 (21)	12,55 (12,04 - 13,05)	-
APTA out/08 - D21	2439	1,82±0,08	61,3 (22)	56,94 (47,46 - 71,5)*	3,61 (3,2 - 4,08)
Mozo	2241	4,54±0,17	35,4 (21)	15,73 (13,28 - 18,85)	-

Mozo ou POA: cepas suscetíveis controle. A: dados obtidos pelo autor e apresentados em dissertação de mestrado (KLAFKE, 2006); n: número de larvas; E.P.: erro padrão; χ^2: valor do qui-quadrado; gl: graus de liberdade; CL: concentração letal; IC: intervalo de confiança; ppm: partes por milhão; FR: fator de resistência; * Valores estatisticamente diferentes da cepa Mozo suscetível (p < 0,05)

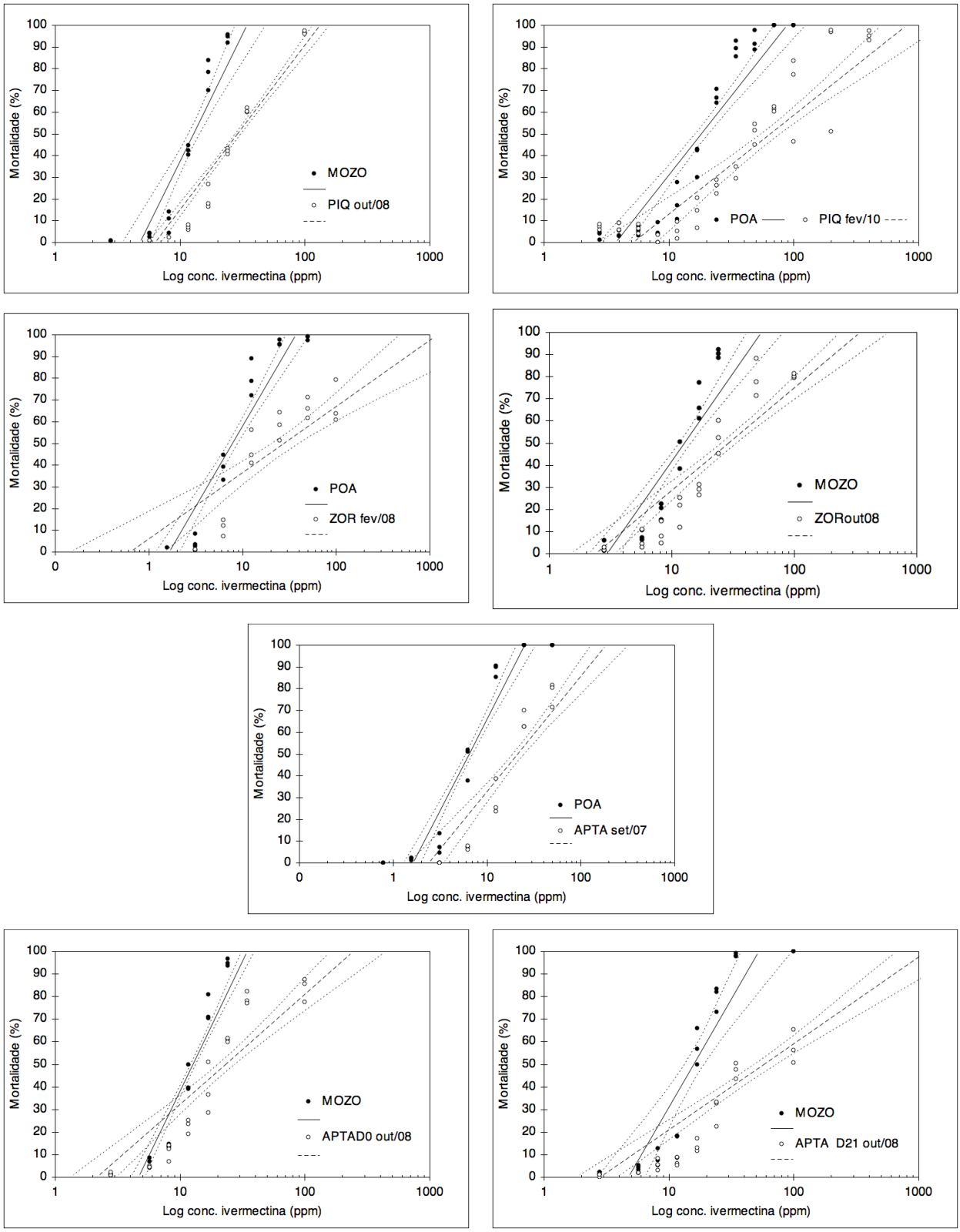


Figura 10. Curvas concentração-mortalidade determinadas a partir de testes de imersão de larvas com ivermectina para *Rhipicephalus (B.) microplus* da cepa Mozo ou POA das populações de campo PIQ, ZOR e APTA, em diferentes momentos da pesquisa. Linhas descontínuas representam o intervalo de confiança de 95%.

Tabela 9 – Contagem diária média de fêmeas *Rhipicephalus (B.) microplus* da população APTA, em bovinos não tratados e tratados com ivermectina e sua eficácia diária.

Dia	Média Contagem*/Grupo		Eficácia (%) diária
	Controle	Ivermectina 1%	
0	32,96 [a]	30,87 [a]	
3	29,00 [a]	6,66 [b]	75,48
7	28,68 [a]	8,33 [b]	68,99
14	33,03 [a]	11,90 [b]	61,53
21	17,70 [a]	2,36 [b]	85,76
28	22,60 [a]	5,16 [b]	75,62
35	27,15 [a]	26,08 [a]	0
Média (dias 3 a 35)	**25,60 [a]**	**6,04 [b]**	**73,08**

* média geométrica das contagens de carrapatos; a, b: letras distintas na mesma linha remetem a médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student.

Tabela 10 – Inibição de postura e eclosão de larvas de *Rhipicephalus (B.) microplus* da população APTA exposta a ivermectina, coletadas de bovinos submetidos ao teste de campo.

Dia	Grupos	Peso (g)		Inibição de Postura (%)	Eclosão (%)	Redução de eclosão (%)
		Fêmeas	Ovos			
3	Controle	2,060	0,757		90	
	IVM	1,002	0,286	62,22	80	11
7	Controle	1,185	0,390		100	
	IVM	0,916	0,359	29,61	95	5
14	Controle	1,595	0,669		95	
	IVM	1,227	0,514	23,17	90	5
21	Controle	1,534	0,698		90	
	IVM	1,173	0,477	31,66	80	11
28	Controle	1,672	0,692		95	
	IVM	1,639	0,723	-4,48	80	16
35	Controle	2,167	0,954		100	
	IVM	2,515	1,179	-16,06	100	0
Médias*	**Controle**	**1,669**	**0,671[a]**		**94,91[a]**	
	IVM	**1,326**	**0,527[b]**	**27,32**	**87,14[a]**	**8,92**

* média geométrica dos pesos dos carrapatos e da massa de ovos de cada grupo considerando todos os dias de coleta; IVM: grupo de bovinos tratados com ivermectina 1% a 200 µg/ Kg de peso vivo; a, b: letras distintas na mesma coluna remetem a médias estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) pelo teste *t* de Student.

3.4 Isolamento de cepas resistentes a ivermectina

3.4.1 Cepa ZOR

No total, foram obtidas 5 gerações sucessivas em animais tratados com ivermectina injetável. Os resultados sobre recuperação de fêmeas sobreviventes aos tratamentos sucessivos no hospedeiro encontram-se na **Tabela 11**.

Os resultados do TIL conduzido com cada uma das gerações obtidas (F0 a F5), estão apresentados na **Tabela 12.** O FR determinado para da geração inicial de larvas (F0) foi de 3,51. Nas gerações F1, F2 e F3 os FR obtidos foram respectivamente 1,88, 2,62 e 3,28. Na geração F4 foi obtido um FR de 6,86, e na que na F5 36,34. Os valores dos *slopes* variaram entre 1,44 (F0) e 0,79 (F5). As curvas concentração-mortalidade das gerações F0 a F5 estão representadas na **Figura 11**. A variação dos valores de FR e *slope* das cinco gerações obtidas da cepa ZOR está graficamente representada na **Figura 12**.

Tabela 11 – Recuperação de fêmeas de *R.* (*B.*) *microplus* cepa ZOR (F0 a F5) em sucessivas infestações.

Geração	Quantidade de larvas (g)	Total aproximado de larvas[1]	Número de fêmeas [2]	Taxa de recuperação [3]
F0	880	8.800	406	4,61%
F1	800	8.000	477	5,96%
F2	800	8.000	316	3,95%
F3	400	4.000	126	3,15%
F4	500	5.000	161	3,22%
F5	800	8.000	221	2,76%

1. Peso das larvas (mg) x 10; 2. Número total de fêmeas coletadas entre o 21° e 28° dia pós-infestação; 3. (Número de teleóginas / número de larvas infestadas) x 100; Tratamento do hospedeiro no dia da infestação com 200µg/Kg de ivermectina comercial a 1%.

Tabela 12 – Testes de Imersão de Larvas (TIL) com ivermectina conduzidos com gerações de *R. (B.) microplus* cepa ZOR (F0 a F5) mantida sobre pressão de seleção com tratamento com ivermectina 200 µg/ Kg no hospedeiro.

População	n	Slope±E.P.	χ^2(gl)	CL_{50} (IC95%) (ppm)	FR (IC95%)
ZOR F0	2148	1,44±0,06	147,7 (16)	27,48 (20,17 - 38,75)*	3,51 (3,14 - 3,93)
Mozo	1630	3,51±0,15	47,7 (14)	7,8 (6,95 - 8,76)	-
ZOR F1	7647	2,02±0,04	330,1 (72)	42,7 (38,92 - 46,86)*	1,88 (1,74 - 2,01)
Mozo	2131	4,08±0,23	22,8 (15)	22,73 (21,06 - 24,45)	-
ZORF2	4092	1,27±0,04	394,3 (51)	27,26 (21,39 - 34,29)*	2,62 (2,38 - 2,88)
Mozo	2155	3,89±0,15	151,7 (22)	10,4 (9,22 - 11,91)	-
ZORF3	5830	1,87±0,04	330,9 (49)	49,53 (43,37 - 56,86)*	3,28 (3,09 - 3,48)
Mozo	3394	4,67±0,18	53,1 (31)	15,08 (14,46 - 15,71)	-
ZORF4	7583	1,26±0,03	471,9 (82)	95,84 (82,30 - 113,04)*	6,86 (6,39 - 7,37)
Mozo	4995	4,09±0,1	295,5 (60)	13,95 (13,16 - 14,82)	-
ZORF5	2653	0,79±0,04	162,9 (37)	468,89 (332,41 - 725,29)*	36,34 (30,24 - 43,66)
Mozo	1550	4,24±0,18	112,7 (21)	12,9 (11,52 - 14,48)	-

Mozo: cepa controle suscetível. Pressão de seleção: tratamento de bezerros hospedeiros com IVM comercial a 1% (200 µg/kg) . N: número de ensaios; n: número de larvas testadas; χ^2 : valor do qui-quadrado; gl: graus de liberdade; EP: erro padrão; CL: concentração letal; IC95%: intervalo de confiança de 95%; ppm: partes por milhão; FR: fator de resistência. * Valores significativamente diferentes da cepa Mozo ($p < 0,05$).

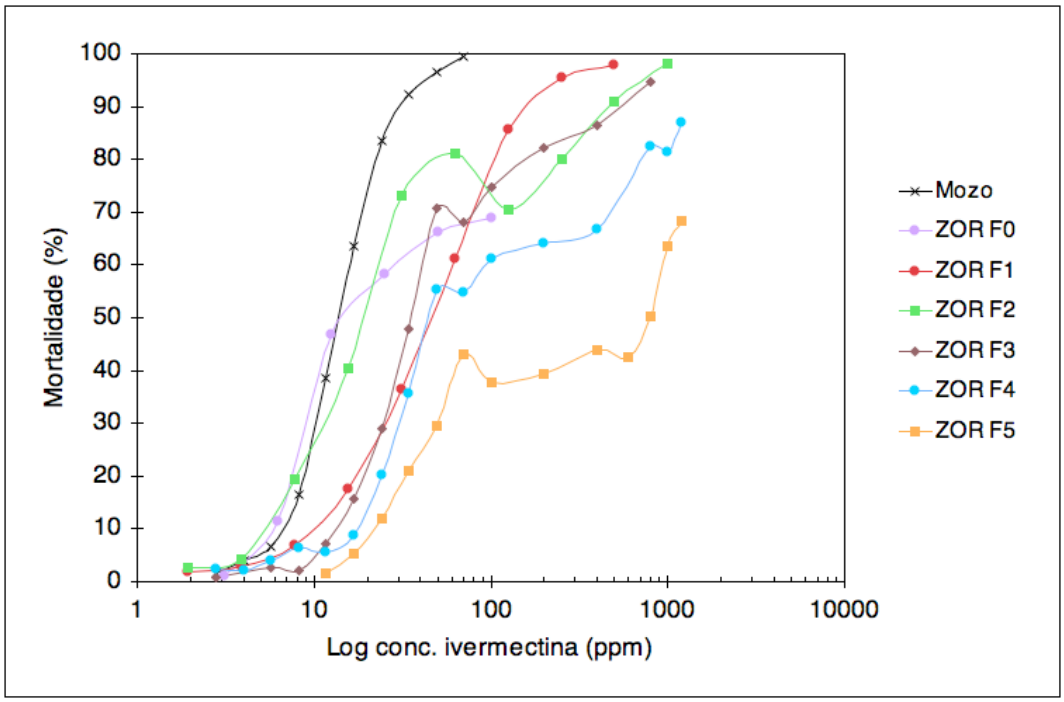


Figura 11. Curvas dose-resposta de *R. (B.) microplus* das cepas Mozo e ROZ (gerações F0 a F5) determinadas a partir do Teste de Imersão de Larvas com ivermectina.

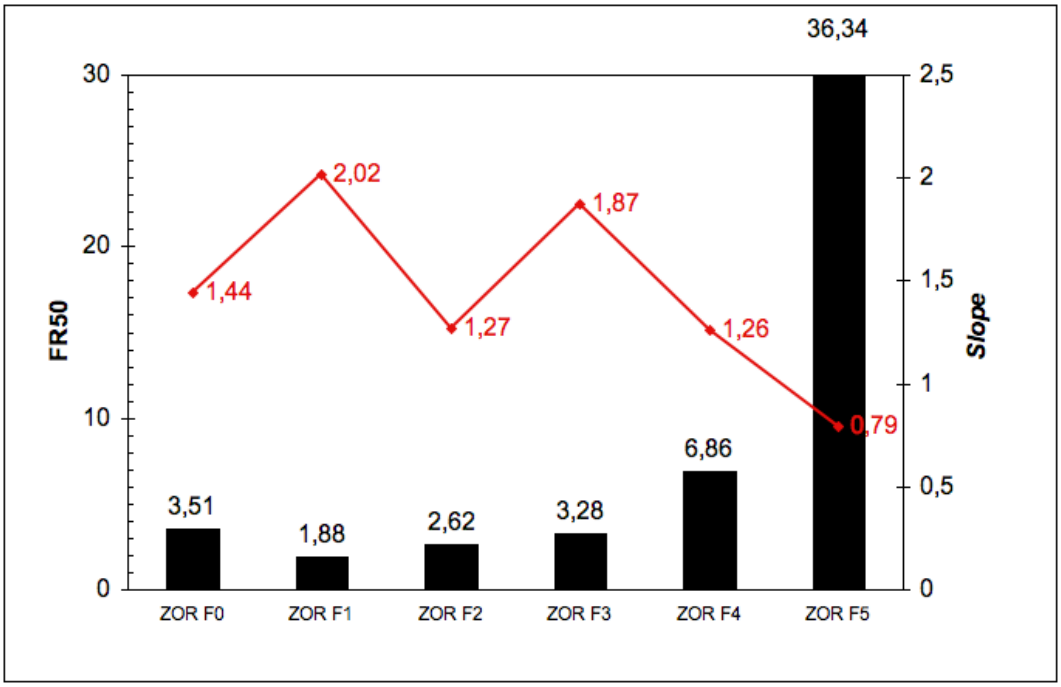


Figura 12. Fatores de resistência (FR) e valores de slope calculados a partir do TIL com *R. (B.) microplus* de cinco gerações da cepa ZOR. Valores de fatores de resistência (FR) em relação a cepa suscetível Mozo.

Os valores dos índices de fertilidade de amostras das fêmeas da cepa ZOR (F2, F3 e F4) sobreviventes ao tratamento do hospedeiro com ivermectina encontram-se na **Tabela 13.** Nesta também estão descritos os parâmetros biológicos da cepa Mozo mantida sem tratamento acaricida. As médias dos IFER obtidos com a cepa ZOR (F2 = 0,551; F3 = 0,572; F4 = 0,553), foram estatisticamente diferentes do IFER obtido com a cepa Mozo (0,464) ($p < 0,05$). Os valores de IFER das gerações da cepa ZOR analisadas não diferenciaram entre si ($p > 0,05$).

Em todas as progênies analisadas da cepa ZOR foi detectada resistência a ivermectina (**Tabela 13**). As mortalidades percentuais médias foram de 100% para a cepa Mozo, 40,97% para a F2, 37,36% para a F3 e 51,89% para a F4. As mortalidades das progênies de F2 e F3 foram estatisticamente semelhantes ($p > 0,05$); a mortalidade da progênie de F4 foi superior com diferença estatística às duas gerações antecedentes ($p < 0,05$). Todas as progênies da cepa ZOR tiveram mortalidade inferior à da cepa Mozo.

Tabela 13 – Parâmetros biológicos de fêmeas *R. (B.) microplus* da cepa resistente a ivermectina ZOR (gerações F2, F3 e F4) e cepa Mozo e mortalidade de suas respectivas progênies quando sob tratamento com ivermectina 100ppm.

Cepa	Geração	N	Fem (±dp) (g)	Ovos (±dp) (g)	IFER (±dp)	Mort (±dp) (%)
Mozo	-	30	0,251 [a] (0,03)	0,117 [a] (0,02)	0,464 [a] (0,04)	100 [a] (0)
ZOR	F2	70	0,274 [b] (0,05)	0,15 [b] (0,03)	0,551 [b] (0,08)	40,97 [b,c] (19,45)
	F3	38	0,226 [c] (0,04)	0,128 [c] (0,02)	0,572 [b] (0,04)	37,36 [b] (16,91)
	F4	25	0,214 [c] (0,04)	0,119 [a,c] (0,02)	0,553 [b] (0,03)	51,89 [c] (24,59)

N: número de fêmeas; Fem: peso das fêmeas; IFER: índice de fertilidade (peso dos ovos / peso da fêmea); d.p.: desvio padrão; a, b, c: letras iguais na mesma coluna remetem a valores estatisticamente iguais (Teste t de Student; $p > 0,05$).

3.4.2 Cepa M.ivm

A cepa M.ivm é uma linhagem obtida a partir da cepa suscetível Mozo, mantida sob pressão de seleção através do tratamento dos hospedeiros com ivermectina. Na primeira infestação o hospedeiro recebeu a dose recomendada pelo fabricante (200 µg/ Kg) e nenhum carrapato sobreviveu. Nas infestações subsequentes foram utilizados bovinos tratados com ivermectina na dosagem de 50 µg/ Kg. Os resultados de recuperação de fêmeas sobreviventes a estes tratamentos encontram-se resumidos na **Tabela 14**.

Tabela 14 – Recuperação de fêmeas de *R.* (*B.*) *microplus* cepa M.ivm (F0 a F3) em sucessivas infestações.

Geração	Quantidade de larvas (mg)	Total aproximado de larvas[1]	Número de fêmeas [2]	Taxa de recuperação [3]
F0	500	5.000	25	0,5%
F1	700	7.000	18	0,58%
F2	550	5.500	53	0,96%
F3	400	4.000	15	0,38%

1. Peso das larvas (mg) x 10; 2. Número total de fêmeas coletadas entre o 21° e 28° dia pós-infestação; 3. (Número de teleóginas / número de larvas infestadas) x 100; Tratamento do hospedeiro no dia da infestação com 50 µg/ Kg de ivermectina comercial a 1%.

Os dados de toxicidade da ivermectina obtidos através do TIL com cada geração da cepa M.ivm encontram-se na **Tabela 15**.

A geração inicial F0 apresentou valor de CL_{50} estatisticamente igual ao da cepa Mozo. Após o primeiro tratamento, o FR calculado para a geração F1 foi de 1,11. Não houve diferença estatisticamente significante entre a CL_{50} da F1 com a da cepa Mozo. As gerações F2 e F3 apresentaram CL_{50} significativamente maiores do que os calculados para a cepa referência suscetível. Seus FR foram de 1,21 e 1,58. As curvas dose-resposta ao tratamento com ivermectina das 4 gerações da cepa M.ivm estão ilustradas na **Figura 13**. O valor do *slope* da geração F0 foi

estatisticamente igual ao da cepa Mozo ($p < 0,05$). Nas demais gerações obtidas este valor foi menor do que o valor calculado para cepa Mozo. A variação dos valores de FR e *slope* das três gerações obtidas da cepa M.ivm está graficamente representada na **Figura 14**.

Tabela 15 – Testes de Imersão de Larvas (TIL) com ivermectina conduzidos com gerações de *Rhipicephalus (B.) microplus* cepa M.ivm (F0 a F3) mantida sobre pressão de seleção com tratamento com ivermectina 50 µg/ Kg no hospedeiro.

População	n	Slope±E.P.	χ^2(gl)	CL_{50} (IC95%) (ppm)	FR (IC95%)
M.ivm F0	1802	3,81±0,13	147,5 (20)	8,71 (7,38 - 10,2)	1,03 (0,94 - 1,14)
Mozo	829	3,48±0,34	34,5 (11)	8,42 (7,17 - 10,06)	-
M.ivm F1	1756	3,26±0,14	73,1 (18)	15,45 (13,85 - 17,25)	1,11 (1,03 - 1,17)
Mozo	1628	6,4±0,36	18,3 (14)	14,03 (13,42 - 14,67)	-
M.ivm F2	4605	4,39±0,12	205,8 (54)	17,40 (16,5 - 18,34)*	1,21 (1,17 - 1,26)
Mozo	3692	5,75±0,21	72,3 (42)	14,34 (13,89 - 14,82)	-
M.ivm F3	1531	4,46±0,18	6,7 (20)	22,91 (21,93 - 23,95)*	1,58 (1,49 - 1,68)
Mozo	1231	5,08±0,25	11,1 (14)	14,51 (13,93 - 15,12)	-

Mozo: cepa controle suscetível. Pressão de seleção: tratamento de bezerros hospedeiros com IVM comercial a 1% (50 µg/kg); n: número de larvas testadas; χ^2 : valor do qui-quadrado; gl: graus de liberdade; EP: erro padrão; CL: concentração letal; IC95%: intervalo de confiança de 95%; ppm: partes por milhão; FR: fator de resistência. * Valores significativamente diferentes da cepa Mozo para $p < 0.05$.

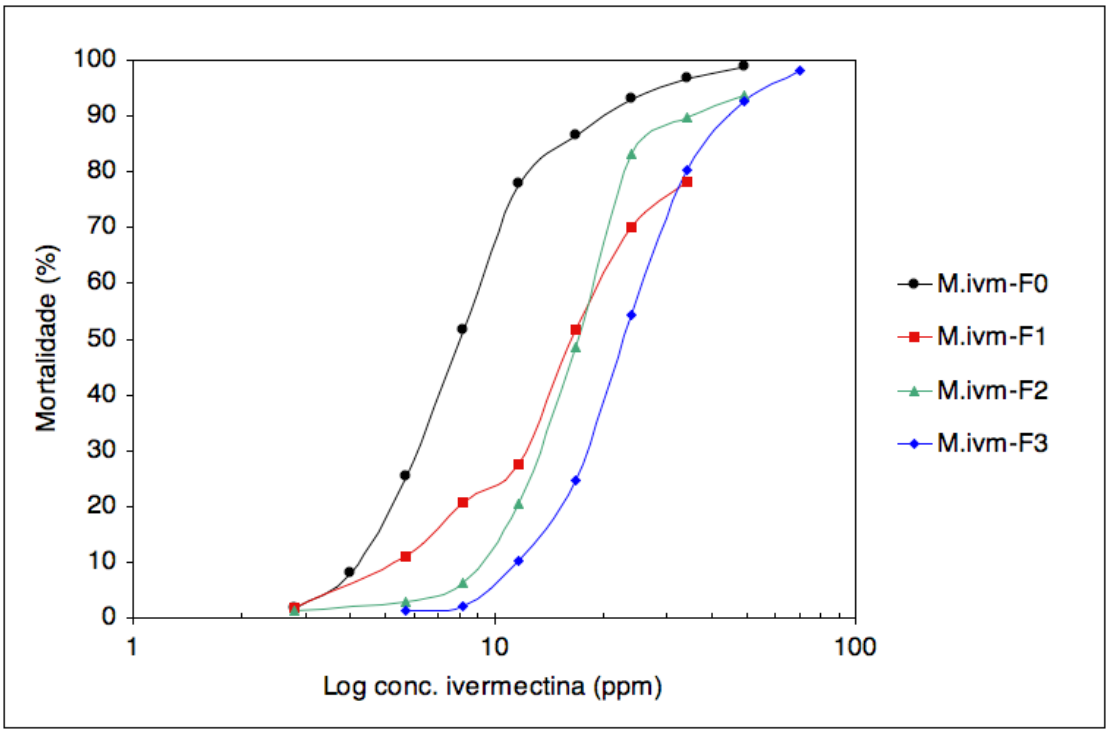


Figura 13. Curvas dose-resposta de *R. (B.) microplus* da cepa M.ivm (gerações F0 a F3) determinadas a partir do Teste de Imersão de Larvas com ivermectina.

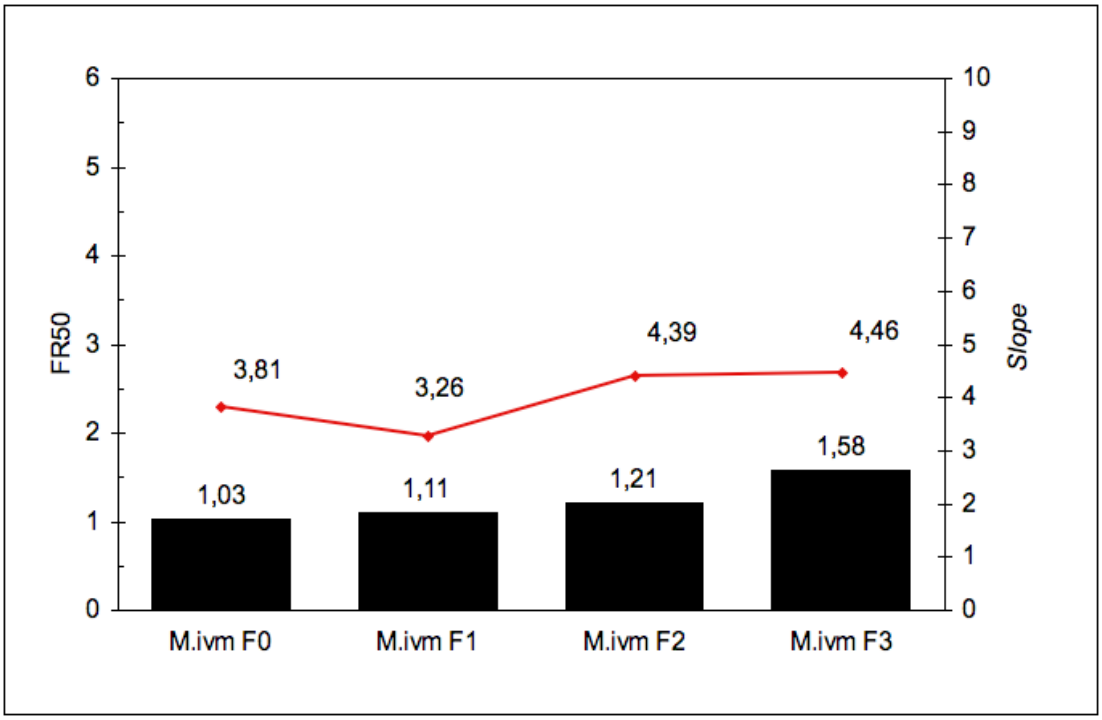


Figura 14. Fatores de resistência (FR) e valores de slope calculados a partir do TIL com *R. (B.) microplus* de três gerações da cepa M.ivm. Valores de fatores de resistência (FR) em relação a cepa suscetível Mozo.

Os parâmetros biológicos das fêmeas recuperadas das gerações F0 e F2 da cepa M.ivm estão apresentados na **Tabela 16**. Os IFER calculados para a cepa Mozo (0,464) e M.ivm F0 (0,455) foram estatisticamente iguais entre si ($p > 0,05$) e diferiram daquela determinado para M.ivm F2 (0,506) ($p < 0,05$). Tanto no peso das fêmeas, quanto nos pesos dos ovos, Mozo e M.ivm F0 apresentaram valores estatisticamente iguais entre si ($p > 0,05$), o mesmo acontecendo entre M.ivm F0 e M.ivm F2.

Tabela 16 – Parâmetros biológicos de fêmeas *R. (B.) microplus* da cepa M.ivm (gerações F0 e F2) e da cepa Mozo.

Cepa	Geração	N	Fem (±dp) (g)	Ovos (±dp) (g)	IFER (±dp)
Mozo	-	30	0,251 [a] (0,03)	0,117 [a] (0,02)	0,464 [a] (0,04)
M.ivm	F0	25	0,226 [a,b] (0,06)	0,104 [a,b] (0,03)	0,455 [a] (0,07)
	F2	53	0,209 [b] (0,02)	0,106 [b] (0,01)	0,506 [b] (0,04)

N: número de fêmeas; Fem: peso das fêmeas; IFER: índice de fertilidade (peso dos ovos / peso da fêmea); d.p.: desvio padrão; a, b: letras iguais na mesma coluna remetem a valores estatisticamente iguais (Teste t de Student; $p > 0,05$).

3.5 Bioensaios com inibidores enzimáticos

A **Tabela 17** compila os resultados dos testes de larvas com ivermectina conduzidos com as cepas Mozo e ZOR (F3) sob o efeito dos inibidores enzimáticos PBO, TPP e DEM. A **Figura 15** representa uma comparação gráfica dos fatores de sinergismo (FS) calculados para a cepas Mozo e ZOR (F3). A **Figura 16** representa os fatores de resistência (FR) para ivermectina da cepa ZOR (F3) calculados em ausência ou presença do inibidores.

Na cepa Mozo, CL_{50} determinada em presença do PBO foi menor que a do grupo controle, resultando em sinergismo (FS = 1,56). A presença do TPP resultou em redução da toxicidade da ivermectina, sendo detectado um aumento da CL_{50} em relação ao grupo controle (FS=0,67). A presença de DEM não alterou a toxicidade da ivermectina (FS = 1,01) (**Tabela 17**).

Para a cepa ZOR (F3), verificou-se um sinergismo pelo PBO no tratamento com ivermectina (FS = 1,75). Os valores dos FR na ausência (2,41) ou presença (2,19) de PBO não se mostraram estatisticamente diferentes. Com a adição do DEM, houve sinergismo (FS = 1,62) e o valor de FR para ZOR em presença deste inibidor foi significativamente menor (1,59) do que o registrado para o controle. Com o TPP não foi detectado sinergismo (FS = 0,87). O FR em presença deste inibidor (1,86) foi menor do que o registrado para o controle.

Tabela 17 – Testes de Imersão de Larvas com inibidores enzimáticos e ivermectina conduzidos com *Rhipicephalus (B.) microplus* da cepa suscetível Mozo e geração F3 da cepa ZOR.

Cepa; tratamento	n	Slope (E.P.)	χ^2 (gl)	CL_{50} (IC95%) (ppm)	FR	FS
Mozo						
Ivermectina	1512	5,09 (0,21)	25,7 (16)	15,59 (14,81 - 16,42)	-	-
+0,0025% PBO	1285	5,38 (0,31)	14,5 (13)	9,91 (9,52 - 10,48)*	-	1,56
+0,01% TPP	1640	4,64 (0,36)	45,9 (17)	23,24 (21,21 - 25,52)*	-	0,67
+0,05% DEM	1378	4,99 (0,34)	24,9 (16)	15,61 (14,62 - 16,68)	-	1,01
ZOR (F3)						
Ivermectina	2302	2,14 (0,09)	26,3 (21)	37,62 (34,35 - 41,57)	2,41	-
+0,0025% PBO	1840	2,31 (0,11)	81,1 (20)	21,45 (18,47 - 25,11)*	2,19	1,75
+0,01% TPP	1844	2,97 (0,14)	40,9 (18)	43,06 (38,51 - 48,91)	1,86	0,87
+0,05% DEM	1771	2,93 (0,13)	94,2 (17)	23,23 (20,15 - 27,36)*	1,59	1,62

n: número de larvas; χ^2 : valor do qui-quadrado; GL: graus de liberdade; E.P.: erro padrão; CL: concentração letal; IC: intervalo de confiança; FR: fator de resistência; FS: fator de sinergismo (CL_{50} em presença do inibidor / CL_{50} na ausência do inibidor); Inibidores enzimáticos: PBO - Butóxido de piperonila 0,0025%; TPP - trifenilfosfato 0,01%; DEM - dietilmaleato 0,05%.* Valores estatisticamente diferentes à CL_{50} calculada para o controle com ivermectina somente, da mesma população ($p < 0,05$).

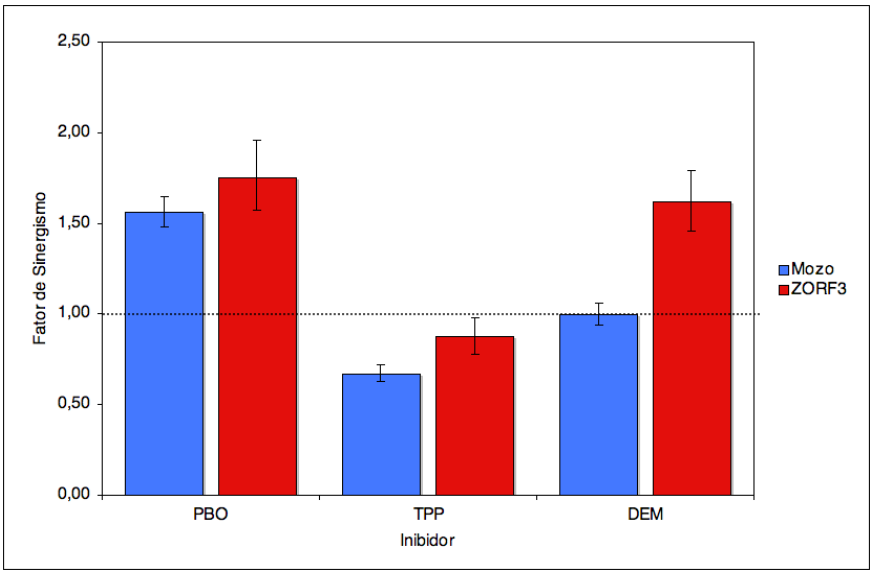


Figura 15. Comparação dos fatores de sinergismo obtidos com butóxido de piperonila (PBO) 0,0025%, trifenilfosfato (TPP) 0,01% e dietilmaleato (DEM) 0,05%, no tratamento com ivermectina pelo teste de imersão de larvas com *R. (B.) microplus* das cepas Mozo e ZOR F3. As barras verticais indicam os intervalos de confiança de 95%.

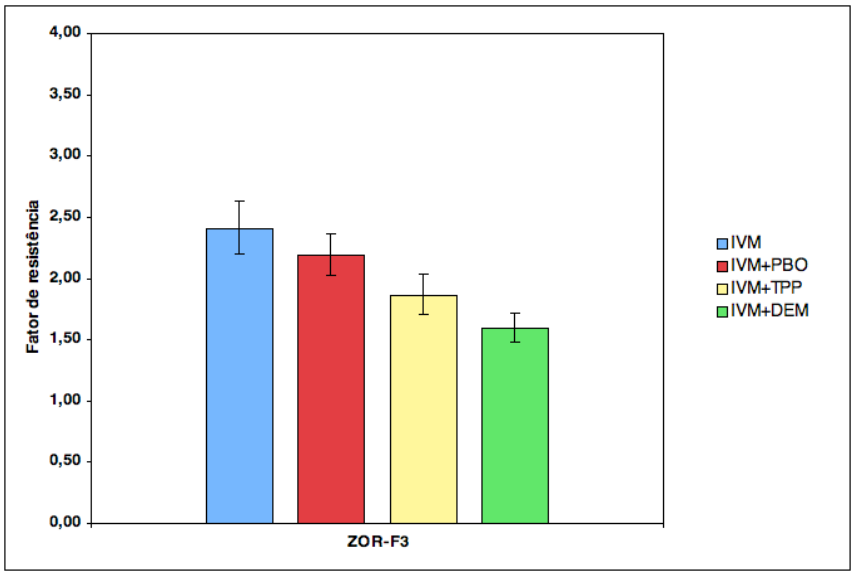


Figura 16. Comparação dos fatores de resistência a ivermectina em presença dos inibidores enzimáticos butóxido de piperonila (PBO) 0,0025%, trifenilfosfato (TPP) 0,01% e dietilmaleato (DEM) 0,05%, determinados a partir do teste de imersão de larvas com *R. (B.) microplus* da cepa ZOR F3, calculados em relação aos mesmos tratamentos com a cepa suscetível Mozo. As barras verticais indicam os intervalos de confiança de 95%.

3.6 Caracterização parcial do gene GluCl de *R. (B.) microplus*

3.6.1 Amplificação

A PCR realizada com os pares de oligonucleotídeos [5F-5R] sobre DNAg de fêmeas *R. (B.) microplus* das cepas Mozo e ZOR (F4), resultou na amplificação de fragmentos de DNA com aproximadamente 310 pb. A PCR com o par de oligonucleotídeos [Rs1F-E6R] sobre o cDNA de larvas das cepas Mozo mortas e ZOR (F5) vivas após o tratamento com ivermectina 100 ppm, resultou na amplificação de fragmentos de cDNA com aproximadamente 1.100 pb. Uma representação gráfica do posicionamento dos oligonucleotídeos utilizados para amplificação por PCR de fragmentos do gene *GluCl* de *R. (B.) microplus* encontra-se na **Figura 17.**

A **Figura 18** apresenta a fotografia de um gel de agarose, com os produtos amplificados pelo PCR.

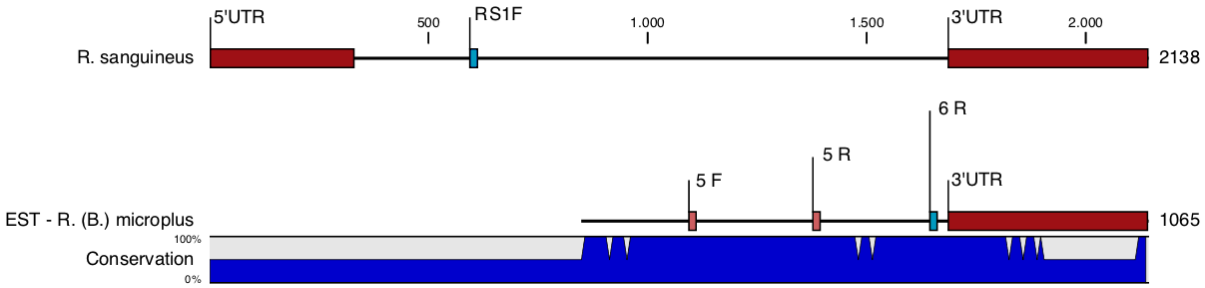


Figura 17. Alinhamento entre a sequência *GluCl1* de *Rhipicephalus sanguineus* (GenBank id. GV659518) e da EST BEAGZ56 de *R. (B.) microplus* (GenBank id. CV456910.1). Em vermelho estão representadas as regiões 5' e 3'- UTR. Nas caixas verdes, estão indicadas as posições dos oligonucleotídeos (*primers*) utilizados nas reações de PCR (E5F-E5R e RsF1-E6R).

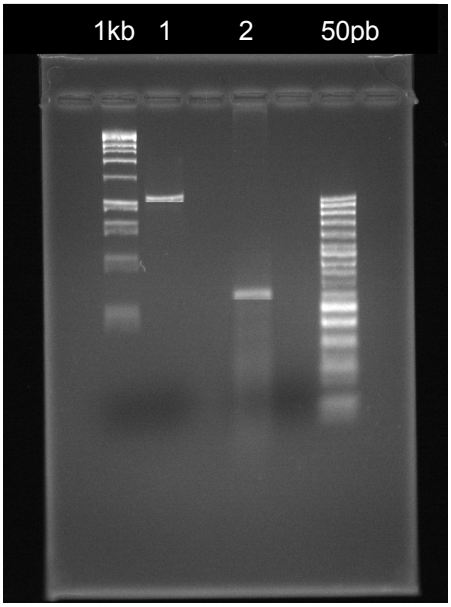


Figura 18. Fotografia sob luz UV, de gel de agarose 2% submetido à eletroforese com produtos de PCR obtidos com os pares de oligonucleotídeos [5F-5R] (pista 1) em DNAg de fêmeas e [Rs1F-E6R] (pista 2) cDNA de larvas de *R. (B.) microplus* da cepa Mozo.

3.5.2 Análise de sequências

A **Figura 19** apresenta o alinhamento da sequência predita de aminoácidos da proteína GluCl determinada para a cepa Mozo, com aquelas de *R. sanguineus*, *Ixodes scapularis* e *Drosophila melanogaster*. O sequenciamento do fragmento [RsF1-E6R] amplificado a partir de cDNA da cepa Mozo é composta de 972 pb (GenBank Id. GU562859.1). A sequência deduzida de aminoácidos do canal GluCl da cepa Mozo (GenBank Id. ADD63685.1) apresentou identidades de 90%, 92% e 75% aos genes ortólogos de *R. sanguineus, I. scapularis* e *D. melanogaster*, respectivamente. No trecho descrito para a proteína GluCl de *R. (B.) microplus* foi possível identificar 2 domínios conservados referentes aos domínios de ligação e transmembrana da proteína do canal representados na **Figura 19**.

Nas **Figuras 20** e **21** e **Anexos A** e B estão representados, respectivamente, os alinhamentos das sequências de adultas e larvas das cepas Mozo e ZOR, com sequências de RNAm do *GluCl1* de *R. sanguineus* e EST BEAGZ56 de *R. (B.) microplus*. Entre as sequências obtidas foram encontrados polimorfismos pontuais que não resultaram em substituições nas sequências de aminoácidos determinadas para a cepa Mozo e ZOR.

```
                                  20                  40                  60                  80
                                   |                   |                   |                   |
R. microplus - Mozo  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
R. sanguineus        ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
I. scapularis        ---SRFSFRR YTYKNAHLER PLLRALRAPL FVSRSLAHLV RLEPTYTTGS FCLFPSPDAD GPALVRVNIY IRSISRIDDV 77
D. melanogaster      MGSGHYFWAI LYFASLCSAS LANNAKINFR EKEKKVLDQI LGAGKYDARI RPSGINGTDN KATNVSVNMF LRSISKIDDY 80

                                 100                 120                 140                 160
                                   |                   |                   |                   |
R. microplus - Mozo  ---------- ---------- --DLGGQVRY LTLTEPDKLW KPDLFFSNEK EGHFHNIIMP NVLLRIHPNG DVL------- 51
R. sanguineus        --EYTVQMTF REQWRDERLQ YD........ .......... .......... .......... .......... ..--------- 71
I. scapularis        TMEYTVQMTF REQWRDERLQ YD........ .......... .......... .......... .......... .GVCLNDLPS 157
D. melanogaster      KMEYSVQLTF REQWTDERLK FD.IQ.RLK. .....ANRV. M......... .......... ..YI..F... S.-------- 153

                                 180                 200                 220                 240
                                   |                   |                   |                   |
R. microplus - Mozo  FSIRISLVLS CPMNLKFYPL DKQICSIVMV SYGYTTEDLV FLWKEGDPVQ VTKNLHLPRF TLERFQTDYC TSRTNTGEYS 131
R. sanguineus        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 151
I. scapularis        .LF....... .......... .......L.. .......... .......... .......... .......... .......D.. 237
D. melanogaster      Y......T.A ......L... .R....LR.A ...W..N... .......... .V........ ...K.L.... N.K....... 233

                                 260                 280                 300                 320
                                   |                   |                   |                   |
R. microplus - Mozo  CLRVDLVFKR EFSYYLIQIY IPCCMLVIVS WVSFWLDPTS IPARVSLGVT TLLTMATQIS GINASLPPVS YTKAIDVWTG 211
R. sanguineus        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 231
I. scapularis        .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 317
D. melanogaster      .K...L.... .......... .......... .......QGA V......... .......T.. .......... .......... 313

                                 340                 360                 380                 400
                                   |                   |                   |                   |
R. microplus - Mozo  VCLTFVFGAL FEFALVNYAS WSDSRRQNTQ KQKQRKWELE PPLDSDHLE- -----DGATT FAM------- ---------- 268
R. sanguineus        .......... L......... R...H...M. .......... .........- ---------- ...VSSGEPA GLMARTWPPP 305
I. scapularis        .......... L......... R.E.H...M. ....-..... ..ME.....- -------T.. ..-------- ---------- 373
D. melanogaster      .......... L......... R.G.NKA.MH .ENMK.KRRD LEQA.LDAAS DLLDT.SNA. ..-------- ---------- 376

                                 420                 440                 460                 480
                                   |                   |                   |                   |
R. microplus - Mozo  ---------- -----RPLVH HHGE-LHADK LRQCEVHMKT PKT-NLCKAW LSRFPTRSKR IDVVSRIFFP LM-------- 323
R. sanguineus        PLPPNMAAGS AQAGA..... ....-..... .......... ...-...... ..K....... .......... ..FALFNLVY 383
I. scapularis        ---------- ---------- ...D-M.... .......... ...-...... ..K....... .......... ..FALFNLVY 435
D. melanogaster      ---------- -----K...R .P.DP.ALE. RL......QA ..RP.C..T. ..K....... ...I...T.. .VFALFNLVY 441

R. microplus - Mozo  ---------- ---- 323
R. sanguineus        WTTYLFREDK EDE- 396
I. scapularis        WTTYLFREDK EDE- 448
D. melanogaster      WSTYLFREEE DETF 455
```

Figura 19. Alinhamento de sequência predita de aminoácidos do gene *GluCl* de *R. (B.) microplus* da cepa Mozo com genes *GluCl* de *Rhipicephalus sanguineus, Ixodes scapularis* e *Drosophila melanogaster*. Os aminoácidos sublinhados em azul representam o domínio ligação de neurotransmissores, os sublinhados em vermelho representam o domínio transmembrana. Em laranja estão destacados resíduos de Cisteína. Em verde, destacam-se resíduos de Glicina.

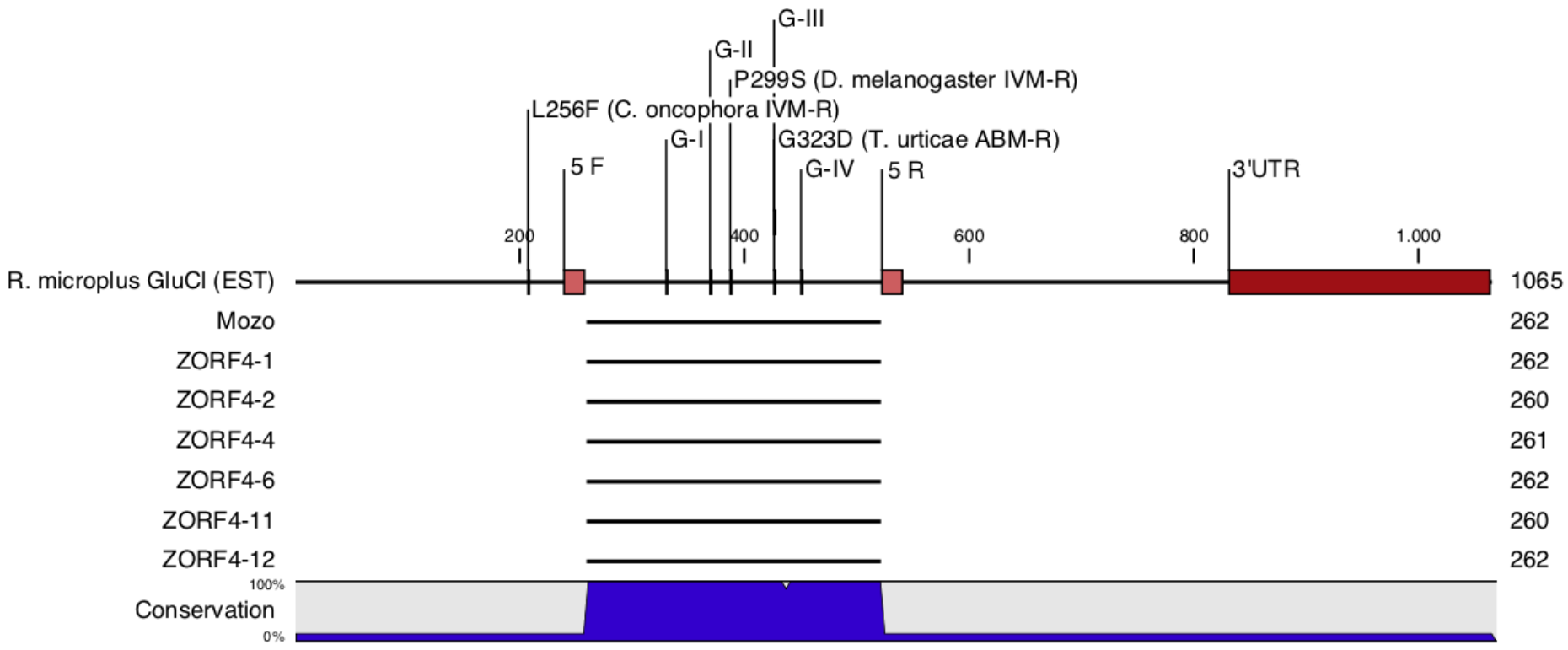


Figura 20. Alinhamento de sequências de DNA de *R. (B.) microplus* das cepas Mozo e ZOR com EST de *R. (B) microplus*. A sequência da cepa Mozo foi determinada a partir de 10 diferentes indivíduos. Os sítios de ligação de oligonucleotídeos utilizados (5F e 5R) estão identificados nas caixas cor-de-rosa. As regiões de mutação para outras espécies e os códons codificadores de glicina estão identificados nas linhas verticais. Sequências obtidas a partir de cinco clones de cada amostra.

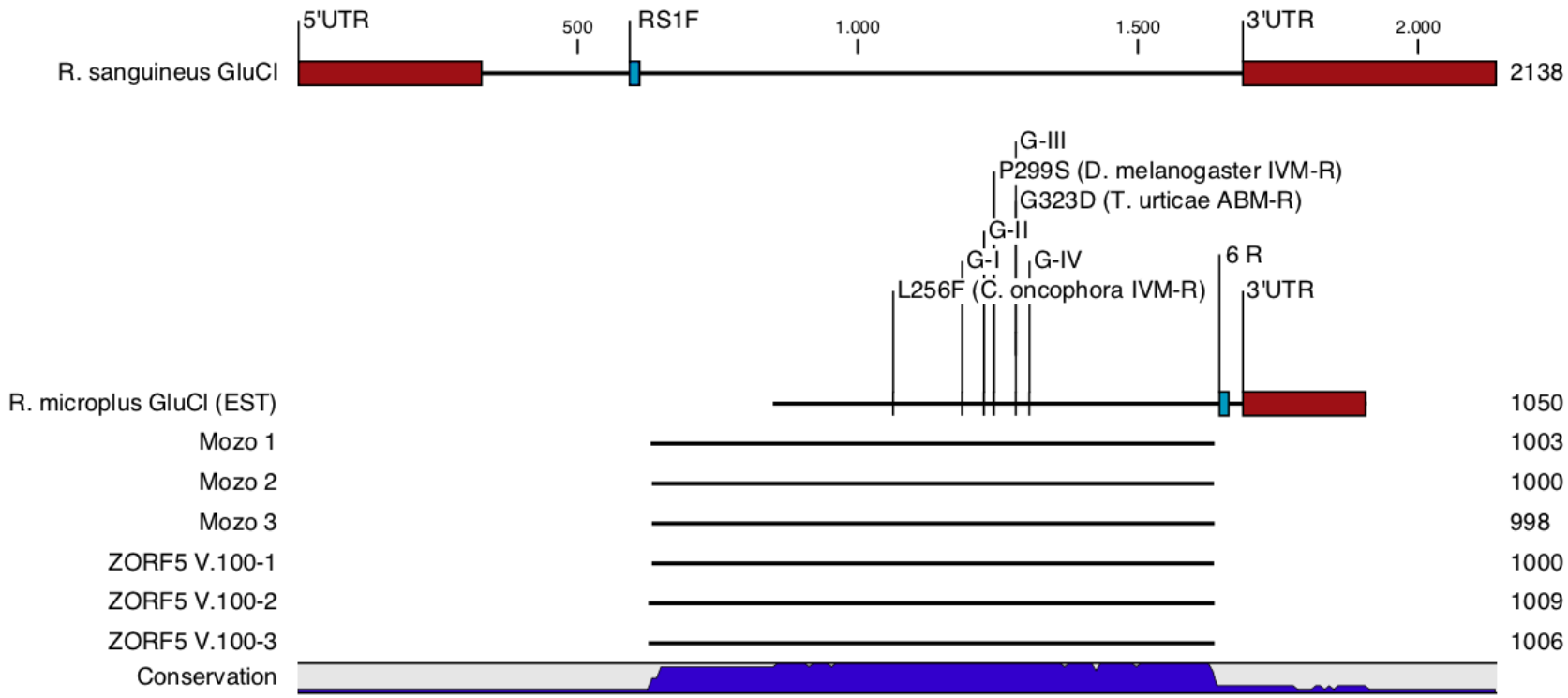


Figura 21. Alinhamento de sequências de cDNA de *R. (B.) microplus* das cepas Mozo e ZOR com EST de *R. (B) microplus*. Material genômico obtido de *pools* (3 x 50 indivíduos) de larvas das cepas Mozo mortas e ROZF5 sobreviventes, ao tratamento com ivermectina 100ppm. Os sítios de ligação de oligonucleotídeos utilizados (Rs1F e 6R) estão identificados nas caixas azuis. As regiões de mutação para outras espécies e os códons codificadores de glicina estão identificados nas linhas verticais. Sequências obtidas a partir de cinco clones de cada amostra.

4 DISCUSSÃO

As lactonas macrocíclicas (LMs) consistem um grupo de moléculas importantes para o controle de parasitos internos e externos dos animais domésticos e tiveram seu uso aumentado para o controle de carrapatos nos últimos anos devido ao desenvolvimento de resistência às outras classes acaricidas disponíveis. Entretanto, o uso intensivo das LMs tem sido o principal responsável pelo desenvolvimento de resistência a uma série de parasitos dos animais domésticos e do homem. A resistência a ivermectina em *R. (B.) microplus* foi detectada no Brasil através de testes de campo (MARTINS; FURLONG, 2001) e parece estar se disseminando entre populações da América Latina (PEREZ-COGOLLO et al., 2010a,b; CASTRO-JANER et al., 2011). Desta forma, se faz necessário o diagnóstico preciso e confiável da resistência para uma adequada avaliação sobre sua distribuição e frequência nas populações de *R. (B.) microplus.* O entendimento sobre o comportamento deste tipo de resistência em populações de campo e de laboratório assim como a compreensão sobre os mecanismos e bases genéticas envolvidos podem orientar no estabelecimento de programas de manejo de resistência à droga.

Visando o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas de bioensaios para o diagnóstico de resistência a ivermectina, o presente trabalho abordou metodologias adotadas mundialmente para diagnóstico de resistência a acaricidas em *R. (B.) microplus*: o teste de imersão de adultos e os testes de pacote e de imersão de larvas.

No teste de imersão de adultas (TIA), todas as variáveis biológicas mensuradas (peso dos ovos, índice de fecundidade, índice de fertilidade) se provaram apropriadas para a avaliação toxicológica da ivermectina, independente do tempo de imersão utilizado. Entretanto, o índice de fecundidade (IFEC) apresentou a maior variabilidade entre os ensaios (**Figura 2**). Esta variabilidade no IFEC também foi anteriormente observada por Castro-Janer et al. (2009a) quando realizaram testes sobre a ação do fipronil sobre o carrapato bovino. Uma desvantagem do uso do IFEC como parâmetro de avaliação da toxicidade é o longo período necessário para que ocorra a emergência das larvas, de 6 semanas após a coleta dos carrapatos. Esta condição, associada a alta correlação entre o peso dos ovos coletados aos 7 e 14 dias (**Figura 3**), reforça a indicação do uso do índice de

fertilidade (IFER) e/ ou peso dos ovos tomados após 7 dias para avaliação da toxicidade da droga pois os resultados podem ser obtidos mais antecipadamente. A indicação do uso do IFER determinado aos 7 dias do tratamento para o cálculo da toxicidade de LMs havia sido proposto pela FAO em seu guia para diagnóstico de resistência acaricida (FAO, 2004). Os dados obtidos no presente trabalho validam esta proposta, com alta confiabilidade estatística.

A toxicidade da ivermectina em fêmeas adultas foi positivamente influenciada pelo tempo de imersão, semelhante ao observado por Sabatini et al. (2001). Estes autores utilizaram formulações comerciais de LMs e sugeriram que fosse utilizado um tempo de imersão de 30 minutos, pois este resultou em uma inibição consistente da postura de ovos. Adicionalmente, no presente estudo foram avaliados os tempos de imersão de 1 e 5 minutos, afim de se obter um ensaio mais rápido. Em todos os tempos avaliados foi possível determinar as concentrações letais (CL) para ivermectina. Ao utilizar uma imersão por 30 minutos pode ser diminuída a quantidade de ivermectina técnica necessária para o bioensaio, iniciando as diluições seriadas em 1% de ingrediente ativo, o que seria considerado uma vantagem. Entretanto, o tempo de imersão de 30 minutos apresentou uma maior variação de resultados quando comparado à imersão por 1 minuto (**Figura 2**). Possivelmente, esta maior variação é devida a um menor número de ensaios conduzidos, comparativamente aos testes com 1 minuto. Sugere-se, portanto, mais estudos para confirmar esta observação. Os protocolos de TIA propostos neste trabalho podem ser utilizados por outros laboratórios para comparar cepas resistentes e suscetíveis, com o propósito de avaliar o seu uso no diagnóstico de resistência a ivermectina.

Um dos aspectos limitantes do TIA é o número necessário de indivíduos para uma análise estatística precisa e robusta (JONSSON; MILLER; ROBERTSON, 2007). Os testes de larvas usualmente são realizados com mais de 100 indivíduos por concentração e a repetição dos testes é possível na maioria das vezes, favorecendo a análise dos dados. Comparado aos testes com adultos, os testes de larvas (TIL e TPL) apresentaram uma menor variância nas CL determinadas. Ambos apresentaram intervalos de confiança de 95% estreitos e altos coeficientes de regressão, indicando adequação ao modelo estatístico de probitos.

A toxicidade da ivermectina no TPL foi menor do que no TIL. A CL_{50} foi cerca de 90 vezes o valor determinado pela imersão das larvas (**Tabela 2**). Estes

resultados concordam com os obtidos por Sabatini et al. (2001) para moxidectina, assim como com os obtidos por Castro-Janer et al. (2009a) ao realizarem testes com o fipronil.

A maior toxicidade da ivermectina no TIL em relação ao TPL pode estar relacionada à uma maior quantidade de ingrediente ativo absorvido pelos carrapatos durante a imersão. Neste processo, a larva fica completamente imersa na solução e além da penetração cuticular, a ivermectina poderia adentrar pelas articulações dos apêndices larvários, resultando em maior absorção. Ainda pode-se considerar a influência do etanol na solução utilizada, um solvente orgânico que pode danificar a cutícula da larva facilitando a penetração da droga. No TPL, as larvas têm uma menor superfície de contato com a ivermectina, que está impregnada no papel e, consequentemente, uma menor quantidade do acaricida é absorvida.

Ambas as técnicas foram capazes de diagnosticar a resistência a ivermectina na cepa ZOR (geração 4) resistente, isolada no presente trabalho, que demonstrou CL_{50} maiores que aquelas determinadas para a cepa Mozo, tanto pelo TPL quanto pelo TIL (**Tabela 3**). Entretanto, de acordo com os resultados deste teste, a cepa ZOR foi classificada com resistência incipiente (**item 2.4**), com pouca diferença na resposta ao tratamento em relação a cepa suscetível Mozo (**Tabela 3, Figura 6**). A população de campo ZOR foi escolhida para ser mantida sob pressão de seleção para resistência a ivermectina pelo fato desta molécula ter se mostrado ineficaz para o seu controle. É preciso enfatizar que os dados foram obtidos com a quarta geração de sobreviventes ao tratamento com ivermectina. Uma possibilidade é de que o TPL teria sido incapaz de revelar todo o “potencial” de resistência da cepa ZOR, uma vez que o tempo de exposição da larva ao acaricida é longo (24 horas) e a capacidade de destoxificação do carrapato poderia ser superada pela absorção prolongada de ivermectina. Isto poderia tanto ser verdade em uma condição de resistência mediada por enzimas, tanto como na resistência determinada por mutação em sítio alvo. A ivermectina tem alta afinidade pelo canal GluCl, no qual foram descritas mutações associadas a resistência em outras espécies. Entretanto, de forma dose-dependente a ivermectina, a molécula pode se ligar também a canais iônicos controlados por GABA (LUDMERER et al., 2002), exercendo sua função inibitória no sistema nervoso e levando a larva GluCl-mutante à morte. Embora a sensibilidade do TPL tenha sido menor do que no TIL, este teste apresentou capacidade discriminatória no diagnóstico de resistência nesta cepa.

A diferença na toxicidade da ivermectina entre as duas cepas foi mais pronunciada no TIL em relação ao TPL, detectando-se raros indivíduos sobreviventes a uma concentração de ivermectina (1.000 ppm) cerca de 10 vezes maior que a CL_{50} obtida para a cepa ZOR (94,82 ppm) e aproximadamente 70 vezes maior que a CL_{50} da cepa Mozo (13,96) (**Figura 5, Tabela 3**). Esta é uma característica importante, pois possibilita a detecção de fenótipos resistentes em uma população mesmo quando presentes em uma baixa frequência, colaborando com o diagnóstico precoce da resistência no campo. Uma alta sensibilidade do teste de imersão de larvas no diagnóstico de resistência ao fipronil foi anteriormente observada (CASTRO-JANER et al., 2009a). De fato, o TIL foi bem sucedido na identificação de populações de *R. (B.) microplus* resistentes no Uruguai em propriedades com introdução recente de ivermectina na estratégia de controle de carrapatos (CASTRO-JANER et al., 2011).

Para convalidar os protocolos de bioensaios com ivermectina utilizando larvas de *R. (B.) microplus* e, adicionalmente, realizar o diagnóstico de resistência em populações de campo, foram realizados testes com exemplares oriundos de 30 propriedades de produção bovina, na sua maioria de exploração leiteira, situadas em diferentes municípios dos estados de São Paulo, Mato Grosso do Sul e Rio Grande do Sul (**Quadro 2**). As propriedades avaliadas tinham histórico de uso de diferentes drogas e, em grande parte delas, foi detectada resistência a duas ou mais classes químicas. Algumas delas foram classificadas como multirresistentes (CASTRO-JANER et al., 2010; MENDES et al., 2011).

Entre as populações de carrapatos que nunca haviam sido expostas a LMs (BDT1, BDT2, BDT3, JS, Prat, SLU, StaP e TRE), não foram detectadas diferenças nos valores calculados de CL_{50} com os da cepa suscetível Mozo através do TIL (**Tabela 4, Figura 7**), convalidando o uso deste teste para o diagnóstico a ivermectina.

Os valores de CL_{50} obtidos através dos TIL conduzidos com as populações de campo que tinham histórico de exposição prévia a LMs foram maiores, com diferença estatística, do que os calculados para a cepa Mozo (**Tabela 5, Figura 8**). Fatores de resistência de diferentes níveis foram determinados para estas populações, classificando-as como incipientemente resistentes (CAN, BON, JUA, StoA, PCE, FAR, POR e SGA) ou resistentes (AGU, Fer, CAV, Sma, FIG, VIS, APO, ANT, LAC e JEQ). A única exceção foi a população Lar, que foi considerada

suscetível embora apresentasse histórico de exposição da droga. A propriedade de origem desta população havia recém introduzido a ivermectina para o controle de carrapatos. Todas as outras populações tinham sido expostas a LMs, 2 a 6 vezes por ano por no mínimo 3 anos, previamente à coleta de carrapatos, o que poderia determinar a variação nos níveis de resistência em cada localidade.

Os FRs obtidos para populações de campo através do TPL foram menores do aqueles determinados pelo TIL. O teste do pacote não detectou a resistência em duas populações (PIQ e StoA) que foram diagnosticadas como resistentes pelo TIL (**Tabelas 5** e **6**). Estas observações, juntamente com os dados obtidos na validação dos bioensaios conduzidos com a cepa resistente ZOR, reiteram a menor sensibilidade do TPL, o que leva a recomendação do uso preferencial do TIL para o diagnóstico de resistência a ivermectina em *R. (B.) microplus*.

Atualmente, as técnicas padronizadas neste trabalho estão sendo utilizadas para monitorar a resistência a ivermectina em populações de *R. (B.) microplus* por outros centros de pesquisa sediados nos Brasil [5/6], Estados Unidos da América[7], México[8] e Uruguai[9].

É interessante a observação de resistência a ivermectina em populações que haviam feito o uso de doramectina para o controle do carrapato (FER, APO, JEQ e SGA). Este fenômeno pode se tratar de resistência colateral (SHOOP, 1993) e pode se dever ao fato de que estas moléculas atuam sobre o mesmo sítio alvo (canal GluCl) e, desta maneira, uma modificação estrutural neste sítio poderia afetar a ligação de qualquer uma das LMs. Além disso, como são moléculas semelhantes, as LMs podem ser degradadas pelas mesmas enzimas no caso de resistência metabólica. A resistência colateral entre LMs já observada em cepas resistentes de *Haemonchus contortus*, entre doramectina e ivermectina (BLACKHALL et al., 1998), *Tetranychus urticae*, entre milbemectina e abamectina (NICASTRO et al., 2009) e em *Lucilia cuprina* entre ivermectina e moxidectina (RUGG et al., 1998). Esta resistência colateral também foi detectada por bioensaios em *R. (B.) microplus*, entre ivermectina e moxidectina (ALBUQUERQUE, 2007). A confirmação da resistência colateral entre ivermectina e doramectina permitirá sugerir a utilização da

---

[5] Dra. Márcia Cristina Mendes - Instituto Biológico de São Paulo, São Paulo, Brasil.
[6] Dr. Renato Andreotti - EMBRAPA Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brasil
[7] Dr. Robert John Miller - Cattle Fever Tick Research Laboratory, USDA. Edinburg, Texas, EUA
[8] Dr. Roger Ivan Rodriguez-Vivaz - Universidad Autónoma de Yucatán, Mérida, Yucatán, México.
[9] Dra. Eleonor A. Castro-Janer - Universidad de La República, Montevidéu, Uruguai.

ivermectina como marcador diagnóstico de resistência a doramectina e moxidectina, facilitando a prática de monitoramento da resistência a estas drogas.

O fato da resistência a ivermectina ter sido diagnosticada na grande maioria das populações de *R. (B.) microplus* avaliadas no presente trabalho é alarmante e pode ser explicado pela intensificação do seu nos últimos 10 anos em substituição de outras moléculas já acometidas pela resistência. A maioria das populações coletadas tem origem em propriedades de produção leiteira que fazem a administração intensiva e irresponsável desta droga de uso proibido em animais em lactação. O leite produzido por estas fazendas está sendo disponibilizado no mercado provavelmente com um nível de resíduos acima do aceitável, conforme observado por Chicoine et al. (2007), em um estudo realizado no Canadá. Além disso, o uso indiscriminado de LMs pode afetar negativamente o desenvolvimento da coprofauna constituindo um problema ambiental (FLOATE et al., 2002).

Com intuito de investigar o comportamento da resistência a ivermectina, acompanhou-se três populações de campo (PIQ, ZOR e APTA) sob diferentes regimes de tratamento com a droga (**Tabelas 7 e 8**).

A população PIQ teve sua primeira avaliação de resistência realizada em julho de 2004 quando foi diagnosticada como resistente (FR = 3,78) (KLAFKE et al., 2006). Ao ser informado do diagnóstico, o proprietário da fazenda interrompeu o uso de LMs para o controle de carrapatos nos animais em lactação. Entretanto, manteve o uso esporádico desta classe química exclusivamente para o tratamento ou prevenção de miíases em vacas secas e animais jovens. Seis meses depois, em janeiro de 2005, o FR foi de 1,37, categorizando a população com resistência incipiente. Nesta ocasião, a população PIQ foi isolada em laboratório (ALBUQUERQUE, 2007), mantida sob pressão de seleção com ivermectina e, em sua décima geração o FR determinado pelo TIL foi de 8,06 (KLAFKE et al., 2010). Estes resultados demonstram que, embora a população PIQ do campo tivesse passado por um período de seis meses sem exposição intensa a LMs, o(s) gene(s) que conferiam a resistência ainda persistiam. Três anos e 10 meses depois (outubro 2008) de ter sido diagnosticada com resistência incipiente e exposta apenas esporadicamente a ivermectina para tratamento de miíases, foram coletadas teleóginas sobre vacas secas tratadas 40 dias antes com ivermectina 3,15%. As larvas oriundas destas fêmeas apresentaram um FR de 2,27, revelando que mesmo após um período sem tratamento do rebanho com ivermectina para controle de

carrapatos, longo suficiente para que ao menos 15 gerações de carrapatos se sucedessem (PEREIRA; LABRUNA, 2008), o caractere de resistência persistiu na população local. Dezesseis meses depois (fevereiro de 2010), um bezerro tratado 15 dias antes com ivermectina 1% foi encontrado na mesma propriedade extremamente infestado por teleóginas. Mais uma vez foi possível detectar a presença de carrapatos resistentes na população PIQ, que demonstrou um FR de 3,37.

A resistência na população ZOR se manteve praticamente estável nos dois momentos de coleta (3,51 em janeiro e 2,33 em outubro de 2008). O rebanho havia recebido 4 aplicações de ivermectina no período de 8 meses entre as coletas de teleóginas, o que pode ter favorecido a persistência de indivíduos resistentes nesta população de carrapatos.

Informações mais detalhadas sobre o comportamento da resistência a ivermectina em uma população de carrapatos de campo foram obtidas com o monitoramento da população APTA (**Tabela 8**). Esta população foi avaliada pela primeira vez em agosto de 2005 e foi considerada com resistência incipiente (FR = 1,82), possivelmente relacionada a um número baixo de tratamentos com ivermectina até aquele momento. Vinte e cinco meses depois, em setembro de 2007 a população APTA apresentou-se como resistente, com um FR calculado em 3,29. Este aumento provavelmente deve-se ao acúmulo de uma série de exposições à droga no período. Por conta da resistência, o uso de LMs nos animais foi interrompido. Em outubro de 2008 foi conduzido um teste de eficácia da ivermectina. A progênie das teleóginas coletadas no dia do tratamento apresentaram-se com resistência incipiente (FR = 1,83). Já, as larvas provenientes das teleóginas coletadas 21 dias após o tratamento dos animais se mostraram resistentes (FR = 3,61), como resultado da seleção imposta pelo tratamento.

No teste *in vivo*, realizado com a cepa APTA, a ivermectina apresentou eficácia inferior ao mínimo exigido para o registro de produtos destinados ao controle de *R. (B.) microplus* no Brasil (BRASIL, 1997).

Os resultados do teste de eficácia a campo reiteram a eficiência diagnóstica dos bioensaios com larvas em laboratório presentemente propostos.

O acompanhamento destas três populações (PIQ, ZOR e APTA) de carrapatos possibilitou inferir sobre algumas características do comportamento da resistência a ivermectina a campo.

A interrupção do uso de ivermectina leva a uma rápida redução na frequência de indivíduos resistentes, como observado para a população PIQ (seis meses ou três gerações). O mesmo foi observado para *Lucillia cuprina* que mostrou rápida regressão de resistência a ivermectina após a interrupção da exposição à droga (RUGG et al., 1998).

O caractere que confere resistência pode permanecer em uma população de *R. (B.) microplus* por seis meses a um ano sem exposição á droga, como observado respectivamente para PIQ e APTA. Esta informação é relevante para o manejo da resistência que tem como estratégia o rodízio de classes químicas. Um estudo longitudinal mais amplo seria importante para determinar qual o número de gerações necessário para reversão completa da resistência a ivermectina em populações de carrapatos.

A manutenção da resistência pode ser influenciada pelo uso da ivermectina para o controle de outras pragas (por exemplo, *Dermatobia bovis*, *Cochliomyia hominivorax*), como observado na população PIQ. Observação semelhante foi realizada por Castro-Janer et al. (2010), que mostrou que o uso de fipronil para o controle de insetos teve influência no desenvolvimento de resistência a este acaricida em populações de carrapatos.

Para Roush e McKenzie (1987), dentre os diversos fatores que influenciam a persistência de um caractere de resistência em uma população de insetos, o custo adaptativo da resistência merece ser considerado. O custo desta adaptação seria resultado de um desvio dos processos fisiológicos basais (tais como desenvolvimento e reprodução) visando a proteção contra o inseticida (COUSTAU, CHEVILLON; FFRENCH-CONSTANT, 2000). Assim, a seleção para resistência a inseticidas pode acarretar efeitos negativos na adaptação de indivíduos resistentes em um ambiente livre do inseticida, resultando na diminuição de sua frequência. Contudo, nem sempre o desenvolvimento de resistência é acompanhado de custo adaptativo. Por exemplo, foram relatados o aumento de fecundidade em cepa de *Tribolium castaneum* resistente a OF (HAUBRUGE; ARNAUD, 2001) e o aumento de reservas energéticas de larvas de *Sitophilus zeamais* resistentes a PS (CORRÊA et al., 2011), que possibilitaram o desvio dos processos fisiológicos para a destoxificação do inseticida sem prejuízo na adaptação de indivíduos resistentes.

Para *R. (B.) microplus*, a existência de custo adaptativo associado a resistência tem sido objeto de investigação. Na Austrália, foi observada uma

diminuição considerável nos níveis de resistência ao amitraz após o inverno, período em que há uma interrupção nos tratamentos devido á diminuição natural das populações de carrapato. Segundo Jonsson e Hope (2007), é possível que a redução da resistência constatada na primavera esteja associada a um custo adaptativo. Nos Estados Unidos da América, Davey et al. (2006), constataram haver prejuízo do desempenho reprodutivo de fêmeas (determinado pela produção de ovos e eclodibilidade de larvas) da cepa resistente a OF analisada, mas não de cepas resistentes a PS e amitraz. É preciso ressaltar que as relações adaptativas resultantes de mudanças genéticas podem ser espécie-específicas ou população-específicas para um químico em particular (MCKENZIE, 1996).

A persistência de indivíduos resistentes nas populações PIQ e APTA, mesmo após um período sem exposição a ivermectina levanta a hipótese de que não exista custo adaptativo na resistência a esta droga nas populações de *R. (B.) microplus* analisadas. A análise dos parâmetros reprodutivos das cepas resistentes ZOR e M.ivm reforça esta hipótese, uma vez que os pesos dos ovos das teleóginas destas cepas resistentes foram iguais ou superiores aos das teleóginas da cepa suscetível Mozo. Assim, não parece existir um comprometimento da fertilidade das fêmeas *R. (B.) microplus* por conta da resistência a ivermectina.

No presente trabalho foram isoladas e mantidas em laboratório duas linhagens de *R. (B.) microplus* sob pressão de seleção com ivermectina. Uma derivada de uma população de campo resistente (ZOR) e outra derivada da cepa referência suscetível Mozo (M.ivm). As vantagens de estudos laboratoriais sobre resistência incluem a redução da influência do ambiente (doenças, predação, clima) e o controle da pressão seletiva e do fluxo gênico (MCKENZIE, 1996).

A partir dos experimentos com estas linhagens foi possível validar os testes diagnósticos desenvolvidos (TPL e TIL) e obter informações sobre a evolução da resistência, mecanismos envolvidos e suas características genéticas.

Os bioensaios realizados com as cepas isoladas permitiram acompanhar, com alta sensibilidade, a evolução da resistência a ivermectina. Constatou-se que houve desenvolvimento de altos níveis de resistência na cepa ZOR, com FRs calculados de 3,51 na geração inicial e de 36,34 na geração F5. Na cepa M.ivm, exposta a uma sub-dose de ivermectina, também ocorreu o desenvolvimento de resistência, porém em níveis inferiores aos obtidos para a cepa ZOR, com FRs de 1,11 na geração inicial para 1,58 na F3. A diferença observada no desenvolvimento

de resistência das duas cepas pode estar relacionada à frequência inicial de indivíduos resistentes, muito maior na cepa ZOR do que na M.ivm, derivada da cepa suscetível Mozo. O experimento com a cepa M.ivm demonstrou que variantes resistentes de uma população suscetível podem ser selecionados rapidamente através da exposição a uma concentração de ivermectina menor do que a determinada como eficaz. Em ambas as cepas foi verificada a diminuição dos valores dos slopes (**Figuras 11 e 13, Tabelas 12 e 15)** o que reflete o aumento da heterogeneidade fenotípica destas populações causada pelo aumento da frequência de indivíduos resistentes.

As curvas concentração-mortalidade obtidas através dos bioensaios com as cepas isoladas, assim como com as populações de campo **(Figuras 7, 8, 9 e 10)**, apresentaram diferentes perfis quanto aos valores de slope e de distribuição das taxas de mortalidades em determinados intervalos de concentrações. Esta constatação dá margem para especulação sobre a existência do envolvimento de mais de um mecanismo, determinados por múltiplos genes, na resistência a ivermectina em *R. (B.) microplus*. Em artrópodes resistentes a LMs foram determinados diversos mecanismos e/ ou genes de resistência: mutação de sítio alvo em cepa de *Drosophila melanogaster* (CULLY et al., 1996); aumento da expressão de transportadores ABC e de atividade de GST em isolados de *Sarcoptes scabiei* (MOUNSEY et al., 2010), aumento de atividade de P450 e/ou GST em populações de campo de *Tetranychus urticae* resistentes a abamectina (STUMPF; NAUEN, 2002) e, em uma cepa isolada de *T. urticae*, aumento de atividade de P450 e mutação no canal GluCl (KWON et al., 2010).

A teoria proposta por ffrench-Constant, Daborn e Le Goff (2004) prediz que uma vez assumido que os fenótipos de suscetibilidade a uma nova molécula tem distribuição normal em uma população de insetos, entre esses devem existir alguns indivíduos naturalmente variantes que possuem uma maior capacidade relativa de se livrar da ação tóxica do químico. A pressão seletiva para resistência, dentro ou fora da distribuição original destes fenótipos segundo a dose do inseticida, determina o número de genes de resistência selecionados. A seleção dentro desta distribuição original, por uma dose que permite a sobrevivência dos indivíduos naturalmente variantes, seleciona preferencialmente para resistência poligênica, por combinar múltiplos caracteres determinantes da resistência que têm um efeito menor (tamanho dos indivíduos, taxa de desenvolvimento e aumento de metabolismo). Por

outro lado, a seleção de indivíduos fora da distribuição original, por uma dose considerada como letal para esta população, seleciona mutações raras em genes únicos que tem um efeito maior (por exemplo mutações em sítio-alvo, superexpressão e multiplicação gênica).

Considerando esta teoria e as características farmacológicas da ivermectina, pode-se sugerir que em *R. (B.) microplus,* ocorrem a seleção de resistência monogênica e poligênica.

Resultados de um teste de estábulo obtidos por Davey et al. (2005) demonstraram redução de eficácia da ivermectina (1%, 200 µg/ Kg) no controle de cepa suscetível de *R. (B.) microplus* em bovinos infestados ao longo de quatro semanas pós-tratamento. A formulação de ivermectina mais utilizada no campo (1%, injetável) tem seu maior nível plasmático durante a primeira semana da aplicação e decai lentamente até o 30º dia pós-tratamento (LIFSCHITZ et al., 2010). Em formulações mais concentradas (3,15%) e de longa ação, a ivermectina pode apresentar pico plasmático mais alto e uma cauda decrescente de concentração ainda mais longa, de até 70 dias (DAVEY et al., 2007, 2010). A diminuição de eficácia verificada nos experimentos de Davey et al. (2005) pode estar relacionada à redução progressiva da concentração da ivermectina no plasma dos animais.

Devido a esta característica farmacológica da ivermectina, independente da concentração do produto utilizada (1%, 3,15%) os carrapatos são expostos tanto a altas como a baixas concentrações. Em um cenário de resistência, durante a primeira semana pós-tratamento, a exposição a alta concentração selecionaria os indivíduos com resistência monogênica, de efeitos maiores. Esta alta concentração é suficiente para eliminar os indivíduos suscetíveis e aqueles indivíduos variantes com resistência poligênica de efeito menor. Em seguida, conforme a concentração de ivermectina decresce, possibilita a sobrevivência de indivíduos com resistência monogênica e também de indivíduos com resistência poligênica. A partir da quarta semana até 120 dias pós-tratamento, a concentração de ivermectina circulante é insuficiente para eliminar até mesmo os suscetíveis, portanto sub-letal o que favorece a seleção de resistência poligênica.

Os bioensaios conduzidos neste trabalho com cepas isoladas (ZOR e M.ivm) trazem fortes indícios de que a hipótese de seleção monogênica e poligênica para resistência a ivermectina seja verdadeira.

A cepa ZOR, com resistência pré-selecionada no campo e mantida sob pressão seletiva em laboratório, apresentou curvas concentração-mortalidade (**Figura 11**) características de populações em processo de seleção para resistência conferida por múltiplos caracteres (MCKENZIE, 1996). Na sua quinta geração, a curva concentração-motalidade evidenciou a existência de indivíduos que sobreviveram a uma concentração (1000 ppm) aproximadamente 14 vezes maior que a concentração que matou 100% dos indivíduos da cepa Mozo suscetível (70 ppm). Teoricamente, estes indivíduos devem ser aqueles com resistência monogênica em homozigose. Entre a concentração máxima de 70 ppm, suportada pela cepa suscetível Mozo, até a concentração de 400 ppm, cerca de 60% dos indivíduos da cepa ZOR sobreviveram e devem representar indivíduos com resistência monogênica em heterozigose. Estes heterozigotos morrem quando submetidos a uma concentração que ultrapassa o limite suportado pela resistência conferida somente por um alelo. Dentro do intervalo de concentrações suportados pela cepa Mozo (2,8 a 70 ppm), uma terceira parcela da população ZOR apresenta mortalidades percentuais inferiores àquelas da cepa suscetível. Esta terceira parcela pode representar os indivíduos com resistência poligênica de efeitos menores.

A seleção de genes de efeito menor (resistência poligênica) determinada pela exposição a uma baixa concentração seletiva, pode ser inferida quando da observação das curvas concentração-mortalidade da M.ivm durante processo de seleção de resistência. Nesta população, que teve como base genética uma cepa suscetível, nota-se a existência de indivíduos variantes selecionados que conseguem, dentro do intervalo de concentrações suportado pela cepa Mozo original, sobreviver a taxas maiores que esta. Nas altas concentrações (49 a 100 ppm) a diferença de mortalidades entre a geração inicial e a F3 não foi tão pronunciada, revelando que as características selecionadas não são suficientes para garantir a sobrevivência destes indivíduos com caracteres de efeito menor em altas concentrações. De fato, em insetos cepas selecionadas em laboratório a partir de populações suscetíveis se mostram com resistência poligênica (ROUSH; MCKENZIE, 1987).

A resistência mono e/ou poligênica a ivermectina em *R. (B.) microplus* somente pode ser confirmada se forem determinados os mecanismos envolvidos e sua base genética. No presente trabalho foram abordados dois destes possíveis

mecanismos: resistência metabólica mediada por enzimas e por mutações em sítio-alvo.

A resistência metabólica foi investigada através da utilização de inibidores dos principais grupos de enzimas relacionados a resistência a inseticidas/ acaricidas: P450s; esterases e GST (**Tabela 17**; **Figuras 16** e **17**).

De acordo com os resultados obtidos, pode-se suspeitar do envolvimento de P450s na destoxificação da ivermectina, já que foi detectado um aumento de toxicidade da droga em presença do PBO em ensaios realizados com ambas as cepas, Mozo e ZOR. Entretanto, esta destoxificação mediada por P450s não necessariamente consiste no principal responsável pela resistência a ivermectina na cepa ZOR, uma vez que não houve redução importante do FR em presença deste inibidor (de 2,41 para 2,19).

Não houve sinergismo do TPP para ivermectina, portanto a participação de esterases não deve ser importante para a destoxificação desta droga em *R. (B.) microplus*.

O fator de sinergismo (FS) em presença do DEM foi maior para a cepa ZOR (FS = 1,62) do que para a cepa Mozo (FS = 1,01). Foi detectada uma diminuição do FR para ivermectina na cepa ZOR, de 2,41 para 1,59, em presença deste inibidor. Estes dados indicam o envolvimento de GST na destoxificação da ivermectina na cepa resistente. Desta forma, pode-se inferir que exista participação de GST mediando a resistência a ivermectina, porém que não se trata do principal mecanismo de resistência, já que não houve reversão total desta característica.

Os resultados obtidos com os ensaios com sinergistas neste trabalho não permitem concluir que a resistência metabólica seja o principal mecanismo de resistência a ivermectina na cepa estudade de *R. (B.) microplus*. Entretanto pode se tratar de um mecanismo secundário de efeito menor que confere vantagem adaptativa aos indivíduos resistentes.

A resistência mediada por alteração de sítio-alvo pode constituir o mecanismo principal de resistência a ivermectina em *R. (B.) microplus* já que este foi descrito em algumas espécies de nematóides e artrópodes (CULLY et al., 1994; BLACKHALL et al., 2003; KWON et al., 2010). Com objetivo de identificar alterações nucleotídicas associadas a resistência a ivermectina foram clonados e sequenciados trechos correspondentes ao domínio transmembrana do gene GluCl de *R. (B.) microplus* das

cepas Mozo e ZOR (fêmeas F4 e larvas F5) sobreviventes a tratamento com ivermectina.

A partir da tradução das sequências nucleotídicas obtidas foi possível identificar o resíduo de Glicina (G320, **Figura 19**) essencial para ligação da ivermectina. Os polimorfismos detectados nas sequências obtidas (**Figuras 20** e **21**; **ANEXOS A** e **B**) podem não estar associados com a resistência, uma vez que não determinaram alterações da sequência de aminoácidos, ou por terem ocorrido em ambas as cepas, resistente e suscetível.

No presente trabalho foi caracterizada pela primeira vez em *R. (B.) microplus* a região do gene GluCl descrita como importante para a ligação da ivermectina e onde foram encontradas mutações associadas a resistência em outras espécies. Entretanto, estudos complementares são necessários para a caracterização total deste gene o que poderá permitir avaliar outras regiões do gene em que poderiam existir pontos de mutação. Ainda, a obtenção de sua sequência completa, incluindo as regiões regulatórias, é fundamental para sua expressão em sistemas heterólogos que poderia ser usada para avaliar a importância destes canais na ação neurotóxica da ivermectina em *R. (B.) microplus* como já realizado para *Drosophila melanogaster* e *Caenorhabiditis elegans* (CULLY et al., 1996; ARENA et al., 2000)

Os resultados aqui descritos sobre os possíveis mecanismos envolvidos na resistência abrem novas perspectivas de investigação.

Técnicas de espectrofotometria para determinação de atividade das principais enzimas relacionadas a resistência poderiam ser aplicadas em populações de *R. (B.) microplus* visando estabelecer uma relação de determinado grupo enzimático com a resistência. Esta metodologia foi utilizada em outra espécie de carrapato (*Rhipicephalus bursa*) e permitiu a determinação de padrões de atividade enzimática associadas a resistência a OF (ENAYATI et al., 2009). Durante a condução do presente trabalho estas técnicas foram adaptadas para *R. (B.) microplus* (dados não mostrados). Estas serão empregadas futuramente com para determinar a correlação entre a atividade enzimática e FR para ivermectina. Espera-se, num futuro próximo, monitorar e detectar níveis enzimáticos alterados em populações de campo e conduzir estratégias de controle químico mais eficazes.

Se forem encontradas correlações significativas entre a atividade de um grupo específico de enzimas com a resistência a ivermectina, estudos de expressão de genes codificadores destas proteínas poderia ajudar na compreensão de sua

regulação e ainda auxiliar no desenvolvimento de marcadores moleculares específicos para resistência a serem utilizados no campo em programa de monitoramento.

O presente trabalho possibilitou o desenvolvimento de técnicas *in vitro* confiáveis e precisas para o diagnóstico de resistência a ivermectina em *R. (B.) microplus.* Estas vêm sendo implementadas para monitorar populações resistentes em alguns países do continente americano e demonstraram, particularmente no estado de São Paulo, que esta resistência está disseminada. Os resultados indicam que existe uso indiscriminado da ivermectina em propriedades de criação bovina, com possíveis implicações de contaminação ambiental e nos alimentos de origem animal. Informações básicas aqui obtidas sobre a evolução da resistência, em campo e em laboratório, poderão ser úteis para delinear estratégias para o seu manejo dentro de programas de controle sustentável do carrapato bovino. Finalmente, os estudos inéditos conduzidos sobre mecanismos de resistência servirão de base para o desenvolvimento de marcadores moleculares para o diagnóstico e monitoramento de resistência a lactonas macrocíclicas em *R. (B.) microplus.*

5 CONCLUSÕES

1. Os bioensaios padronizados para ivermectina (TIL e TPL) em *R. (B.) microplus* constituem ferramentas válidas no diagnóstico de resistência a esta droga.
2. O TIL mostrou-se mais sensível do que o TPL no diagnóstico de resistência a ivermectina.
3. O protocolo desenvolvido do TIA com ivermectina deverá ser validado com populações resistentes antes de sua preconização para o diagnóstico de resistência.
4. A resistência à ivermectina encontra-se amplamente distribuída em populações de *R. (B.) microplus* do estado de São Paulo.
5. O monitoramento da evolução de resistência a ivermectina em cepas isoladas e populações de campo pode ser realizada com emprego do TIL.
6. A resistência a ivermectina pôde permanecer em uma população de *R. (B.) microplus* não exposta à droga pelo período de pelo menos um ano.
7. Citocromo P450 oxidases e glutationa-S transferases têm participação na destoxificação da ivermectina, mas não constituem o principal mecanismo de resistência na cepa estudada (ZOR).
8. Trecho do gene codificador do canal de cloro controlado pelo glutamato, sítio alvo da ivermectina, foi sequenciado pela primeira vez em *R. (B.) microplus*.

REFERÊNCIAS*

ABRO, G. H.; DYBAS, R. A.; GREEN, A.; WRIGHT, D. J. Toxicity of avermectin B11 against a susceptible strain and an insecticide-resistant strain of *Plutella xylostella* (Lepidoptera: Plutellidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 81, p. 1575-1580, 1988.

ALBUQUERQUE, T. A. **Obtenção de uma cepa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistente a ivermectina.** 2007. 70 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

ALBUQUERQUE, T. A.; KLAFKE, G. M.; SABATINI, G. A.; SCHUMAKER, T. T. S. **Seleção de cepa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* para resistência à ivermectina no Brasil.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 14., 2006, Ribeirão Preto. **Anais**... Jaboticabal: Colégio Brasileiro de Parasitologia Veterinária, 2006. p. 216.

ALJANABI, S. M; MARTINEZ, I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques. **Nucleic Acids Res.**, v. 25, p. 4692-4693, 1997.

ANALYSTSOFT. **StatPlus:mac programa de análise estatística.** Versão 2009.

ARENA, J. P.; LIU, K. K.; PARESS, P. S.; SCHAEFFER, J. M.; CULLY, D. F. Expression of a glutamate-activated chloride current in *Xenopus* oocytes injected with *Caenorhabditis elegans* RNA: evidence for modulation by avermectin. **Brain Res. Mol. Brain Res.** v. 15, p. 339-348, 1992.

ARGENTINE, J. A.; CLARK, J. M.; LIN, H. Genetics and biochemical mechanisms of abamectin resistance in two isogenic strains of Colorado potato beetle. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**., v. 44, p. 191-207, 1992.

BAXTER, G. D.; BARKER, S. C. Analysis of the sequence and expression of a second putative acetylcholinesterase cDNA **from** organophosphate-susceptible and organophosphate-resistant cattle ticks. Insect Biochem. Mol. Biol., v. 32, p. 815-820, 2002.

BAXTER, G. D.; BARKER, S. C. Isolation of a cDNA for an octopamine-like, G-protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Ins. Biochem. Mol. Biol.**, v. 29, p 461-467, 1999.

BAXTER, G. D.; GREEN, P.; STUTTGEN, M.; BARKER, S. C. Detecting resistance to organophosphates and carbamates in the cattle tick *Boophilus microplus*, with a propoxur-based biochemical test. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 23, p. 907-914, 1999.

BENAVIDES, E.; RODRÍGUEZ, J. L.; ROMERO, A. Isolation and partial characterization of the montecinos strain of *Boophilus microplus* (Canestrini 1877) multiresistant to different acaricides. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v. 916, p. 668–671, 2000.

---

* ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 6023:** Informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002.

BLACKHALL, W. J.; POULIOT, J. F.; PRICHARD, R. K.; BEECH, R. N. *Haemonchus contortus*: selection at a glutamate-gated chloride channel gene in ivermectin- and moxidectin-selected strains. **Exp. Parasitol.**, v. 90, p. 42-48, 1998.

BLACKHALL, W. J.; PRICHARD, R. K.; BEECH R. N. Selection at a γ-aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/ milbemycins. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 131, p. 137-145, 2003.

BLOOMFIELD, G. **Endoparasites**: The Veterinary Market. Richmond. Reino Unido: PJB Publications, 1988. 160 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico para licenciamento e/ ou renovação de licença de produtos antiparasitários de uso veterinário. Portaria No. 48/97 Secretaria de Defesa Agropecuaria. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**. Brasilia, DF, 16 maio 1997.

BURG, R. W.; STAPLEY, E. O. Isolation and characterisation of the producing organism in Ivermectin and Abamectin In: CAMPBELL, W.C. (Ed.). **Ivermectin and Abamectin**. New York: Springer, 1989. p. 24-32.

CASTRO-JANER, E.; RIFRAN, L.; PIAGGIO, J.; GIL, A.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T.T. In vitro tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. **Vet. Parasitol.**, v. 162, p. 120-128, 2009a.

CASTRO-JANER, E; RIFRAN, L; GONZÁLEZ, P; PIAGGIO, J; GIL, A; SCHUMAKER, T. T. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays. **Vet. Parasitol.**, v. 169, p. 172-177, 2009b.

CASTRO-JANER, E.; MARTINS, J. R.; MENDES, M. C.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G. M.; SCHUMAKER, T. T. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. **Vet. Parasitol.**, v. 173, p. 300-306, 2010.

CASTRO-JANER, E.; RIFRAN, L.; GONZÁLEZ, P.; NIELL, C.; PIAGGIO, J.; GIL, A.; SCHUMAKER, T. T. Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. **Vet. Parasitol.** 2011. In press.

CHEESEMAN, C. L.; DELANY, N. S.; WOODS, D. J.; WOLSTENHOLME, A. J. High-affinity ivermectin binding to recombinant subunits of the *Haemonchus contortus* glutamate-gated chloride channel. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 114, p. 161-168, 2001.

CHICOINE, A. L.; DURDEN, D. A.; MACNAUGHTON, G.; DOWLING, P. M. Ivermectin use and resulting milk residues on 4 Canadian dairy herds. **Can. Vet. J.**, v. 48, p. 836-838, 2007.

CLARK, J. K.; SCOTT, J. G.; CAMPOS, F.; BLOOMQUIST, J. R. Resistance to Avermectins: Extent, Mechanisms, and Management Implications. **Ann. Rev. Entomol.**, v. 40, p. 1-30, 1994.

CLC BIO. CLC Main Workbench: Release 5.1.7: Aarhus, Dinamarca: CLC Bio, 2010.

COBON, G. S.; WILLADSEN, P. Vaccines to prevent cattle tick infestations. In: WOODROW, G. C.; LEVINE, M. M. **New Generation Vaccines**. New York: Marcel Dekker, 1990. p. 901-917.

CONWAY, G. R.; COMINS, H. N. Resistance to pesticides. 2. Lessons in strategy from mathematical models. **Span**, v. 22, n.2 p. 53-55, 1979.

CORRÊA, A. S.; TOLLEDO, J.; PEREIRA, E. J. G.; GUEDES, R. N. C. Bidirectional selection for body mass and correlated response of pyrethroid resistance and fitness in *Sitophilus zeamais*. **J. Applied Entomology**, v. 135, p. 285-292, 2011.

COUSTAU, C.; CHEVILLON, C.; FFRENCH-CONSTANT, R. Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? **Trends Ecol. Evol.**, v. 15, p. 378-383, 2000.

CULLY, D. F.; VASSILATIS, D. K.; LIU, K. K.; PARESS, P. S.; VAN DER PLOEG, L. H. T.; SCHAEFFER, J. M.; ARENA, J. P. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channels from *Caenorhabditis elegans*. **Nature**, v. 371, p. 707-711, 1994.

CULLY, D. F.; PARESS, P. S.; LIU, K. K.; SCHAEFFER, J. M.; ARENA, J. P. Identification of a *Drosophila melanogaster* glutamate-gated chloride channel sensitive to the antiparasitic agent avermectin. **J. Biol. Chem.**, v. 271, p. 20187-20191, 1996.

CURRIE, B. J.; HARUNAL, P.; MCKINNON, M.; WALTON, S. F. First documentation of in vivo and in vitro ivermectin resistance in *Sarcoptes scabiei*. **Clin. Infect. Dis.**, v. 39, p. e8-e12, 2004.

DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; MILLER, R. J. Comparison of the reproductive biology between acaricide-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol.**, v. 139, p. 211-220, 2006.

DAVEY, R. B.; MILLER, J. A.; GEORGE, J. E.; KLAVONS, J. A. Efficacy of a single doramectin injection against adult female *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in the final stages of engorgement before detachment. **J. Med. Entomol.**, v. 44, p. 277-182, 2007.

DAVEY, R. B.; MILLER, J. A.; GEORGE, J. E.; MILLER, R. J. Therapeutic and persistent efficacy of a single injection treatment of ivermectin and moxidectin against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on infested cattle. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 35, p. 117-129, 2005.

DAVEY, R. B.; POUND, J. M.; MILLER, J. A.; KLAVONS, J. A. Therapeutic and persistent efficacy of a long-acting (LA) formulation of ivermectin against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and sera concentration through time in treated cattle. **Vet. Parasitol.**, v. 169, p. 149-156, 2010.

DRUMMOND, R. O.; CRUST, S. F.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. **J. Econ. Entomol.**, v. 66, p. 130-133, 1973.

ENAYATI, A. A.; ASGARIAN, F.; SHARIF, M.; BOUJHMEHRANI, H.; AMOUEI, A.; VAHEDI, N.; BOUDAGHI, B.; PIAZAK, N.; HEMINGWAY, J. Propetamphos resistance in *Rhipicephalus bursa* (Acari, Ixodidae). **Vet. Parasitol.**, v. 162, p. 135-141, 2009.

ENG, J. K.; BLACKHALL, W. J.; OSEI-ATWENEBOANA, M. Y.; BOURGUINAT, C.; GALAZZO, D.; BEECH, R. N.; UNNASCH, T.R.; AWADZI, K.; LUBEGA, G.W.; PRICHARD, R.K. Ivermectin selection on beta-tubulin: evidence in *Onchocerca volvulus* and *Haemonchus contortus*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 150, p. 229-235, 2006.

ESTRADA-PEÑA, A.; BOUATTOUR, A.; CAMICAS, J. L.; GUGLIELMONE, A.; HORAK, I.; JONGEJAN, F.; LATIF, A.; PEGRAM, R.; WALKER A. R. The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. **Exp. App. Acarol.**, v. 38, p. 219-235, 2006.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION (FAO) (Roma, Itália). **Resistance management and integrated parasite control in ruminants**: Guidelines. Roma: Food and Agriculture Organisation, Animal Production and Health Division, 2004. 53 p.

FFRENCH-CONSTANT, R. H.; DABORN, P. J.; LE GOFF, G. The genetics and genomics of insecticide resistance. **Trends Genet.**, v. 20, p. 163-70, 2004.

FINNEY, D. J. **Probit Analysis**. 3rd ed. Cambridge: Cambridge University Press, 1980.

FISHER, M. H.; MROZIK, H. Chemistry in Ivermectin and Abamectin In: CAMPBELL, W.C. (Ed.) **Ivermectin and Abamectin**. New York: Springer, 1989. p. 1-23.

FLOATE, K. D.; COLWELL, D. D.; FOX, A. S. Reductions of non-pest insects in dung of cattle treated with endectocides: a comparison of four products. **Bull. Entomol. Res.**, v. 92, p. 471-481, 2002.

FOIL, L. D.; COLEMAN, P.; EISLER, M.; FRAGOSO-SANCHEZ, H.; GARCIA-VAZQUEZ, Z.; GUERRERO, F. D.; JONSSON, N. N.; LANGSTAFF, I. G.; LI, A. Y.; MACHILA, N.; MILLER, R. J.; MORTON, J.; PRUETT, J. H., TORR, S. Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. **Vet. Parasitol.**, v. 125, p.163-181, 2004.

FORTES, E. *Boophilus microplus* (Canestrini 1887). In: FORTES, E. **Parasitologia Veterinária**. 3. ed. São Paulo: Ícone, 1997. p. 580-584.

GEARY, T. G.; SIMS, S. M.; THOMAS, E. M.; VANOVER, L.; DAVIS, J. P.; WINTERROWD, C. A.; KLEIN, R. D.; HO, N. F.; THOMPSON, D. P. *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. **Exp. Parasitol.**, v. 77, p. 88-96, 1993.

GEORGE, J. E. Present and future technologies for tick control. **Ann. NY Acad. Sci.** v. 916, p. 583-588, 2000.

GRISI, L.; MASSARD, C. L.; MOYA-BORJA, G. E.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **Hora Vet.**, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.

GUERRERO, F. D.; PRUETT, J. H. Status and future prospects for molecular diagnosis of acaricide resistance in *Boophilus microplus*. **Trends Entomol.**, v. 3, p. 97-103, 2003.

GUERRERO, F. D.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J. Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 38, n. 1, p. 44-50, 2001.

HAUBRUGE, E.; ARNAUD, L. Fitness consequences of malathion-specific resistance in red flour beetle (Coleoptera: Tenebrionidae) and selection for resistance in the absence of malathion. **J. Econ. Entomol.**, v. 94, p. 552-557, 2001.

HENNESY, D. R. Physiology, pharmacology and parasitology. **Int. J. Parasitol.**, v. 27, p.145-52, 1997.

HERNANDEZ, R.; HE, H.; CHEN, A. C.; IVIE, G. W.; GEORGE, J. E. Cloning and Sequencing of a Putative Acetylcholinesterase cDNA from *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 36, p. 764-770, 1999.

HOLDSWORTH, P. A.; KEMP, D.; GREEN, P.; PETER, R. J.; DE BRUIN, C.; JONSSON, N.N.; LETONJA, T.; REHBEIN, S.; VERCRUYSSE, J. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) Guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. **Vet. Parasitol**., v. 136, p. 29-43, 2006.

HOPE, M.; MENZIES, M.; KEMP, D. Identification of a dieldrin resistance-associated mutation in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 103, p. 1355-1359, 2010.

JONSSON, N. N.; HOPE, M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick **Boophilus microplus**. **Vet. Parasitol.**, v. 146, p. 193-198, 2007.

JONSSON, N. N; MILLER, R. J; ROBERTSON, J. L. Critical evaluation of the modified-adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates. **Vet. Parasitol.**, v. 146, p. 307-315, 2007.

KANE, N. S.; HIRSCHBERG, B.; QIAN S. Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are target for the antiparasitic nodulospuric acid and ivermectin. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 97, p. 13949-13954, 2000.

KLAFKE, G. M. **Resistência a lactonas macrocíclicas em populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE) do Estado de São Paulo, Brasil: Diagnóstico por bioensaios.** 2006. 64 f. Dissertação (Mestrado em Biologia da Relação Patógeno-Hospedeiro) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

KLAFKE, G. M.; DE ALBUQUERQUE, T. A.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. T. Selection of an ivermectin-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 168, p. 97-104, 2010.

KLAFKE, G. M.; SABATINI, G. A.; ALBUQUERQUE, T. A., MARTINS, J. R.; KEMP, D. H.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. T. S. Larval Immersion Tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 142, p. 386-390, 2006.

KUNZ, S. E.; KEMP, D. H. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. **Rev. Sci. Technol. OIE.** v. 13, p. 1249–1286, 1994.

KWON, D. H; YOON, K. S; CLARK, J. M; LEE, S. H. A point mutation in a glutamate-gated chloride channel confers abamectin resistance in the two-spotted spider mite, *Tetranychus urticae* Koch. **Insect Mol. Biol.**, v. 19, p. 583-591, 2010.

LEES, K.; BOWMAN, A.S. Tick neurobiology: recent advances and the post-genomic era. **Invert. Neurosci.**, v. 7, p. 183-198, 2007.

LEORA SOFTWARE. **Polo Plus Probit and Logit Analysis**: User´s Guide. Berkeley, CA, USA. 2004. 36 p.

LI, A. Y.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J.; GEORGE, J. E. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae), **J. Med. Entomol.**, v. 41, n. 2, p. 193–200, 2004.

LI, X; SCHULER, M. A; BERENBAUM, M. R. Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 52, p. 231-253, 2007.

LIFSCHITZ, A.; SUAREZ, V. H.; SALLOVITZ, J.; CRISTEL, S. L.; IMPERIALE, F.; AHOUSSOU, S.; SCHIAVI, C.; LANUSSE, C. Cattle nematodes resistant to macrocyclic lactones: comparative effects of P-glycoprotein modulation on the efficacy and disposition kinetics of ivermectin and moxidectin. **Exp. Parasitol.**, v. 125, p. 172-178, 2010.

LIU, N.; YUE, X. Insecticide resistance and cross-resistance in the house-fly (Diptera: muscidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 93, p. 1269-1275, 2000.

LUDMERER, S. W.; WARREN, V. A.; WILLIAMS, B. S.; ZHENG, Y.; HUNT, D. C.; AYER, M. B.; WALLACE, M. A.; CHAUDHARY, A. G.; EGAN, M. A.; MEINKE, P. T.; DEAN, D. C.; GARCIA, M. L.; CULLY, D. F.; SMITH, M. M. Ivermectin and nodulisporic acid receptors in *Drosophila melanogaster* contain both gamma-aminobutyric acid-gated Rdl and glutamate-gated GluCl alpha chloride channel subunits. **Biochemistry**, v. 41, p. 6548-6560, 2002.

LYNAGH, T.; LYNCH, J. W. A glycine residue essential for high ivermectin sensitivity in Cys-loop ion channel receptors. **Int. J. Parasitol.,** v. 40, p. 1477-1481, 2010.

MARTINS, J. R.; FURLONG J. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. **Vet. Rec.**, v. 149, n. 2, p. 64, 2001.

MCCOSKER, P. J. Ticks in a changing world – Comments. Roma. Disponível em: [http://www.fao.org/ag/AGAinfo/resources/documents/WAR/war/U9550B/u9550b01.htm#ticks%20in%20a%20changing%20world]. Acesso em: 05 jul. 2006.

MCKENZIE, J. A. **Ecological and Evolutionary Aspects of Insecticide Resistance**. R.G. Landes Company, Austin, TX, EUA. 1996. 185 p.

MENDES, M. C.; LIMA, C. K.; NOGUEIRA, A. H.; YOSHIHARA, E.; CHIEBAO, D. P.; GABRIEL, F. H.; UENO, T. E.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G. M. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyriphos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.**, 2011. In press.

MICROSOFT. **Microsoft® Excel® 2004 for Mac**: Release 11.5.5. Redmond, WA: Microsoft Corporation, 2004.

MILLER, R. J.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 36, p. 533-538, 1999.

MILLER, R. J.; GEORGE, J. E.; GUERRERO, F.; CARPENTER, L.; WELCH, J. B. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panama. **J. Med. Entomol.**, v. 38, p. 298-302, 2001.

MOLENTO, M. B.; DEPNER, R. A.; MELLO, M. H. Suppressive treatment of abamectin against *Dictyocaulus viviparus* and the occurrence of resistance in first-grazing-season calves. **Vet. Parasitol.**, v. 141, p. 373-376, 2006.

MOUNSEY, K. E.; PASAY, C. J.; ARLIAN, L. G.; MORGAN, M. S.; HOLT, D. C.; CURRIE, B. J.; WALTON, S. F.; MCCARTHY, J. S. Increased transcription of Glutathione S-transferases in acaricide exposed scabies mites. **Parasite Vectors**. v. 18, p. 3-43, 2010.

MURRELL, A.; BARKER, S. C. Synonymy of *Boophilus* Curtice, 1891 with *Rhipicephalus* Koch, 1844 (Acari: Ixodidae). **Syst. Parasitol.**, v. 56, p. 169-172, 2003.

MURRELL, A.; CAMPBELL, N. J. H.; BARKER, S. C. A total-evidence phylogeny of ticks provides insights into the evolution of life cycles and biogeography. **Mol. Phylogenet. Evol.**, v. 21, p. 244-258, 2001.

NICASTRO, R. L.; SATO, M. E.; DA SILVA, M. Z. Milbemectin resistance in *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae): selection, stability and cross-resistance to abamectin. **Exp. Appl. Acarol.**, v. 50, p. 231-241, 2010.

NJUE, A. I.; PRICHARD, R. K. Genetic variability of glutamate-gated chloride channel genes in ivermectin-susceptible and -resistant strains of *Cooperia oncophora*. **Parasitology**, v. 129, p. 741-751, 2004.

PEREIRA, M. C. Taxonomia do subgênero *Boophilus* e das suas espécies. In: PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus***: Biologia, Controle e Resistência. São Paulo: Med Vet Livros, 2008. p. 7-14.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. In: PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus***: Biologia, Controle e Resistência. São Paulo: Med Vet Livros, 2008. p. 15-55.

PEREZ-COGOLLO, L. C.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; RAMIREZ-CRUZ, G. T.; MILLER, R. J. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. **Vet. Parasitol.**, v. 168, p.165-169, 2010a.

PEREZ-COGOLLO, L. C.; RODRIGUEZ-VIVAS, R. I.; RAMIREZ-CRUZ, G. T.; ROSADO-AGUILAR, J. A. Survey of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin at cattle farms with history of macrocyclic lactones use in Yucatan, Mexico. **Vet. Parasitol.**, v. 172, p.109-113. 2010b.

ROUSH, R. T. Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. **Parasitol. Today**, v. 9, n. 5, p. 174-179, 1993.

ROUSH, R. T.; MCKENZIE, J. A. Ecological genetics of insecticide and acaricide resistance. **Annu. Rev. Entomol.**, v. 32, p. 361-80, 1987.

RUGG, D.; KOTZE, A. C.; THOMPSON, D. R.; ROSE, H. A. Susceptibility of laboratory-selected and field strains of the *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) to ivermectin. **J. Econ. Entomol.**, v. 91, p. 601-607, 1998.

SABATINI, G. A.; KEMP, D. H.; HUGHES, S.; NARI, A.; HANSEN, J. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vet. Parasitol.**, v. 95, p. 53-62, 2001.

SAMBROOK, J; FRITSCH, E.F; MANIATIS, T. Cloning Vectors In: MANIATIS, T. **Molecular Cloning:** a Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1989. p. 121-132.

SATTLER, P. W.; HILBURN, L. R.; DAVEY, R. B.; GEORGE, J. E.; AVALOS, J. R. Genetic similarity and variability between natural populations and laboratory colonies of north american *Boophilus* (Acari: Ixodidae). **J. Parasitol.**, v. 72, n. 1, p. 95-100, 1986.

SCOTT, J. A. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. **Fla. Entomol.**, v. 78, p. 399-414, 1995.

SCOTT, J. G. Investigating mechanisms of insecticide resistance: methods, strategies, and pitfalls. In: TABASHNIK, B. E.; ROUSH, B. E. **Pesticide Resistance in Arthropods.** New York: Chapman & Hall, Inc., 1990. p. 39-57.

SCOTT, J. G. Toxicity of abamectin and hydramethylnon to insecticide-susceptible and resistant strains of German cockroach (Dictyoptera: Blatellidae). **J. Agric. Entomol.**, v. 8, p. 77-82, 1991.

SCOTT, J. G.; ROUSH, R. T.; LIU, N. Selection of high levels of permethrin resistance in the house fly. **Pestic. Sci.**, v. 17, p. 195-206, 1991.

SHAW, R. D. Culture of an organophosphorus resistent strain of Boophilus microplus (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum. **Bull. Entomol. Res.**, v. 56, n. 4, p. 398-405, 1966.

SHOOP, W. L. Ivermectin Resistance. **Parasitol. Today**, v. 9, p. 154-159, 1993.
SINDICATO NACIONAL DA INDÚSTRIA DE PRODUTOS PARA SAÚDE ANIMAL (SINDAN). Mercado veterinário por classe terapêutica e espécie animal. São Paulo, SP. Disponível em [http://www.sindan.org.br]. Acesso em: 25 maio 2006.

SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R. Molecular mechanisms of insecticide resistance. In: TABASHNIK, B. E.; ROUSH, B. E. **Pesticide Resistance in Arthropods.** New York: Chapman & Hall, Inc., 1990. p. 58-96.

STATACORP. Stata Statistical Sofware: Release 10. College Station, TX: StataCorp LP.2007, 1 CD-ROM.

STONE, B. F. A review of the genetics of resistance to acaricidal organochlorine and organophosphorous compounds with particular reference to the cattle tick *Boophilus microplus*. In: WHITEHEAD, G. B.; GIBSON, J.D. **Tick biology and control.** Grahamstown: Rhodes University, 1981. p. 95-102.

STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Bull. Entomol. Res.**, v. 53, p. 563-578, 1962.

STONEHAM, S.; COLES, G. Ivermectin resistance in *Parascaris equorum*. **Vet. Rec.**, v. 158, p. 572, 2006.

STUMPF, N.; NAUEN, R. Biochemical markers linked to abamectin resistance in *Tetranyus urticae* (Acari: Tetranychidae). **Pestic. Biochem. Physiol.**, v. 72, p. 111-121, 2002.

VILLARINO, M. A.; WAGHELA, S. D.; WAGNER, G. G. Biochemical detection of esterases in the adult female integument of organophosphate-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **J. Med. Entomol.**, v. 40, p. 52-57, 2003.

WU, G.; JIANG, S.; MIYATA, T. Effects of synergists on toxicity of six insecticides in parasitoid *Diaretiella rapae* (Hymenoptera: Aphidiidae). **J. Econ. Entomol.**, v. 97, p. 2057-2066, 2004.

YATES, D. M.; PORTILLO, V.; WOLSTENHOLME, A. J. The avermectin receptors of *Haemonchus contortus* and *Caenorhabditis elegans*. **Int. J. Parasitol.**, v. 33, p. 1183-1193, 2003.

ZHANG, Z.; SCHWARTZ, S.; WAGNER, L.; MILLER, W. A greedy algorithm for aligning DNA sequences. **J. Comput. Biol.**, v. 7, p. 203-214, 2000.

ANEXOS

ANEXO A – Alinhamento de sequências de DNA de *R. (B.) microplus* das cepas Mozo e ZOR com EST de *R. (B) microplus*. A sequência da cepa Mozo foi determinada a partir de 10 diferentes indivíduos. Os sítios de ligação de oligonucleotídeos utilizados (5F e 5R) estão identificados nas caixas cor-de-rosa. As regiões de mutação para outras espécies e os códons codificadores de glicina estão identificados nas linhas verticais. Sequências obtidas a partir de cinco clones de cada amostra.

```
                                   20                      40                      60                      80
R. microplus (EST) GAGTTTATCC TTTCGATAAA CAATCTGCTT CATCGTCATG GTGAGCTATG GTACACAACA GACGACTGTT TTCTTATGAA 80
Mozo               ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-1            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-2            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-4            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-6            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-11           ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-12           ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
Conservation

                                  100          Primer 4/5 F 120                     140                     160
R. microplus (EST) AGAGGGGAAT CCTGTACAGT CACGAAAAAT CTCCACTTGC CACGTTTCAC GCTGGAAAGG TTCCAAACCG ACTACTGCAC 160
Mozo               ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-1            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-2            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-4            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-6            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-11           ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-12           ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
Conservation

                                  180                     200 L256F (C. oncophora IVM-R) 220 Primer 5 F 240
R. microplus (EST) CAGTCGGACC AACACTGGCG AGTACAGCTG CTTGCGCGTG GACCTGGTGT TCAAGCGCGA GTTCAGCTAC TACCTGATCC 240
Mozo               ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-1            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-2            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-4            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF4-6            ---------- ------.... .......... .......... ....W..... .......... .......... .......... 64
ROZF4-11           ---------- -------... .......N.. ...A...... .......... .......... .......... ...N...... 63
ROZF4-12           ---------- ------.... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 64
Conservation

                   Primer 5 F                 260                     280                     300                     320
R. microplus (EST) AGATCTACAT CCCGTGCTGC ATGCTGGTCA TCGTGTCCTG GGTGTCGTTC TGGCTCGACC CCACCTCGAT CCCGGCGCGA 320
Mozo               ---------- --------.. .......... .......... .......... .......... .......... .......... 62
ROZF4-1            ---------- --------.. .......... .......... .......... .......... .......... .......... 62
ROZF4-2            ---------- --------.. .......... .......... .......... .......... .......... .......... 62
ROZF4-4            ---------- --------.. .......... .......... .......... .......... .......... .......... 62
ROZF4-6            .......... .......W.. .......... .......... .......... .......... .......... .......... 144
ROZF4-11           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 143
ROZF4-12           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 144
Conservation

                   G-I                340                     360 G-II                380 P299S (D. melanogaster IVM-R) 400
R. microplus (EST) GTGTCGCTGG GCGTCACCAC CCTGCTCACC ATGGCTACAC AGATATCGGG CATCAACGCC TCGCTGCCTC CCGTTTCCTA 400
Mozo               .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 142
ROZF4-1            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 142
ROZF4-2            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 142
ROZF4-4            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 142
ROZF4-6            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 224
ROZF4-11           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 223
ROZF4-12           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 224
Conservation

                                   G-III
                                   G323D (T. urticae ABM-R)
                                   420                     440 G-IV                460                     480
R. microplus (EST) CACCAAGGCC ATTGACGTGT GGACCGGCGT CTGTCTGACC TTCGTATTCG GCGCGCTCCT CGAGTTCGCC CTGGTCAACT 480
Mozo               .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 222
ROZF4-1            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 222
ROZF4-2            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 222
ROZF4-4            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 222
ROZF4-6            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ---------- 294
ROZF4-11           .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... ---------- 293
ROZF4-12           .......... .......... .......... .......... ---------- ---------- ---------- ---------- 263
Conservation
```

(continua)

```
                                                                   Primer 4/5 R
                                                                 Primer 5 R
                                   500                     520                     540                     560
R. microplus (EST)  ACGCCTCGCG GTCAGATTCA CGCCGGCAGA ACACGCAGAA GCAGAAGCAG A--GGAAATG GGAGCTCGAG CCACCCCTGG 558
Mozo                .......... .......... .A........ .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-1             .........A .......... .A........ .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-2             .......... .......... .A........ .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-4             .........A .......... .A........ .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-6             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 294
ROZF4-11            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 293
ROZF4-12            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
Conservation

                                   580                     600                     620                     640
R. microplus (EST)  ACTCGGACCA CCTGGAGGAC GGCGCCACCA CATTCGCCAT GAGGCCGCTG GTGCACCACC ACGGCGAGTT GCACGCCGAC 638
Mozo                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-1             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-2             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-4             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-6             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 294
ROZF4-11            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 293
ROZF4-12            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
Conservation

                                   660                     680                     700                     720
R. microplus (EST)  AAGCTGCGGC AGTGCGAAGT GCACATGAAG ACCCCCAAGA CGAACCTTTG CAAGGCCTGG CTTTCCAGGT TTCCCACGCG 718
Mozo                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-1             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-2             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-4             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-6             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 294
ROZF4-11            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 293
ROZF4-12            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
Conservation

                                   740                     760                     780                     800
R. microplus (EST)  ATCCAAACGC ATCGACGTCG TCTCGCGGAT TTTCTTTCCG CTCATGTTCG CCCTCTTCAA CCTCGTTTAC TGGACAACCT 798
Mozo                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-1             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-2             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-4             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-6             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 294
ROZF4-11            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 293
ROZF4-12            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
Conservation

                                   820                 3'UTR 840                     860                     880
R. microplus (EST)  ACCTCTTCCG GGAAGACAAG GAAGACGAGT GACAGAACAC GAACGCCACG ACAGCCGCCA TCCGACACCA TCGTCACTAC 878
Mozo                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-1             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-2             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-4             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-6             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 294
ROZF4-11            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 293
ROZF4-12            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
Conservation

                    3'UTR                  900                     920                     940                     960
R. microplus (EST)  GGACACGCAC TCTGTCGCGC GCGCACACCA CGAAGACCGG CGCGCCCGCC TCGCGTGGGC CGCTGAAGAA CCCGGGAGCC 958
Mozo                .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-1             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-2             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-4             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
ROZF4-6             .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 294
ROZF4-11            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 293
ROZF4-12            .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... .......... 263
Conservation
```

(continua)

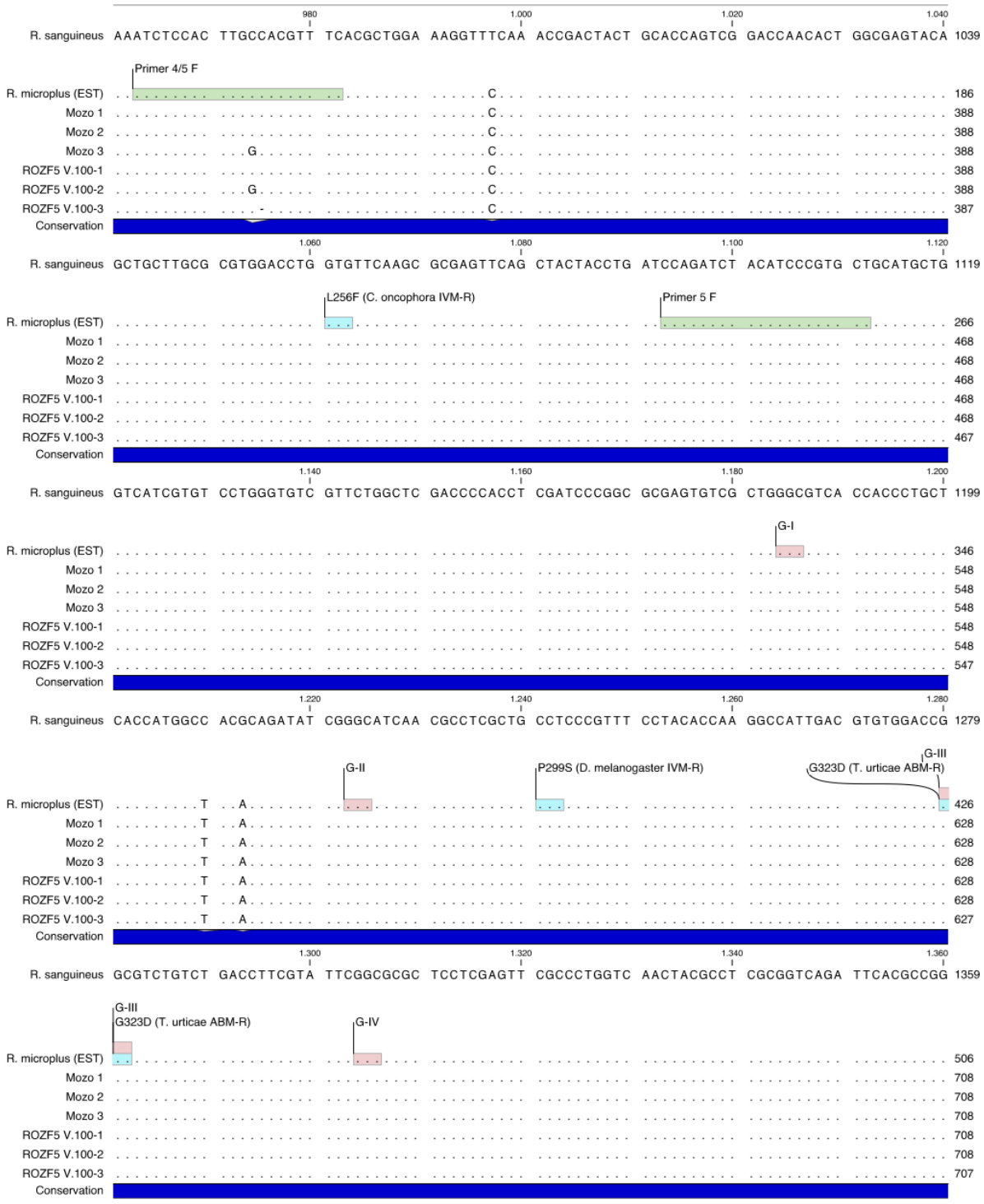
```
                 3'UTR                    980                       1.000                     1.020                     1.040
R. microplus (EST) GGTTGGCGGG GTGGGCCTAC ACGCCCCGGC CACTCGCTTC CTCATCCTCC GTGCACGCTC GAATCGTCAT AGCCACAGCC 1038
Mozo               ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 263
ROZF4-1            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 263
ROZF4-2            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 263
ROZF4-4            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 263
ROZF4-6            ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 294
ROZF4-11           ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 293
ROZF4-12           ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 263
Conservation
```

```
                 3'UTR                    1.060
R. microplus (EST) AGAAAAAAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1064
Mozo               ---------- ---------- ------ 263
ROZF4-1            ---------- ---------- ------ 263
ROZF4-2            ---------- ---------- ------ 263
ROZF4-4            ---------- ---------- ------ 263
ROZF4-6            ---------- ---------- ------ 294
ROZF4-11           ---------- ---------- ------ 293
ROZF4-12           ---------- ---------- ------ 263
Conservation
```

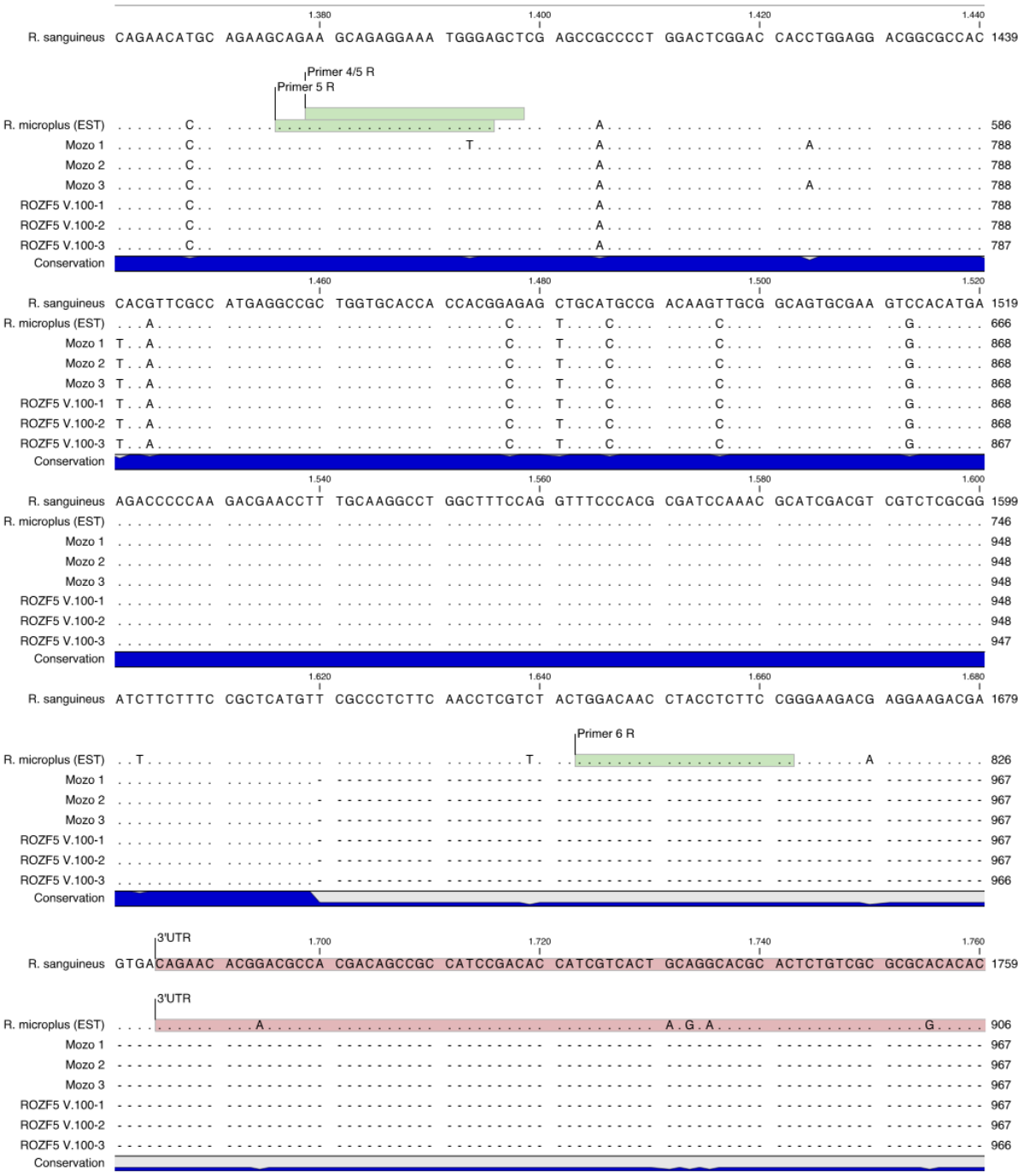
ANEXO B – Alinhamento de sequências de cDNA de *R. (B.) microplus* das cepas Mozo e ZOR com EST de *R. (B) microplus*. Material genômico obtido de *pools* (3 x 50 indivíduos) de larvas das cepas Mozo mortas e ROZF5 sobreviventes, ao tratamento com ivermectina 100ppm. Os sítios de ligação de oligonucleotídeos utilizados (Rs1F e 6R) estão identificados nas caixas azuis. As regiões de mutação para outras espécies e os códons codificadores de glicina estão identificados nas linhas verticais. Sequências obtidas a partir de cinco clones de cada amostra.

```
                                   500                                 520                                 540                                 560
R. sanguineus       TATGACTGCA GGATCCGGCC CATGGGAATT AACAACACAG ACGGGCCGGC TCTTGTACGC GTTAACATCT TTGTAAGAAG 560
R. microplus (EST)  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
Mozo 1              ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
Mozo 2              ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
Mozo 3              ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF5 V.100-1       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF5 V.100-2       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF5 V.100-3       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
Conservation

                                   580                 Primer Rs1F 600                     620                                 640
R. sanguineus       TATCGGCAGA ATTGATGACG TCACCATGGA GTACACAGTG CAAATGACGT TCAGAGAGCA GTGGCGGGAC GAGAGACTCC 640
R. microplus (EST)  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
Mozo 1              ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
Mozo 2              ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
Mozo 3              ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF5 V.100-1       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF5 V.100-2       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
ROZF5 V.100-3       ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
Conservation

                                   660                 680                     700                                 720
R. sanguineus       AGTACGACGA CT-TGGGCGG CCAGGTTCGC TACCTGACGC TCACCGAACC GGACAAGCTT TGGAAGCCGG ACCTGTTTTT 719
R. microplus (EST)  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
Mozo 1              ---------- --C....... ......G... .......... .......... .......... .......... ....T..C.. 68
Mozo 2              ---------- --C....... ......G... .......... .......... .......... .......... ....T..C.. 68
Mozo 3              ---------- --C....... ......G... .......... .......... .......... .......... ....T..C.. 68
ROZF5 V.100-1       ---------- --C....... ......G... .......... .......... .......... .......... ....T..C.. 68
ROZF5 V.100-2       ---------- --C....... ......G... .......... .......... .......... .......... ....T..C.. 68
ROZF5 V.100-3       ---------- --C....... ......G... .......... .......... .......... .......... ....T..C.. 68
Conservation

                                   740                 760                     780                                 800
R. sanguineus       CTCCAACGAG AAAGAGGGAC ACTTCCACAA CATCATCATG CCCAACGTGC TTCTACGCAT ACATCCCAAC GGCGACGTTC 799
R. microplus (EST)  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- -
Mozo 1              .......... .......... .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... 148
Mozo 2              .......... .......... .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... 148
Mozo 3              .......... .......... .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... 148
ROZF5 V.100-1       .......... .......... .......N.. .......... .......... .......A.. .......... .......... 148
ROZF5 V.100-2       .......... .......... .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... 148
ROZF5 V.100-3       .......... .......... .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... 148
Conservation

                                   820                 840                     860                                 880
R. sanguineus       TCTTCAGCAT CAGAATATCC TTGGTGCTTT CATGTCCGAT GAACCTGAAA TTTTATCCTT TGGATAAACA AATCTGCTCT 879
R. microplus (EST)  ---------- ---------- ---------- ---------- --------G. G......... .C........ .-......TC 31
Mozo 1              .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... .......... .......... 228
Mozo 2              .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... .......... .......... 228
Mozo 3              .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... .......... .......... 228
ROZF5 V.100-1       .......... .......... .........N. .......A.. .......... .......... .......... .......... 228
ROZF5 V.100-2       .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... .......... .......... 228
ROZF5 V.100-3       .......... .......... .......... .......A.. .......... .......... .......... .......... 228
Conservation

                                   900                 920                     940                                 960
R. sanguineus       ATCGTCATGG TGAGCTATGG GTATACAACA GAGGACCTGG TGTTTCTATG GAAAGAGGGG GATCCTGTAC AGGTCACAAA 959
R. microplus (EST)  .......... .......... -..C...... ..C...T--. .T..CT.... -......... A......... ...-....G.. 106
Mozo 1              .......... .......... ...C...... .......... .T..C..... .......... .......... .......G.. 308
Mozo 2              .......... .......... ...C...... .......... .T..C..... .......... .......... .......G.. 308
Mozo 3              .......... .......... ...C...... .......... .T..C..... .......... .......... .......G.. 308
ROZF5 V.100-1       .......... .......... ...C...... .......... .T..C..... .......... .......... .......G.. 308
ROZF5 V.100-2       .......... .......... ...C...... .......... .T..C..... .......... .......... .......G.. 308
ROZF5 V.100-3       .......... .......... ...C...... .......... .T..C..... .......... .......... .......G.. 308
Conservation
```

(continua)


980 1.000 1.020 1.040
R. sanguineus AAATCTCCAC TTGCCACGTT TCACGCTGGA AAGGTTTCAA ACCGACTACT GCACCAGTCG GACCAACACT GGCGAGTACA 1039
Primer 4/5 F
R. microplus (EST) 186
Mozo 1 388
Mozo 2 388
Mozo 3 388
ROZF5 V.100-1 388
ROZF5 V.100-2 388
ROZF5 V.100-3 387
Conservation
1.060 1.080 1.100 1.120
R. sanguineus GCTGCTTGCG CGTGGACCTG GTGTTCAAGC GCGAGTTCAG CTACTACCTG ATCCAGATCT ACATCCCGTG CTGCATGCTG 1119
L256F (C. oncophora IVM-R)
Primer 5 F
R. microplus (EST) 266
Mozo 1 468
Mozo 2 468
Mozo 3 468
ROZF5 V.100-1 468
ROZF5 V.100-2 468
ROZF5 V.100-3 467
Conservation
1.140 1.160 1.180 1.200
R. sanguineus GTCATCGTGT CCTGGGTGTC GTTCTGGCTC GACCCCACCT CGATCCCGGC GCGAGTGTCG CTGGGCGTCA CCACCCTGCT 1199
G-I
R. microplus (EST) 346
Mozo 1 548
Mozo 2 548
Mozo 3 548
ROZF5 V.100-1 548
ROZF5 V.100-2 548
ROZF5 V.100-3 547
Conservation
1.220 1.240 1.260 1.280
R. sanguineus CACCATGGCC ACGCAGATAT CGGGCATCAA CGCCTCGCTG CCTCCCGTTT CCTACACCAA GGCCATTGAC GTGTGGACCG 1279
G-II
P299S (D. melanogaster IVM-R)
G-III
G323D (T. urticae ABM-R)
R. microplus (EST) 426
Mozo 1 628
Mozo 2 628
Mozo 3 628
ROZF5 V.100-1 628
ROZF5 V.100-2 628
ROZF5 V.100-3 627
Conservation
1.300 1.320 1.340 1.360
R. sanguineus GCGTCTGTCT GACCTTCGTA TTCGGCGCGC TCCTCGAGTT CGCCCTGGTC AACTACGCCT CGCGGTCAGA TTCACGCCGG 1359
G-III
G323D (T. urticae ABM-R)
G-IV
R. microplus (EST) 506
Mozo 1 708
Mozo 2 708
Mozo 3 708
ROZF5 V.100-1 708
ROZF5 V.100-2 708
ROZF5 V.100-3 707
Conservation

(continua)


1.380 1.400 1.420 1.440
R. sanguineus CAGAACATGC AGAAGCAGAA GCAGAGGAAA TGGGAGCTCG AGCCGCCCCT GGACTCGGAC CACCTGGAGG ACGGCGCCAC 1439
Primer 4/5 R
Primer 5 R
R. microplus (EST) 586
Mozo 1 788
Mozo 2 788
Mozo 3 788
ROZF5 V.100-1 788
ROZF5 V.100-2 788
ROZF5 V.100-3 787
Conservation
1.460 1.480 1.500 1.520
R. sanguineus CACGTTCGCC ATGAGGCCGC TGGTGCACCA CCACGGAGAG CTGCATGCCG ACAAGTTGCG GCAGTGCGAA GTCCACATGA 1519
R. microplus (EST) 666
Mozo 1 868
Mozo 2 868
Mozo 3 868
ROZF5 V.100-1 868
ROZF5 V.100-2 868
ROZF5 V.100-3 867
Conservation
1.540 1.560 1.580 1.600
R. sanguineus AGACCCCCAA GACGAACCTT TGCAAGGCCT GGCTTTCCAG GTTTCCCACG CGATCCAAAC GCATCGACGT CGTCTCGCGG 1599
R. microplus (EST) 746
Mozo 1 948
Mozo 2 948
Mozo 3 948
ROZF5 V.100-1 948
ROZF5 V.100-2 948
ROZF5 V.100-3 947
Conservation
1.620 1.640 1.660 1.680
R. sanguineus ATCTTCTTTC CGCTCATGTT CGCCCTCTTC AACCTCGTCT ACTGGACAAC CTACCTCTTC CGGGAAGACG AGGAAGACGA 1679
Primer 6 R
R. microplus (EST) 826
Mozo 1 967
Mozo 2 967
Mozo 3 967
ROZF5 V.100-1 967
ROZF5 V.100-2 967
ROZF5 V.100-3 966
Conservation
3'UTR
1.700 1.720 1.740 1.760
R. sanguineus GTGACAGAAC ACGGACGCCA CGACAGCCGC CATCCGACAC CATCGTCACT GCAGGCACGC ACTCTGTCGC GCGCACACAC 1759
3'UTR
R. microplus (EST) 906
Mozo 1 967
Mozo 2 967
Mozo 3 967
ROZF5 V.100-1 967
ROZF5 V.100-2 967
ROZF5 V.100-3 966
Conservation

(continua)

```
                 3'UTR                    1.780                    1.800                    1.820                    1.840
R. sanguineus    CACGAAGACC GGCGCGCCAA CGCACGATGC GCGTTGGCCG CTGAAAAACC CGGGAGCGGG GCGGTGGGGG AGGCTATGCC 1839

                 3'UTR
R. microplus (EST) ..........  .........-- ...CTCGC.T .G.CC.CTGA AGA.CCCGGG A.CCG.TT.. CG..GT...C CTA.ACGC.. 984
Mozo 1           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
Mozo 2           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
Mozo 3           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-1    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-2    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-3    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 966
Conservation

                 3'UTR                    1.860                    1.880                    1.900                    1.920
R. sanguineus    CCGGCCCCTC GCTCCTCATC CTCCGTGCAC GCTCGAATCG TCATCGCCAC AGCCAGAAAA AAAAAAGATA CCGTGCGAAA 1919

                 3'UTR
R. microplus (EST) .G.C.A.TCG CT........  .........- .........- ....A.....  .........- .....----.  AAAAAAA... 1060
Mozo 1           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
Mozo 2           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
Mozo 3           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-1    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-2    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-3    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 966
Conservation

                 3'UTR                    1.940                    1.960                    1.980                    2.000
R. sanguineus    AGTGGCGGCA ACACAACGTC GACGCCATCA GCGCCGCCCA GAGCTGCAAG CGGCTCCCAC ATGGTTGCCA CCGCAGCTTC 1999

                 3'UTR
R. microplus (EST) .AAA------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 1064
Mozo 1           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
Mozo 2           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
Mozo 3           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-1    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-2    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-3    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 966
Conservation

                 3'UTR                    2.020                    2.040                    2.060                    2.080
R. sanguineus    CTCTACGACC CTTCATCCCC ACCGGCACCA GCTACGAGAA AGGGACCTTA TTTCGGGCCA TCCCTACATA GGCGACTGTT 2079
R. microplus (EST) ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 1064
Mozo 1           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
Mozo 2           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
Mozo 3           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-1    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-2    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-3    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 966
Conservation

                 3'UTR                    2.100                    2.120                    2.140
R. sanguineus    GTTTTCGCAC GAAAGATCTT TACGCAGCTG ATGCTGAAAA AAAAAAAAAA AAAAAAAAA- 2138
R. microplus (EST) ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 1064
Mozo 1           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
Mozo 2           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
Mozo 3           ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-1    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-2    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 967
ROZF5 V.100-3    ----------  ---------- ---------- ---------- ---------- ---------- 966
Conservation
```

ANEXO C - Artigos de Periódicos

Artigo 1 KLAFKE, G. M.; CASTRO-JANER, E. A.; MENDES, M. C.; NAMINDOME, A.; SCHUMAKER, T. T. Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Vet. Parasitol.**, 2011. In review.

Artigo 2 KLAFKE, G. M.; DE ALBUQUERQUE, T. A.; MILLER, R. J.; SCHUMAKER, T. T. Selection of an ivermectin-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. **Vet. Parasitol.**, v. 168, p. 97-104, 2010.

Artigo 3 MENDES, M. C.; LIMA, C. K.; NOGUEIRA, A. H.; YOSHIHARA, E.; CHIEBAO, D. P.; GABRIEL, F. H.; UENO, T. E.; NAMINDOME, A.; KLAFKE, G. M. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyriphos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. **Vet. Parasitol.**, 2011. In press.

Elsevier Editorial System(tm) for Veterinary Parasitology
Manuscript Draft

Manuscript Number: Vetpar-D-11-4749

Title: Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in Rhipicephalus microplus (Acari: Ixodidae).

Article Type: Research Paper

Keywords: Rhipicephalus microplus; Ivermectin; Acaricide Resistance; Diagnosis

Corresponding Author: Mr. Guilherme Marcondes Klafke,

Corresponding Author's Institution: Universidade de Sao Paulo; Instituto de Ciencias Biomedicas

First Author: Guilherme Marcondes Klafke

Order of Authors: Guilherme Marcondes Klafke; Eleonor A Castro-Janer, D.V.M, M.S., PhD; Márcia C Mendes, M.S., PhD; André Namindome; Teresinha T Schumaker

Abstract: The applicability of laboratory bioassays to diagnose ivermectin resistance in Rhipicephalus microplus was evaluated. Larval immersion test, larval packet test and adult immersion test (AIT), were performed aiming the characterization of the drug's toxicity on adults and larvae of a susceptible reference strain (Mozo). The larval tests were validated with an ivermectin resistant strain (ZOR) and applied on 9 different cattle tick populations from the states of São Paulo and Mato Grosso do Sul, Brazil. All the populations without previous exposure to ivermectin were diagnosed as susceptible and all the populations previously exposed to the acaricide were diagnosed as resistant using the larval immersion test. The immersion technique presented to be a more sensitive bioassay than the larval packet technique, which failed to detect resistance in three of the populations that were considered resistant by the first. As the AIT needs to be validated against ivermectin resistant strains, the use of the larval immersion test to the diagnosis of ivermectin resistance in Rhipicephalus microplus is recommended.

*Manuscript

Applicability of *in vitro* bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae).

Klafke, G.M.[1*]; Castro-Janer, E.A.[1,2]; Mendes, M.C.[3]; Namindome, A.[1]; Schumaker, T.T.S.[1]

1. Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo. Av. Prof. Lineu Prestes, 1374. 05508-900. São Paulo, Brazil.

2. Departamento de Parasitología. Facultad de Veterinaria, Universidad de La República. Alberto lasplaces ,1550. 1620. Montevideo, Uruguay.

3. Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal – Instituto Biológico. Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1252. 0414002. São Paulo, Brazil.

*Corresponding author

Abstract

The applicability of laboratory bioassays to diagnose ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* was evaluated. Larval immersion test, larval packet test and adult immersion test (AIT), were performed aiming the characterization of the drug's toxicity on adults and larvae of a susceptible reference strain (Mozo). The larval tests were validated with an ivermectin resistant strain (ZOR) and applied on 9 different cattle tick populations from the states of São Paulo and Mato Grosso do Sul, Brazil. All the populations without previous exposure to ivermectin were diagnosed as susceptible and all the populations previously exposed to the acaricide were diagnosed as resistant using the larval immersion test. The immersion technique presented to be a more sensitive bioassay than the larval packet technique, which failed to detect resistance in three of the populations that were considered resistant by the first. As the AIT needs to be validated against ivermectin resistant strains, the use of the larval immersion test to the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* is recommended.

Keywords

Rhipicephalus microplus; Ivermectin; Acaricide Resistance; Diagnosis

Introduction

Rhipicephalus microplus (Canestrini, 1887) is considered the most important parasite of cattle in terms of economic losses and animal health damaging (FAO, 2004). The use of acaricides is the major method for controlling these ticks in Brazil and the local status of acaricide resistance is critical, occurring to organophosphates (Patarroyo and Costa, 1990), synthetic pyrethroids (Fernandes et al., 2001), amitraz (Santamaria-Vargas et al., 2003), ivermectin (IVM) (Martins and Furlong, 2001) and fipronil (Castro-Janer et al., 2010b).

IVM, an endectocide of the macrocyclic lactones (ML) chemical group, has been used since 1981 (Bloomfield, 1988) for the control of *endo* and *ecto* parasites of cattle and is one of the top sellers acaricides in Brazil for the control of *R. microplus*. It is known that a high number of treatments for long periods can select for resistance to acaricides in *R. microplus* (Kunz and Kemp, 1994). However, for IVM there is little information about its occurrence.

Cattle tick resistance to IVM has been detected since 2001 in the states of Rio Grande do Sul (Martins and Furlong, 2001) and São Paulo, Brazil (Klafke et al, 2006), two important Brazilian states regarding production of dairy cattle (IBGE, 2008). IVM resistance was recently detected in dairy and beef ranches of Mexico (Perez-Cogollo et al., 2010a,b) and beef ranches of Uruguay (Castro-Janer, 2011). This phenomena might be explained by the increase of the use of ML to control cattle ticks from the last 10 years, as an alternative to the other acaricides already committed with the resistance. Beyond of being favourable to the development of resistance, the intensive and irresponsible use of ML for the control of parasites of dairy cattle can lead

to the presence of drug residues on the milk and its derivates at unacceptable levels (Chicoine et al., 2007; Imperiale et al., 2009) and affect the beneficial entomofauna that lives on the faecal material (Floate et al., 2002).

Worldwide, the diagnosis of resistance to the acaricides has been done manly by the use of bioassays. The use of molecular markers has been used for the diagnosis of SP resistance in field populations of the cattle tick in Mexico (Guerrero et al., 2002; Rosario-Cruz et al., 2009) and Australia (Morgan et al., 2009) and these markers have been developed for the diagnosis of resistance to coumaphos (Temeyer et al., 2010). However, there are no molecular markers for all the classes of acaricides, which is an important requirement in resistance monitoring programs. It is necessary to use techniques that are practical, fast, reliable and economical. The *in vitro* bioassays are relatively simple, little expensive and require simple equipment (Scott, 1995). The most common tests used for the detection of resistance are: AIT - adult immersion test (Whitnall and Bradford, 1947); LPT - larval packet test (Stone and Haydock, 1962) and LIT - larval immersion test (Shaw, 1966).

The AIT uses engorged females, which are immersed in solutions made of technical or commercial acaricides and is based on the comparison of the rate of oviposition between treated and untreated females groups. Eggs can be analyzed by weight and viability. It can also be evaluated the mortality, considering females that produces eggs or not, which reduces the time to obtain the results (1-2 weeks) compared to the time of determination of hatchability (5-6 weeks). The most widely used protocol is that of Drummond et al. (1973) using the recommended concentration of commercial acaricides

to differentiate susceptible from resistant ticks. The limiting factor for the use of AIT is the number of engorged females used, which is not always sufficient to obtain reliable results (Jonsson et al., 2007). The larval tests are an alternative, because the number of individuals that may be obtained in the laboratory is much higher, allowing the use of a wide range of concentrations from different acaricides. The response is measured in percentage of mortality of larvae upon the treatment. The results are obtained in 5-6 weeks after the collection of adults. Currently, FAO has adopted the LPT for the diagnosis of acaricide resistance (FAO, 2004).

For IVM, *in vitro* bioassays have been used since 1999. Benavides and Romero (1999), made preliminary assays to standardize a LIT protocol using a commercial formulation of IVM. However, only slight differences in the response between a multi-resistant and a susceptible strain were observed. Laboratory tests were carried out with larvae and adults with MLs in Australia (Sabatini et al., 2001). The authors tested the susceptible strain, Yeerongpilly, against commercial and technical formulations of ML and established its lethal concentrations, determining discriminating doses for the detection of ML resistance in Australia. In Brazil (Klafke et al., 2006) and Mexico (Perez-Cogollo et al., 2010) the existence of IVM-resistant populations was confirmed using the LIT technique. Currently, the LIT is been used to monitor IVM resistance in cattle tick outbreaks occurring in the USA (Miller, R.J., 2010 - personal communication). In Uruguay, the LIT showed to be a very sensitive test, where it was possible to diagnose IVM resistance in some populations of the cattle tick before this resistance could be observed through failures of efficacy or complains from the ranchers (Castro-Janer et al., 2011).

To evaluate the applicability of bioassays on the diagnosis of IVM resistance in *R. microplus* we present the adult and larval tests performed with IVM susceptible and resistant strains and different populations from the state of São Paulo, Brazil.

Material and methods

Ticks

The following strains of *R. microplus* were used: Mozo, originated in Uruguay, is the FAO reference strain to diagnosis of acaricide resistance in Latin-America; ZOR, originated in the municipality of Ipiguá (state of São Paulo, Brazil), isolated from an IVM-resistant field population in February 2008 and maintained under selection for resistance to IVM. Both strains were maintained at the Instituto Biológico de São Paulo, Brazil.

Field populations were collected in ranches located at the states of São Paulo (populations APO, TPA, FIG, JS, AR, PIQ, STO and VIS) and Mato Grosso do Sul (population StaP). JS, AR and StaP tick populations were collected in ranches that had never used any ML for the control of parasites before. The populations APO, TPA, FIG, PIQ, STO and VIS had been exposed to ML for three consecutive years prior to the collection of ticks.

Maintenance of tick colonies

To the maintenance of the tick colonies it were used as hosts Holstein calves. The animals had been previously inspected for any presence of ticks before being fostered in individual boxes (measurements: 2.30 m x 3.00 m) located in an experimental barn, where they remained isolated. During the

experiment, the animals were fed hay, ration, mineral salt, vitamins, and water *ad libitum*. The handling of those animals was under the rules of the ethics committee of the Institute of Biomedical Sciences of the University of São Paulo (protocol number 44/05-CEEB/ICB).

The IVM-resistant strain ZOR was kept under selective pressure with IVM through cattle injection of 200 µg/Kg of ivermectin 1% (IVOMEC® - Merial Saúde Animal, Campinas, Brazil) at the time of the artificial infestation with larvae for four generations. On each generation, the host was artificially infested with 200 mg of larvae (approximately 2,000 individuals). In the present study, the forth generation of the strain ZOR was used (ZORF4). The strain Mozo was maintained in cattle as described above, without acaricide treatments.

Preparation of ticks

Engorged or partially engorged females from the field populations were manually collected from the cattle and sent to the laboratory within plastic canisters (300 ml) closed with a perforated lid to allow air passage, inside a polystyrene box. Engorged females of the reference strains (ZOR and Mozo) were collected after its natural detachment from the host. The preparation of ticks at the laboratory was performed according to the FAO proceedings (FAO, 2004). After being washed (water) and dried (paper towel) the ticks were weighed and fixed (dorsally), with the help of a double-sided sticky tape to the lid of a plastic petri dish (100 mm diameter x 22 mm high). The ticks were reared in an incubator, in the dark, under temperatures between 27 and 28ºC and relative humidity between 85 and 90% for two weeks to oviposition.

Eggs were mixed roughly, separated and incubated in 5 ml glass vials, closed with a cotton lid to allow air and humidity passage and keep at the same conditions to allow larvae to hatch. For tests with larvae, specimens were used within 14 to 21 days of life.

***In vitro* bioassays with IVM**

In order to establish a baseline of comparison, there were determined the toxicity profiles of IVM in adults and larvae of the susceptible strain Mozo of *R. microplus*. The tests were conducted with technical IVM (technical grade ivermectin 95.7%, Agromen Chemicals Co. LTD, Hang Zhou, China batch number 7231104). The IVM resistant strain (ZOR) was used for the validation of protocols with larvae. For the diagnosis of resistance, the LIT with IVM was applied to all field populations collected and the LPT was applied only when the amount of larvae was sufficient to run both techniques. All the larval tests with field populations were performed in triplicates and simultaneously with the susceptible strain, Mozo.

AIT

Different lengths of immersion time were applied to the standardization of the AIT with IVM: 1, 5 and 30 minutes. Three parameters were recorded: mortality, egg mass weight and percentage of hatching. For the preparing of the immersion solutions, an initial solution of IVM at 4% was prepared in 20 ml of 60% ethanol P.A. (Synth, Diadema, Brazil) in distilled water. To avoid the precipitation, technical IVM was first diluted in 12 ml of absolute ethanol and then, 8 ml of distilled water was added to the solution. This initial solution was

then 50% serially diluted in 10 ml of ethanol 60%, obtaining the final immersion solutions with the following concentrations (% of IVM): 4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0.125, 0.0625, 0.0312 and 0.0156. The control group was immersed in ethanol 60% without the acaricide. There were tested between 5 and 9 dilutions by assay, depending on the availability of ticks. Homogeneous groups of 10 healthy engorged females were assembled according size and weight for each group then immersed in 10 ml of the corresponding dilution inside a glass beaker (50 ml). Immediately after discarding the solution, the ticks were dried with paper towel and reared in plastic petri dishes inside an incubator at 27-28°C and 80-90% of relative humidity, in the dark. At the seventh and the fourteenth days after treatment, it was registered the number of dead and living ticks, considering the alive ticks that were capable of producing eggs, and the egg-mass weight was recorded. At the sixth week, it was registered the larval hatch percentage by visual estimative.

LPT

Initially, a stock solution of IVM at 1% was prepared in a 2:1 (*v* / *v*) trichloroethylene P.A. (Synth, Diadema, Brazil) and commercial olive oil mixture (TCE-OO). This stock solution was used to prepare the following impregnation solutions in TCE-OO (ppm of IVM): 4000, 3000, 2500, 2000, 1800, 1500, 1200, 1000, 800, 500 and 300. A Whatman No.1 filter paper (750 x 850 mm) was impregnated with 0.67 ml of each of the solutions using an eight-channel multi-micropipette. The material was left to dry for 24 hours at 25°C to allow the evaporation of the TCE. After drying, the filter papers were folded in the middle and sealed on the sides with a metal bulldog clip forming

the packets. Approximately 100 larvae were transferred using a paintbrush to each packet, which was sealed with a third clip and reared at 27-28°C and 80-90% of relative humidity. The control group was exposed to the filter paper impregnated with TCE-OO, free of acaricide. After 24 hours, the mortality of larvae was determined by counting the total of dead and alive individuals. Larvae that were paralysed or only moving its appendices without the capability of walking were considered dead. Twelve and three tests were performed in triplicates with Mozo and ZOR strain, respectively.

LIT

The LIT was carried out according the protocol described by Klafke et al. (2006) using technical ivermectin. Initially it was prepared a 2% solution of Triton X-100 (Sigma-Aldrich) in absolute ethanol (ETH-TX2%). Technical IVM was diluted at 1% in 10 ml of the ETH-TX2% in order to prepare a stock solution that was stored at 4°C for no more than a week. At the time of testing, 100 µl of the stock solution was added to 9.9 ml of distilled water giving the following final concentrations: IVM 100 ppm, ethanol 1% and Triton X-100 0.02%. This initial solution was serially diluted 10 times at a 30% rate in a diluent composed of ethanol 1% and Triton X-100 0.02%, in order to obtain the final immersion solutions with the following concentrations (in ppm of IVM): 100, 70, 49, 34.3, 24, 16.8, 11.7; 8.2, 5.7, 4.0 and 2.8. As a control, it was used the diluent without the acaricide. 500 µl of each immersion solution were distributed in three 1.5 ml microcentrifuge tubes. Using a paintbrush, approximately 100 larvae were transferred to each tube, which was closed and shaken vigorously to allow the sinking of larvae. After 10 minutes of

immersion the larvae were taken with a clean paintbrush, allowed to dry in a piece of paper towel then transferred to a packet of filter paper folded in the middle, closed on the sides with metal bulldog clips. After adding the larvae, the packet was sealed with a third clip and reared in an incubator at 27-28°C and 80-90% of relative humidity in the dark. After 24 hours, the mortality of larvae was determined by counting the total of dead and alive individuals. Larvae that were paralysed or only moving its appendices without the capability of walking were considered dead. Thirty-two and three tests were performed in triplicates with Mozo and ZOR strains, respectively.

Statistical analysis

The software Intercooled Stata 10 (Stata Corp. 2007) was used to analyze the data obtained from the standardization of bioassays with larvae and adults of the Mozo strain.

For the AIT, it was determined the correlation between the egg mass weight at the seventh day (EW7d) and at the fourteenth day (EW14d), independently of the treatment. To calculate the response to treatment the following variables were compared: a) mortality, (engorged females that laid eggs were considered alive and females that did not laid were considered dead); b) EW7d and EW14d, calculating the LC_{50} and LC_{90} as the concentrations which reduced the egg mass weight to 50% and at 90%, respectively; c) index of fertility (IFER) = egg mass weight (g) / weight of females (g); d) index of fecundity (IFEC) = IFER x percentage of larval hatching.

For the larval tests, probit analysis was run on the bioassay results using Polo-Plus (LeOra Software, 2003). For each test, the following parameters were determined: lethal concentrations for 50% and 90% (LC_{50} and LC_{90}) with its confidence intervals of 95% (CI95%) and the slope of the regression line. The resistance ratios (RR_{50} and RR_{90}) and their CI95% were generated with Polo-Plus software using the formula described by Robertson et al. (2007). The significance of each comparison was determined when the calculated confidence intervals (CI95%) did not interpolate. To help the interpretation of the results from a practical point of view, were used the three categories established by Castro-Janer et al. (2011) for the diagnosis of resistance in a cattle tick population: a) Susceptible: when the LC_{50} (CI95%) of the field population is not statistically different from the reference strain. b) Incipient resistance**:** when the LC_{50} (CI95%) of the field population is statistically different from the reference strain with RR_{50} <2. c) Resistant: when the LC_{50} (CI95%) of the field population is statistically different from the reference strain with RR_{50} ≥2.

For the development of graphs derived from the results from the larval tests it was used Microsoft Excel ® 4.0 for Mac (Microsoft, 2007). Graphs of the adult tests were set using the software Intercooled Stata 10.

Results

Figure 1 represents the correlation between EW7d and EW14d for the Mozo strain. There was a high positive association between the two variables, indicated by the coefficient of correlation (r) of 0.9714. Therefore, as an earlier parameter, the EW7d was used to calculate the IFER and the IFEC. The

calculated values of LC_{50} and LC_{90} for IVM of each variable at different immersion lengths of time are presented in Table 1. Independently of the length of immersion, Mortality, EW7d and IFER presented narrow amplitude of CI95%. The higher coefficients of regression were obtained for the variables EW7d and IFER, and no significant differences were observed at the LC_{50} estimate for these variables. However, LC_{50} for mortality and IFEC were significantly different from the LC_{50} determined for EW7d and IFER. The IFEC showed the higher variation independently of the treatments, presenting a wide CI95%. Toxicity of ivermectin was higher when the length of immersion time was increased for all the variables. Figure 2 represents the regression for each variable obtained with the AIT conducted with Mozo strain for each different lengths of immersion time.

The results of the LPT and the LIT conducted with Mozo strain are shown in Table 2 and represented in Figure 3. The value of the coefficient of regression (r) for the LPT and the LIT were respectively 0.9113 and 0.7993, indicating a good fit to the statistical model. The LC_{50} of ivermectin determined with the LPT was approximately 90 times higher than the LC_{50} determined with the LIT. Tests performed on different days did not influence the results (*p* value LPT = 0.415; *p* value LIT = 0.881), showing the good repeatability of both tests. Moreover, it was observed low variance on the LC_{50} calculated for LPT (0.0007) and LIT (0.0008)

The LCs and RRs values determined for each test with its respective CI95% for the IVM-resistant strain ZOR are shown in Table 3 and the dose-mortality curves in Figures 4 and 5. Both LC_{50} and LC_{90} values determined for the ZOR strain using the two techniques were significantly higher than the

ones determined for the Mozo strain. Well-differentiated slope values between the strains were obtained only with the LIT. The RR_{90} determined through the LIT was considerably higher than the RR_{50}. Nevertheless, there was not much variation between these values when determined through the LPT. The RR_{50} and RR_{90} of the ZOR strain determined through the LIT were 6.73 and 37.65 respectively. When determined with LPT these values were 1.49 and 1.74, therefore, using the LPT, ZOR was considered as a strain with incipient resistance (RR_{50}<2 but with LC_{50} significantly different of Mozo strain) whereas the LIT technique reveals it as resistant to IVM.

The lethal concentrations for IVM obtained with the LIT with the field populations of *R. microplus* are presented in Tables 4 and 5. All of the three populations without history of ML treatments (Table 4) presented no differences to the Mozo strain at the LC_{50} and LC_{90}, with RR_{50} and RR_{90} values ranging from 0.87 to 1.01. These three populations were considered susceptible to IVM. Concentration-mortality graphs for these populations are presented on Figure 6. The populations with history of ML treatments presented significantly higher LC_{50} and LC_{90} values and lower slopes than the susceptible reference strain Mozo, being all of them considered resistant to IVM. There were found different levels of resistance. The populations TPA and STO were diagnosed with incipient resistance (RR_{50} <2) and PIQ, FIG, VIS and APO were diagnosed as resistant populations, with RR_{50} values ranging from 2.27 to 4.94. Concentration-mortality graphs for the 9 populations with historical usage of ML are presented on the Figure 7.

The Table 6 presents the lethal concentrations and RR to IVM determined with the LPT for the Mozo strain and six field populations with a

history of exposure to ML. None of the populations tested presented RR_{50} values higher than 2. Four populations (FIG, STO, VIS and APO) showed incipient resistance (RR_{50}<2) and another two (TPA, PIQ) were susceptible. Only the populations FIG e STO presented RR_{90} ≥2. Concentration-mortality graphs for the six populations tested with LPT are presented on the Figure 8.

Discussion

The high correlation between the EW7d and the EW14d made possible the use of the first parameter on the determination of the variables, permitting the obtaining of the results earlier than the Drummond test (Drummond et al., 1973) taking only one week after the collection of engorged female ticks.

All the measured variables have proved to be appropriate for the evaluation of the toxicological response to treatment with IVM through the AIT, independently of the length of immersion time. However, the IFEC presented the higher variability between the assays (Figure 1), which could be related to the visual estimative determination of the percentage of larval hatching and possibly, to the extended period spent on the incubator for the hatching of larvae, that could be subjected to variations of temperature and humidity. Such variation on the IFEC was also observed by Castro-Janer et al. (2009) with fipronil, for this reason it is not recommended the use of this parameter on the analysis of the results of the AIT with IVM.

The toxicity of IVM on the adult females was positively influenced by the length of immersion time, similarly to the results obtained by Sabatini et al. (2001). Those authors used commercial formulations of ML and suggested a 30-minute immersion as it presented consistently higher inhibition of egg-

laying. Furthermore, in the present study it has been tested a one and a five-minute immersion, in order to perform a faster assay. Whatever the length of time taken, it was possible to determine the LCs for IVM. Nevertheless, using a 30-minute immersion could be decrease the amount of technical IVM needed for the bioassay starting the serial dilutions at 1% of active ingredient, which would be an advantage. However, the 30-minutes immersion presented more variation than the one-minute immersion. Possibly, this higher variation is due to the few number of assays conducted comparatively to one-minute, suggesting more studies to confirm this observation. The AIT was not performed with the ZOR strain due to an insufficient amount of ticks to reach statistical reliability. Nevertheless, the AIT protocol developed in this work can be used elsewhere for comparison between known resistant and susceptible populations, in order to evaluate its use on the diagnosis of IVM resistance.

Lower variance was observed in the larval tests compared to adult tests. One limiting aspect of the adult test is the number of individuals needed for a robust and accurate statistical analysis (Jonsson et al., 2007). Larval tests usually are performed with more than 100 individuals per dosage group and re-testing is in most cases possible, favouring a strong analysis of the data. The calculated confidence intervals of 95% were narrow and coefficients of regression were high for both larval tests, indicating the good fit to the probit model (Robertson et al., 2007). The toxicity of IVM in the LPT was lower than in the LIT, presenting a LC_{50} value approximately 90 times higher than when larvae were treated by immersion (Table 2). These results agree with those obtained by Sabatini et al. (2001) using moxidectin, as well as Castro-Janer et al. (2009) when performing tests with fipronil. The

detectability of resistance to IVM with the LIT was higher than with LPT. Only slight differences of response (LCs) were observed between ZOR and Mozo strains when tested with the packet technique (Table 3, Figure 3). Moreover, the RR_{50} and RR_{90} were much higher when determined by the LIT. According the results of the LPT, the ZOR strain was classified as a population with incipient resistance, which is contradictory to the observation of resistance in the field. Additionally, it must be underlined that the population ZOR was elected to be maintained under selective pressure with IVM because this molecule was ineffective to control it and the presented data was obtained with the fourth generation of survivors. The high sensitivity of the immersion test for the diagnosis of resistance was previously observed for fipronil (Castro-Janer et al., 2009; Castro-Janer et al., 2010a,b). This characteristic is important, as the LIT, being a more sensitive test could detect resistant phenotypes in a population even when present in a low frequency, assisting the early diagnosis of resistance to IVM in the field, as observed by Castro-Janer et al. (2011).

In order to validate the larval assays for the diagnosis of IVM resistance with field populations, collection of engorged females were made in nine different locations. There were found no differences on the response to treatment between the three populations without previous exposure to ML (JS; AR and StaP) and Mozo strain (Table 4 / Figure 6). These results validated the use of the LIT in the diagnosis of resistance to IVM. By the other hand, using the LIT, all the field populations with previous exposure to ML were considered with incipient resistance or resistant to IVM, presenting significantly higher LC_{50} and LC_{90} and lower slope values than the strain Mozo with different levels of

resistance (Figure 7 / Table 5). These data are similar to those found in Mexico (Perez-Cogollo et al., 2010), where RR_{50} varied from 2.04 to 8.59 in different cattle tick populations submitted to a different number of ML treatments. All the populations analysed in the present study have been exposed to ML acaricides from at least 3 years, with 2 to 6 treatments per year, which could explain the variation on the levels of resistance of each location. The fact that the LPT failed to detect resistance in populations (TPA, PIQ, STO) diagnosed as resistant with the LIT and that three populations that were considered resistant by LIT (FIG, VIS and APO) presented incipient resistance when tested with the packet technique, reiterate the lower sensitiveness of the LPT for the detection of IVM resistance in *R microplus*. This observation, combined with the need for the validation of the AIT technique against known IVM resistant populations, allow us to recommend the use of the larval immersion test for the diagnosis of IVM resistance in *R. microplus*.

Conclusion

The larval immersion test with IVM proposed on this study showed to be a valuable tool for the diagnosis of resistance to IVM in *R. microplus* and can be used to monitor the development of IVM resistant cattle tick field populations.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. João Ricardo Martins (IPVDF-RS) for providing the susceptible Mozo strain. DVMs Eidi Yoshinara, Sebastião Neto, José Roberto Pereira, the farmers and its employees, for the help on the collection of cattle tick field populations. Laboratorios Cibeles de Uruguay for providing the technical grade ivermectin. Ms. Iara for the help on the English language review of this manuscript. This project was supported by CNPq, FAPESP (No. 2007/56082-4) (Brazil) and INIA-FPTA No. 243 (Uruguay).

References

Benavides, E.O., Romero, N.A. 1999. Preliminary results of a larval resistance test to ivermectin using *Boophilus microplus* reference strains. Proceedings of the 5th Biennial Conference of the Society for Tropical Veterinary Medicine Key West, FL, 12–16 June 1999.

Bloomfield, G. 1988 Endoparasites – the Veterinary Market. PJBPublications, Richmond, UK, 105 pp.

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.

Castro-Janer, E., Rifran, L., González, P., Piaggio, J., Gil, A., Schumaker, T.T.S., 2010a. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by *in vitro* bioassays. Vet. Parasitol. 169, 172–177.

Castro-Janer, E., Martins, J.R., Mendes, M.C., Namindome, A., Klafke, G.M., Schumaker, T.T. 2010b. Diagnoses of fipronil resistance in Brazilian cattle ticks (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) using in vitro larval bioassays. Vet. Parasitol. 173, 300-306.

Castro-Janer, E., Rifran, L., González, P., Niell, C., Piaggio, J., Gil, A., Schumaker, T.T.S. 2011. Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. Vet. Parasitol. In press. DOI. 10.1016/j.vetpar.2010.12.035.

Chicoine, A.L., Durden, D.A., MacNaughton, G., Dowling, P.M. 2007. Ivermectin use and resulting milk residues on 4 Canadian dairy herds. Can. Vet. J. 48, 836-838.

Drummond, R.O., Crust, S.F., Trevino, J.L., Gladney, W.J. and Graham, O.H. 1973. *B. annulatus* and *B. decolaratus*: laboratory tests of insecticides. J. Econ. Entomol. 66, 130–133.

FAO, 2004. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants – Guidelines, Module 1 – Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention. Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, Rome, pp. 53.

Floate, K.D., Colwell, D.D., Fox, A.S. 2002. Reductions of non-pest insects in dung of cattle treated with endectocides: a comparison of four products. Bull. Entomol. Res. 92, 471-81.

Guerrero, F.D., Li, A.Y., Hernandez, R. 2002. Molecular diagnosis of pyrethroid resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J. Med. Entomol. 39, 770-776.

Imperiale, F.A., Farias, C., Pis, A., Sallovitz, J.M., Lifschitz, A., Lanusse, C. 2009. Thermal stability of antiparasitic macrocyclic lactones milk residues during industrial processing. Food Addit. Contam. Part A Chem. Anal. Control. Expo. Risk Assess. 26, 57-62.

Robertson, J.L., Russell, R.M., Preisler, H.K., Savin, N.E. 2007. Bioassays with Arthropods (2nd ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA (2007).

Jonsson, N.N., Miller, R.J., Robertson, J.L. 2007. Critical evaluation of the modified-adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates. Vet. Parasitol. 146, 307-315.

Klafke, G.M., Sabatini, G.A., de Albuquerque, T.A., Martins, J.R., Kemp, D.H., Miller, R.J., Schumaker T.T. 2006. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. Vet. Parasitol. 142, 386-390.

Kunz, S.E., Kemp D.H. 1994 Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. Rev Sci Tech. 13,1249-1286.

LeOra Software. 2003 In: J.L. Robertson, H.K. Preisler and R.M. Russel, Editors, Polo Plus Probit and Logit Analysis, User's Guide. Berkeley, 36 pp.

Martins, J.R., Furlong, J. 2001. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. Vet. Rec. 149, 64.

Morgan, J.E.T., Corley, S.W., Jackson, L.A., Lew-Tabor, A.E., Moolhuijzen, P.M., Jonsson, N.N. 2009. Identification of a mutation in the

para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* associated with resistance to synthetic pyrethroid acaricides. Int. J. Parasitol. 39, 775-779.

Patarroyo, J.H., Costa, J.O. 1980. Susceptibility of Brazilian samples of *Boophilus microplus* to organophosphorus acaricides. Trop Anim Health Prod. 12, 6–10.

Perez-Cogollo, L.C., Rodriguez-Vivas, R.I., Ramirez-Cruz, G.T., Miller, R.J. 2010a. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. Vet. Parasitol. 168, 165-169.

Perez-Cogollo, L.C., Rodriguez-Vivas, R.I., Ramirez-Cruz, G.T., Rosado-Aguilar, J.A. 2010b. Survey of Rhipicephalus microplus resistance to ivermectin at cattle farms with history of macrocyclic lactones use in Yucatan, Mexico. Vet Parasitol. 172, 109-113.

Rosario-Cruz, R., Guerrero, F.D., Miller, R.J., Rodriguez-Vivas, R.I., Tijerina, M., Dominguez-Garcia, D.I., Hernandez-Ortiz, R., Cornel, A.J., McAbee, R.D., Alonso-Diaz, M.A. 2009. Molecular survey of pyrethroid resistance mechanisms in Mexican field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Parasitol. Res. 105, 1145-1153.

Sabatini, G.A., Kemp, D.H., Hughes, S., Nari, A., Hansen, J. 2001. Test to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick *Boophilus microplus*, Vet. Parasitol. 95, 53–62.

Santamaría Vargas, M., Céspedes, N.S., Sánchez, H.F., Martins, J.R., Cordovés Céspedes, C.C. 2003. Avaliação in vitro de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari : Ixodidae) resistente à amitraz. Cienc. Rural [online]. 33 (4)

Scott, J.A. 1995. The Molecular Genetics of Resistance: Resistance as a Response to Stress. The Florida Entomologist. 78, 399-414.

Shaw, R.D., 1966. Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. Bull. Entomol. Res. 56, 389–405.

StataCorp, 2007. StataCorp, Stata Statistical Sofware: Release 10, StataCorp LP, College Station, TX (2007).

Stone, B.F., Haydock, P. 1962. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). Bull. Entomol. Res. 53, 563–578.

Temeyer, K.B., Pruett, J.H., Olafson, P.U. 2010. Baculovirus expression, biochemical characterization and organophosphate sensitivity of rBmAChE1, rBmAChE2, and rBmAChE3 of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vet. Parasitol. 172, 114-121

Whitnall, A.B., Bradford, B., 1947. An arsenic resistant tick and its control with gammexane dips. Bull. Entomol. Res. 38, 353–372.

Figure Captions

Figure 1. Relationship between the weight of the eggs at the 7th and 14th day from females of *R microplus* (strain Mozo), submitted to adult immersion tests with ivermectin, n = 328 observations; r = correlation.

Figure 2. Comparative activity of ivermectin on *R. microplus* (strain Mozo) for dose–response mortality, egg weight, index of fertility and index of fecundity, with different lengths of immersion time. Dashed lines indicate 95% confidence intervals. A. Immersion time = 1 min; B. Immersion time = 5 min; C. Immersion time = 30 min.

Figure 3. Dose-response lines for ivermectin, obtained with the larval immersion test (LIT) and the larval packet test (LPT) with the Mozo strain of *Rhipicephalus microplus*. Dashed lines represent the 95% confidence intervals.

Figure 4. Dose-response lines determined from larval immersion tests with ivermectin for *R. (B.) microplus* strains Mozo (susceptible) and ZOR (ivermectin-resistant, fourth generation). (n = 6 trials in triplicate). Dashed lines represent the 95% confidence intervals.

Figure 5. Dose-response curves determined from larval packet tests with ivermectin for *R. microplus* strains Mozo (susceptible) and ZOR (ivermectin-resistant, fourth generation). (N = 6 trials in triplicate). Dashed lines represent the 95% confidence intervals.

Figure 6 A,B,C. Dose-response curves determined from larval immersion tests with ivermectin for *R. microplus* of the strain Mozo (susceptible) and field populations without historical exposure to macrocyclic lactones (JS; AR, StaP). Dashed lines represent the 95% confidence intervals.

Figure 7 A-F. Dose-response curves determined from larval immersion tests with ivermectin for *R. microplus* of the strain Mozo (susceptible) and field populations historically exposed to macrocyclic lactones (TPA; APO; FIG; PIQ; STO and VIS). Dashed lines represent the 95% confidence intervals.

Figure 8 A-F. Dose-response curves determined with larval packet tests with ivermectin for *R. microplus* of the strain Mozo (susceptible) and field populations historically exposed to macrocyclic lactones (APO; TPA; FIG; PIQ; STO and VIS). Dashed lines represent the 95% confidence intervals.

Tables

Table 1. Comparison of ivermectin toxicity for the Mozo strain of *Rhipicephalus microplus* determined with the adult immersion test with different times of immersion.

Immersion time	N	n	Variable	Slope±SE	*t*	R^2	LC_{50}% (CI95%)	LC_{90} % (CI95%)
1 min.	20	168	Mort	8.71±0.48	17.98	0.679	0.089 (0.069 - 0.115)	5.391 (4.061 - 7.159)
			EW7d	– 0.05±0.002	– 21.59	0.749	0.023 (0.015 - 0.034)	0.782 (0.538 - 1.135)
			IFER	– 0.02±0.001	– 21.35	0.748	0.023 (0.015 - 0.035)	0.778 (0.538 - 1.126)
			IFEC	– 0.015±0.001	– 16.29	0.634	0.008 (0.007 - 0.010)	0.252 (0.203 - 0.313)
5 min.	8	64	Mort	11.35±1.35	8.37	0.659	0.006 (0.004 - 0.009)	0.463 (0.307 - 0.705)
			EW7d	– 0.028±0.003	– 9.14	0.706	0.009 (0.003 - 0.029)	0.183 (0.109 - 0.307)
			IFER	– 0.01±0.001	– 9.43	0.719	0.009 (0.003 - 0.029)	0.185 (0.109 - 0.310)
			IFEC	– 0.002±0.0003	– 6.80	0.574	0.0037 (0.0035 - 0.0038)	0.064 (0.056 - 0.073)
30 min.	4	35	Mort	10.25±0.92	11.04	0.675	0.0007 (0.0005 - 0.0008)	0.436 (0.289 - 0.657)
			EW7d	– 0.018±0.001	– 13.04	0.745	0.0102 (0.0052 - 0.0203)	0.174 (0.124 - 0.244)
			IFER	– 0.007±0.005	– 13.08	0.746	0.0102 (0.0052 - 0.0203)	0.174 (0.125 - 0.244)
			IFEC	– 0.004±0.0004	– 11.37	0.686	0.0041 (0.0031 - 0.0056)	0.071 (0.06 - 0.084)

Variables: Mort: mortality; EW7d: Weight of eggs at 7 days; IFER: index of fertility; IFEC: index of fecundity; S.E.: standard error; *t*: Student test; R^2: coefficient of regression; LC: lethal concentration; CI: confidence interval; * values in % of active ingredient.

Table 2. Toxicity of ivermectin evaluated by the larval packet test (LPT) and larval immersion test (LIT) with Mozo strain of *Rhipicephalus microplus*.

Test	N	n	R^2	*t*	Slope±SE	LC_{50}(ppm)* (CI95%)	LC_{90} (ppm)* (CI95%)
LPT	27	286	0.911	53.37	5.88±0.09	1236.63[a] (1204.42 - 1268.11)	1843.12[a] (1775.24 - 1910.83)
LIT	96	957	0.799	37.86	3.57±0.02	15.59[b] (15.10 - 16.11)	31.63[b] (29.94 - 33.42)

N: number of trials; n: number of observations; R^2: value of coefficient of regression; *t*: Student test; SE: standard error; LC: lethal concentration; CI: confidence intervals; ppm: parts per million of active ingredient;*: different letters within the same column represents statistically different values ($p < 0.05$).

Table 3. Lethal concentrations and resistance ratios of ivermectin determined through larval immersion tests (LIT) and larval packet tests (LPT) for the ivermectin resistant strain ZOR (generation F4) and the susceptible reference strain Mozo of *Rhipicephalus microplus*.

Test	Strain	*n*	χ^2 (df)	R^2	Slope±SE	LC_{50} (ppm)* (CI95%)	RR_{50} (CI95%)	LC_{90} (ppm)* (CI95%)	RR_{90} (CI95%)
LIT	ZORF4	6356	484.7 (83)	0.867	1.21±0.03	94.82[a] (80.14 - 113.65)	6.73 (6.31 - 7.31)	1081.57[a] (753.04 - 1715.59)	37.65 (31.85 - 44.51)
	Mozo	4976	294.9 (60)	0.861	4.09±0.11	13.96[b] (13.17 - 14.82)	-	28.72[b] (26.08 - 32.24)	-
LPT	ZORF4	9142	352.5 (118)	0.905	3.49±0.07	2326.96[c] (2247.47 - 2411.37)	1.49 (1.44 – 1.54)	5426.05[c] (5069.28 - 5857.46)	1.74 (1.62 - 1.86)
	Mozo	4249	328.7 (47)	0.770	4.24±0.13	1558.57[d] (1454.82 - 1677.35)	-	3125.07[d] (2755.49 - 3694.11)	-

n: number of larvae; χ^2: chi-square *df*: degrees of freedom; R^2: value of regression; SE: standard error; LC: lethal concentration; ppm: million of active ingredient; RR: resistance ratio, CI: confidence intervals; * different letters in the same column represents statistically different values ($p<0.05$).

Table 4. Larval immersion tests with ivermectin conducted with *Rhipicephalus microplus* from field populations of the states of São Paulo and Mato Grosso do Sul, Brazil, without previous exposure to macrocyclic lactones.

Population	n	χ^2 (df)	Slope±SE	LC_{50} (ppm) (CI95%)	LC_{90} (ppm) (CI95%)	RR_{50} (CI95%)	RR_{90} (CI95%)
JS	3278	31.5 (22)	3.39±0.10	11.87 (11.27 - 12.51)	28.31 (26.14 - 30.93)	0.90 (0.85 - 0.96)	1.04 (0.951 - 1.14)
Mozo	3189	102.4 (22)	4.05±0.12	13.09 (12.12 - 14.16)	27.12 (24.22 - 31.12)	-	-
AR	2528	56.9 (19)	4.17±0.14	14.97 (14.02 - 16.03)	30.37 (27.30 - 34.60)	1.01 (0.96 - 1.07)	1.12 (1.02 - 1.23)
Mozo	2722	25.5 (14)	4.83±0.20	14.77 (13.90 - 15.64)	27.18 (24.98 - 30.15)	-	-
StaP	1858	9.9 (17)	2.69±0.10	18.92 (17.49 - 20.47)	56.59 (50.21 - 64.95)	0.87 (0.79 - 0.96)	1.05 (0.90 - 1.23)
Mozo	1495	13.8 (15)	3.23±0.13	21.54 (20 - 23.25)	53.66 (47.95 - 61.12)	-	-

Mozo: susceptible control strain; n: number of individuals; χ^2: chi-square; df: degrees of freedom; SE: standard error; LC: lethal concentration; ppm: parts per million of active ingredient; CI: confidence intervals.

Table 5. Larval immersion tests with ivermectin conducted with *Rhipicephalus microplus* from field populations of the state of São Paulo, Brazil, with previous exposure to macrocyclic lactones.

Population	n	χ^2 (df)	Slope±SE	LC_{50} (ppm)* (CI95%)	LC_{90} (ppm) * (CI95%)	RR_{50} (CI95%)	RR_{90} (CI95%)
TPA	2407	107.3 (21)	2.31±0.09	22.97* (19.89 - 26.96)	82.14* (62.87 - 118.99)	1.83 (1.70 - 1.97)	3.86 (3.36 - 4.45)
Mozo	2434	20.2 (15)	5.60±0.24	12.55 (12.04 - 13.05)	21.33 (20.09 - 22.86)	-	-
PIQ	2546	7.6 (15)	3.76±0.15	28.85* (27.54 - 30.31)	63.23* (58.01 - 69.81)	2.27 (2.14 - 2.41)	2.96 (2.66 - 3.29)
Mozo	2588	123.4 (15)	5.65±0.20	12.67 (11.57 - 13.90)	21.36 (18.86 - 25.42)	-	-
FIG	2168	15.5 (21)	2.51±0.10	47.49* (44.37 - 51.03)	153.89* (135.21 - 178.86)	4.48 (4.11 - 4.8)	6.88 (5.86 - 8.07)
STO	2218	21.4 (29)	2.55±0.08	19.69* (18.52 - 20.93)	62.43* (56.75 - 69.45)	1.86 (1.71 - 2)	2.79 (2.46 - 3.17)
VIS	2289	25.5 (30)	1.68±0.07	48.90* (44.25 - 54.59)	280.57* (226.84 - 360.62)	4.62 (4.11 - 5.19)	12.55 (9.81 - 16.05)
Mozo	2365	10.6 (21)	3.94±0.14	10.57 (10.07 - 11.10)	22.36 (20.88 - 24.15)	-	-
APO	2211	48.4 (28)	1.78±0.07	39.03* (34.44 - 44.81)	203.65* (157.68 - 281.01)	2.98 (2.68 - 3.32)	8.04 (6.50 - 9.94)
Mozo	1810	24.9 (22)	4.45±0.22	13.06 (12.28 - 13.82)	25.38 (23.57 - 27.57)	-	-

Mozo: susceptible control strain; n: number of individuals; χ^2: chi-square; df: degrees of freedom; SE: standard error; LC: lethal concentration; CI: confidence intervals; ppm: parts per million of active ingredient; * values statistically different of the LC for the Mozo strain within a test ($p<0.05$); RR: resistance ratio.

Table 6. Larval packet tests with ivermectin conducted with *Rhipicephalus microplus* of field populations of the state of São Paulo, Brazil, with previous exposure to macrocyclic lactones.

Population	n	χ^2 (df)	Slope±SE	LC_{50} (ppm)* (CI95%)	LC_{90} (ppm)* (CI95%)	RR_{50} (CI95%)	RR_{90} (CI95%)
TPA	2167	25.9 (27)	3.22±0.17	1564.9* (1469.3 - 1659.9)	3911.9* (3564.8 - 4373.5)	1.41 (1.27 - 1.56)	1.24 (1.11 - 1.54)
Mozo	2437	22.6 (21)	4.16±0.25	1110.8 (1017.6 - 1210.2)	3154.7 (2641.2 - 4052.9)	-	-
PIQ	3235	157.2 (27)	3.27±0.09	1282.4 (1155.7 - 1427.9)	3165.8 (2705.4 - 3857.6)	1.17 (1.07 - 1.28)	1.42 (1.29 - 1.58)
Mozo	1837	26.8 (22)	4.12±0.25	1096.7 (1001.3 - 1193.9)	2958.7 (2504.6 - 3747.7)	-	-
FIG	1744	25.9 (21)	3.96±0.21	2061.1* (1967.3 - 2169.7)	4342.5* (3898.9 - 4974.1)	1.73 (1.64 - 1.83)	2.18 (1.94 - 2.44)
VIS	2104	23.2 (26)	4.09±0.25	2050.2* (1964.4 - 2142.8)	4216.3* (3843.5 - 4733.2)	1.72 (1.63 - 1.81)	2.16 (1.93 - 2.41)
STO	1911	22.5 (28)	3.73±0.20	1381.9* (1313.3 - 1448.9)	3046.8* (2824.1 - 3336.2)	1.16 (1.10 - 1.23)	1.53 (1.39 - 1.68)
Mozo	1731	27.2 (25)	5.74±0.27	1193.4 (1147.1 - 1238.2)	1996.1 (1901.3 - 2111.9)	-	-
APO	3073	52.2 (28)	5.64±0.29	1339.1* (1255.2 - 1413.8)	2258.1* (2129.3 - 2425.9)	1.68 (1.59 - 1.78)	1.78 (1.67 - 1.91)
Mozo	1834	77.9 (15)	6.38±0.39	797.7 (714.2 - 862.6)	1268.9 (1152.2 - 1484.4)	-	

Mozo: susceptible control strain; n: number of individuals**;** χ^2: chi-square; df: degrees of freedom; SE: standard error; LC: lethal concentration; ppm: parts per million of active ingredient; CI: confidence intervals; * statistically different values ($p<0.05$) of the LC for the Mozo strain within a test; RR: resistance ratio.

Figure 1
Click here to download high resolution image

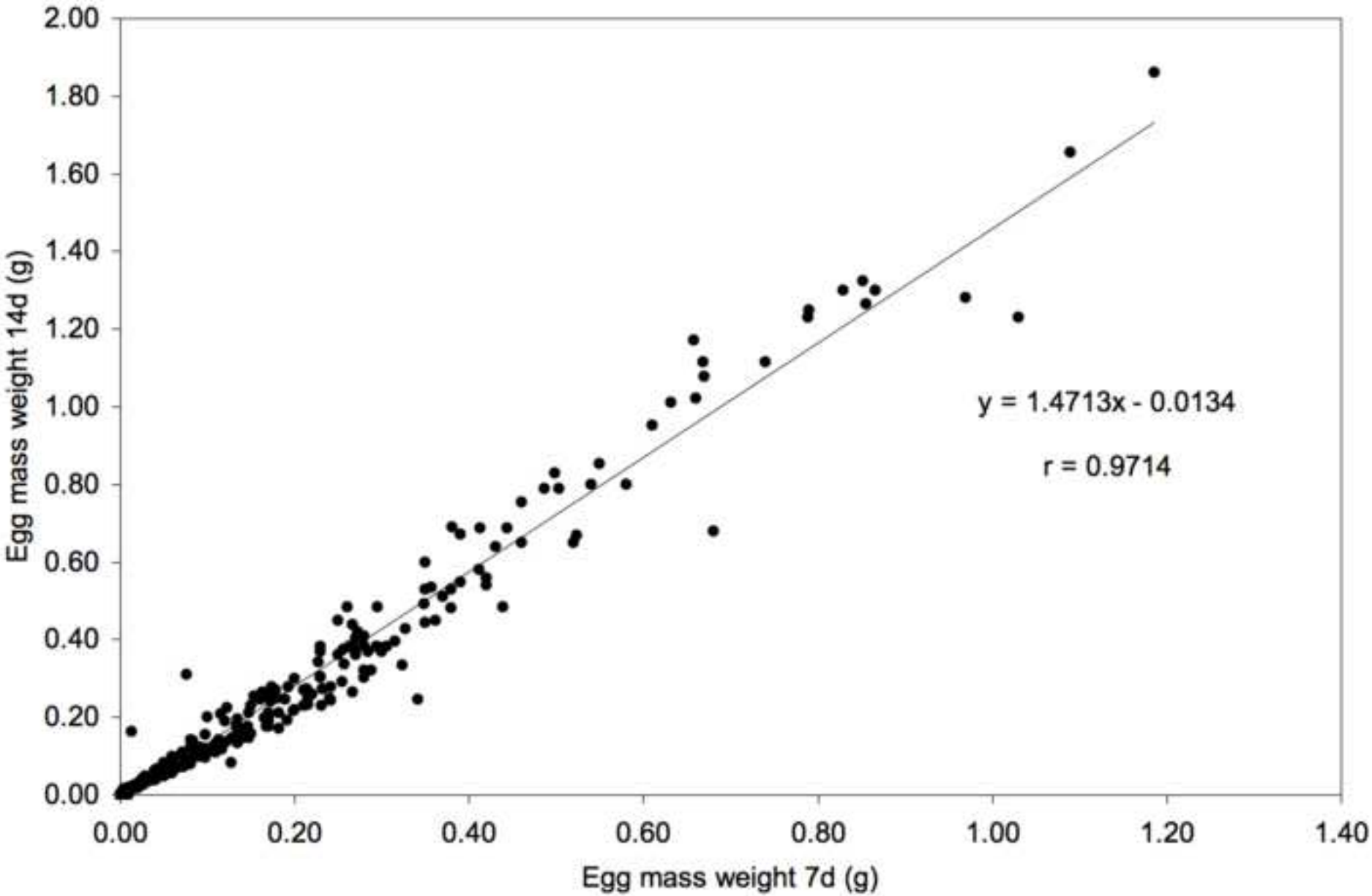


Figure 2A
Click here to download high resolution image

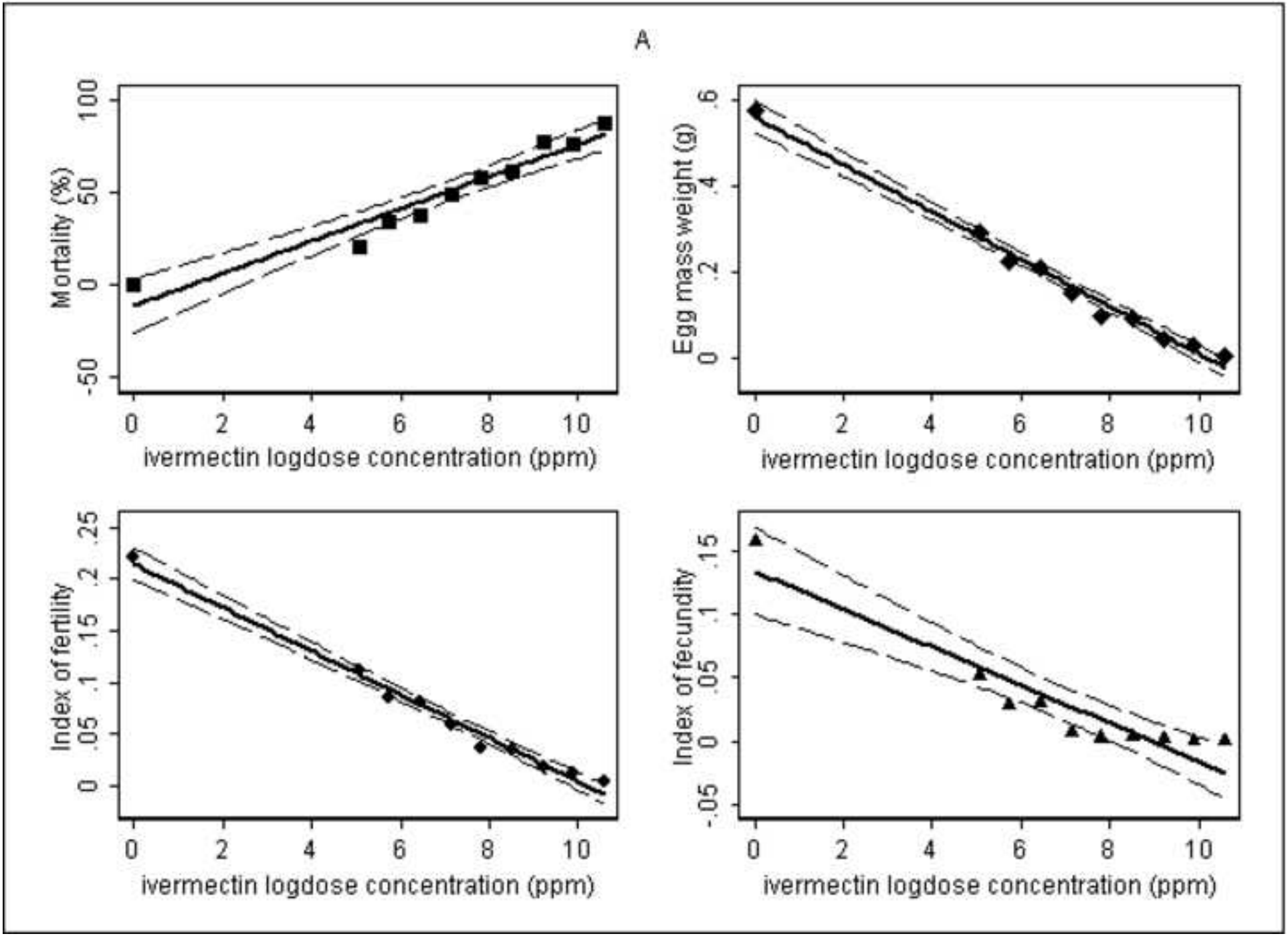


Figure 2B

Click here to download high resolution image

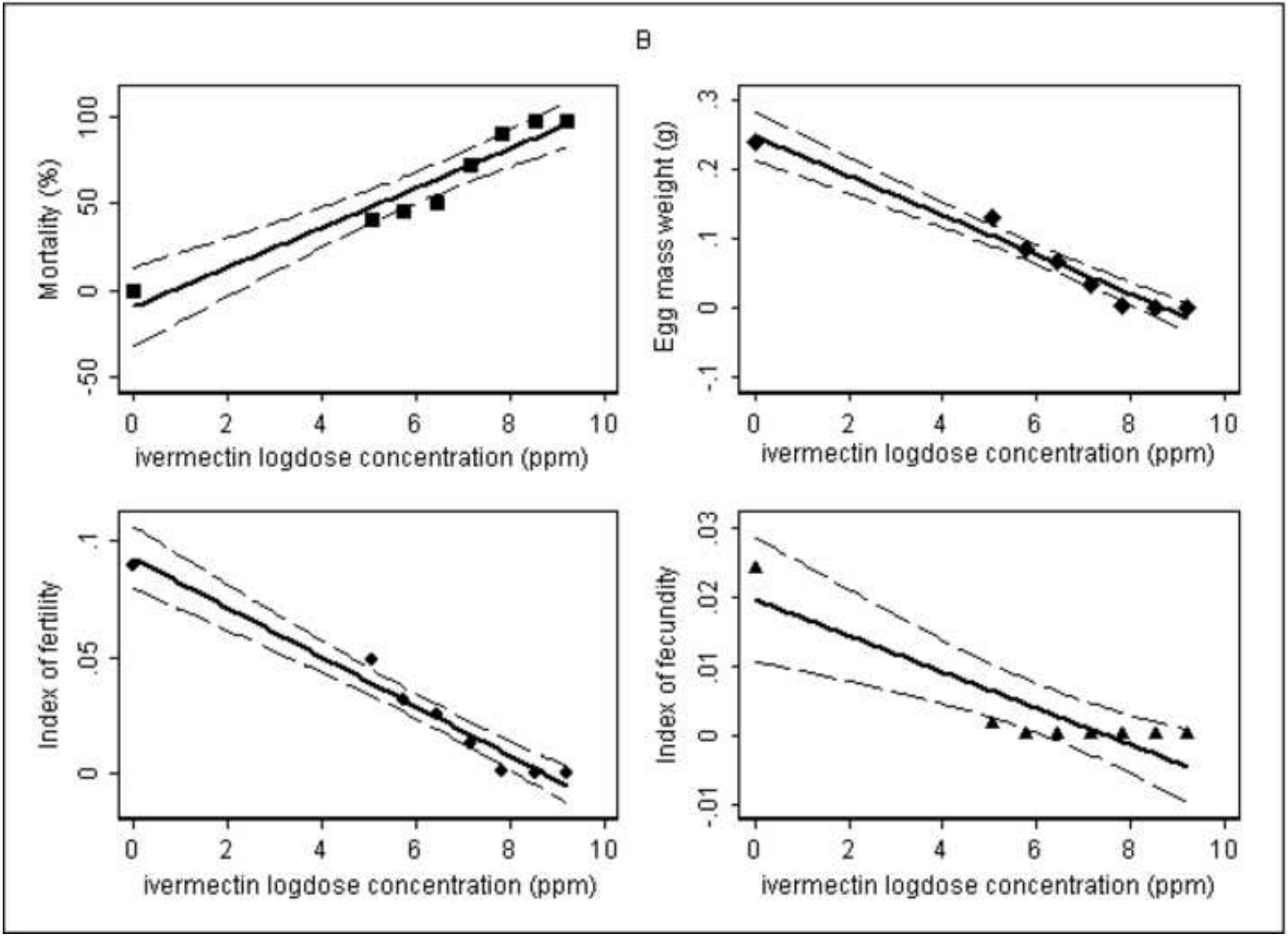


Figure 2C
Click here to download high resolution image

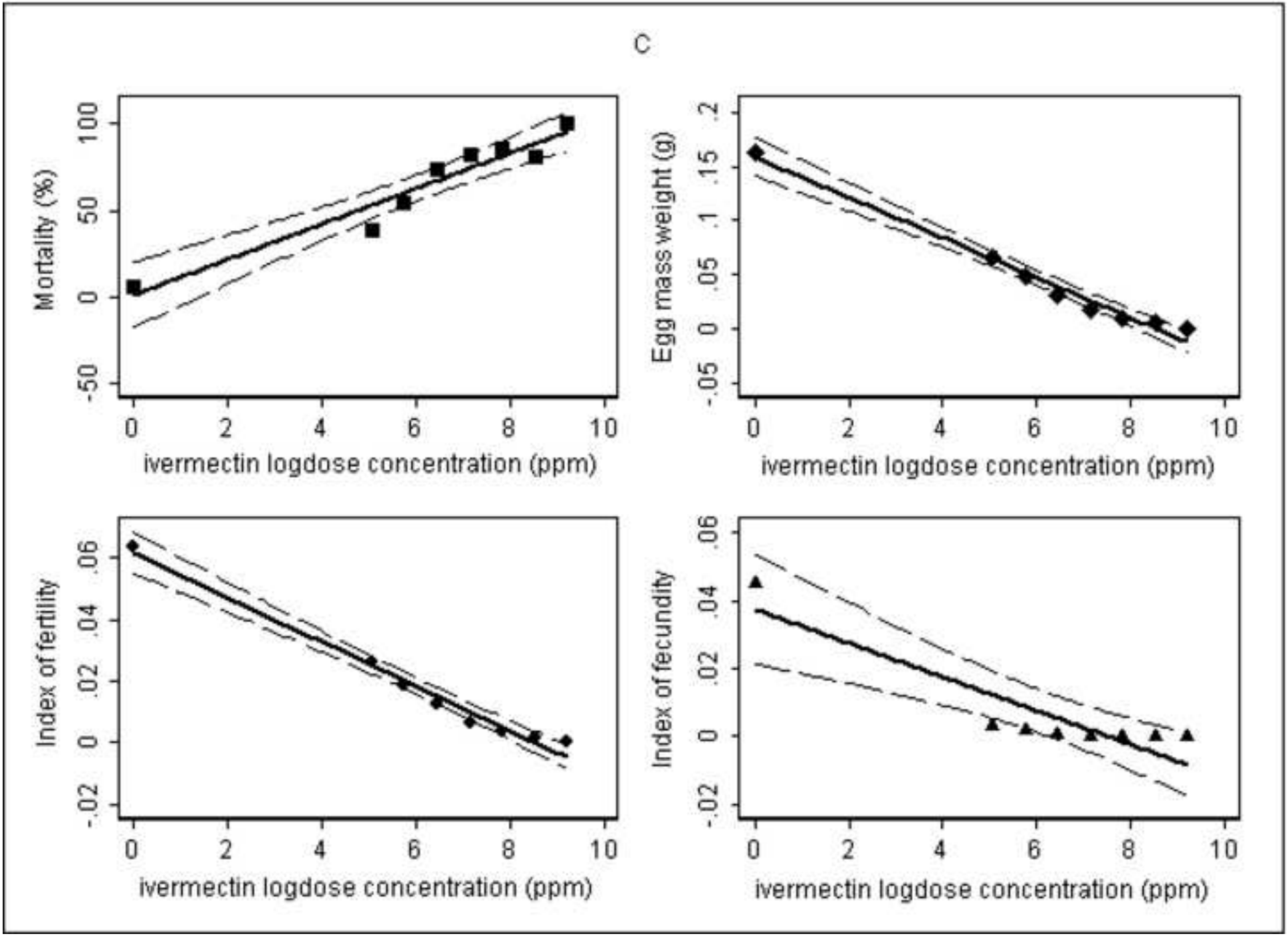


Figure 3
Click here to download high resolution image

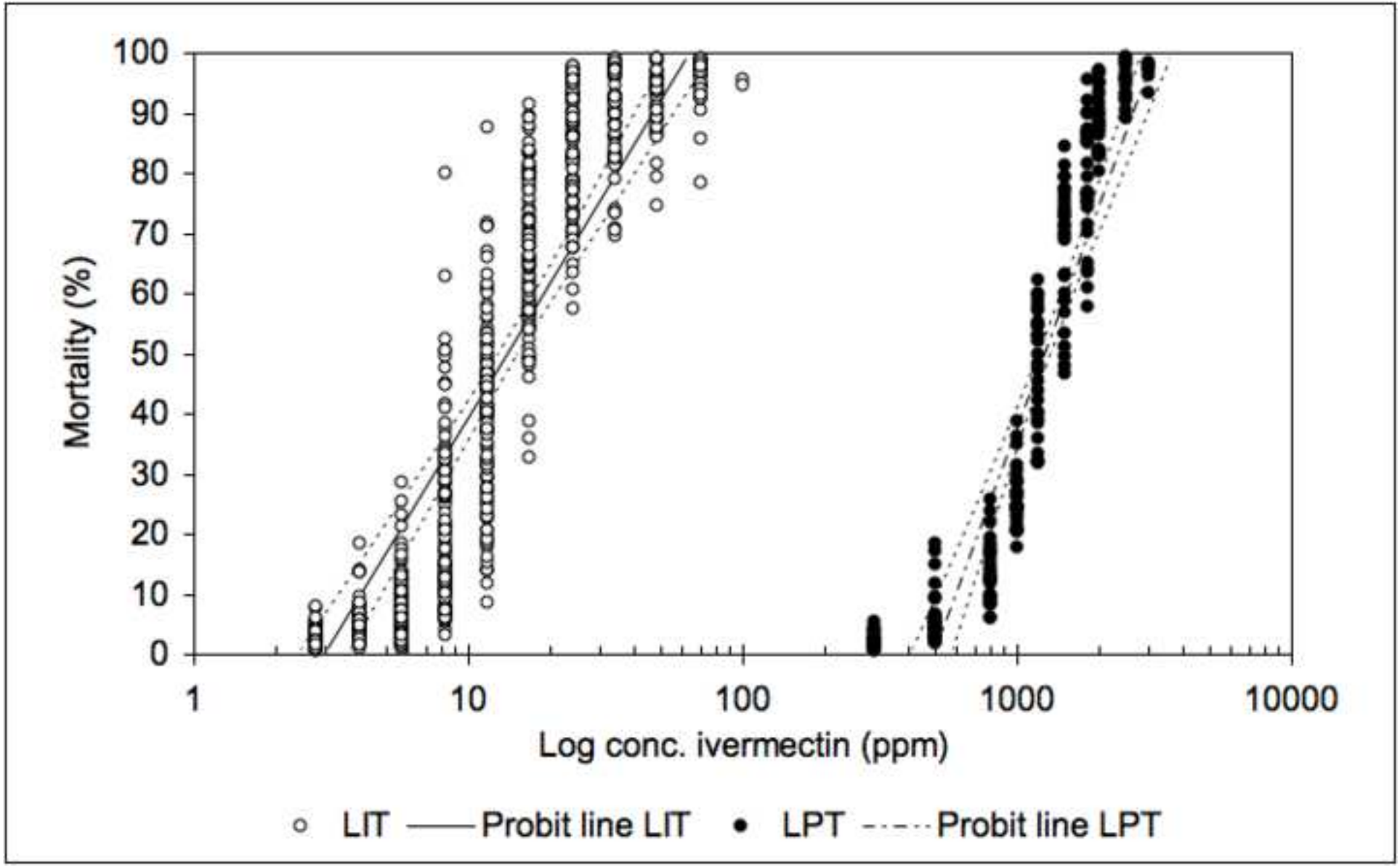


Figure 4
Click here to download high resolution image

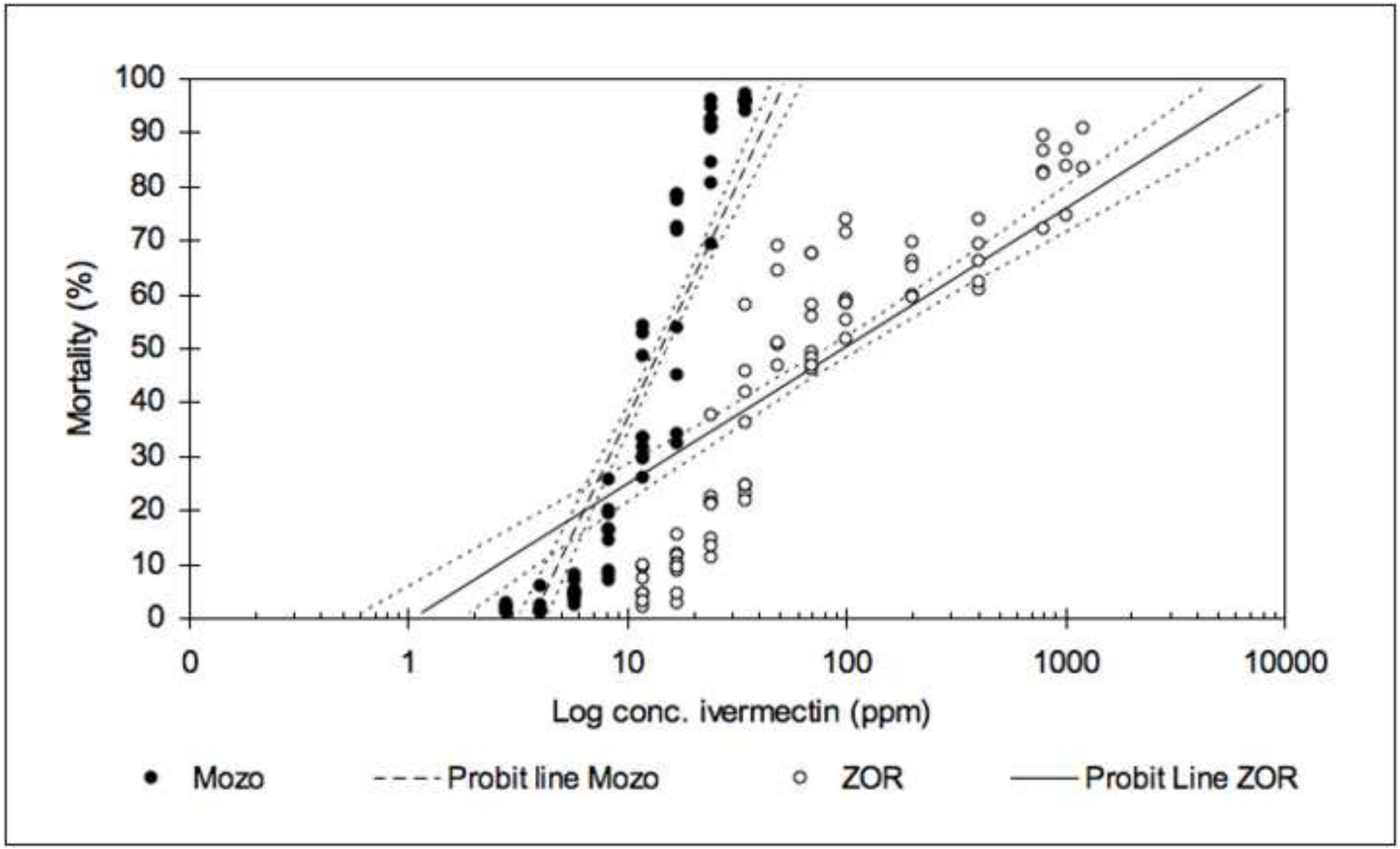


Figure 5
Click here to download high resolution image

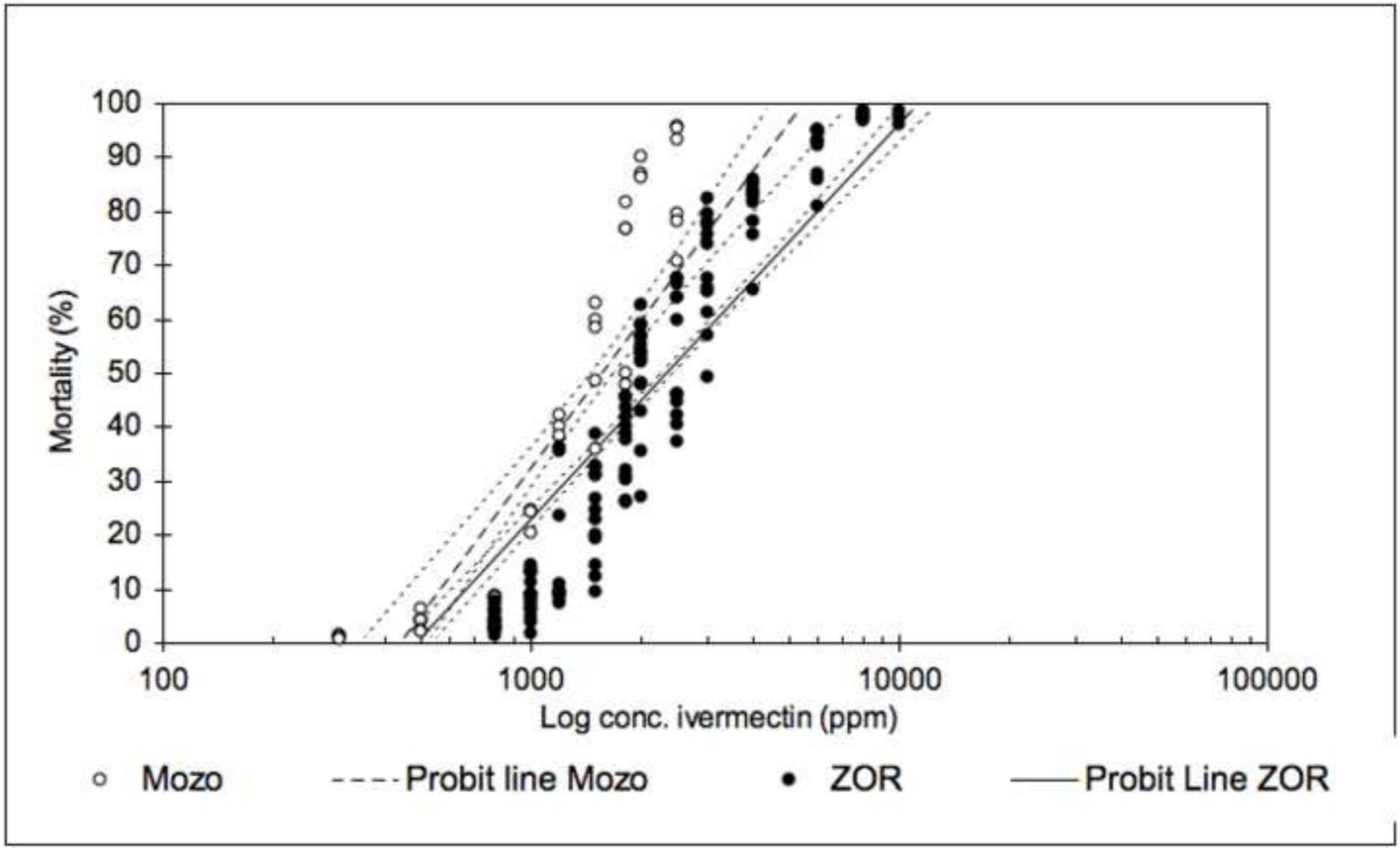


Figure 6

Click here to download high resolution image

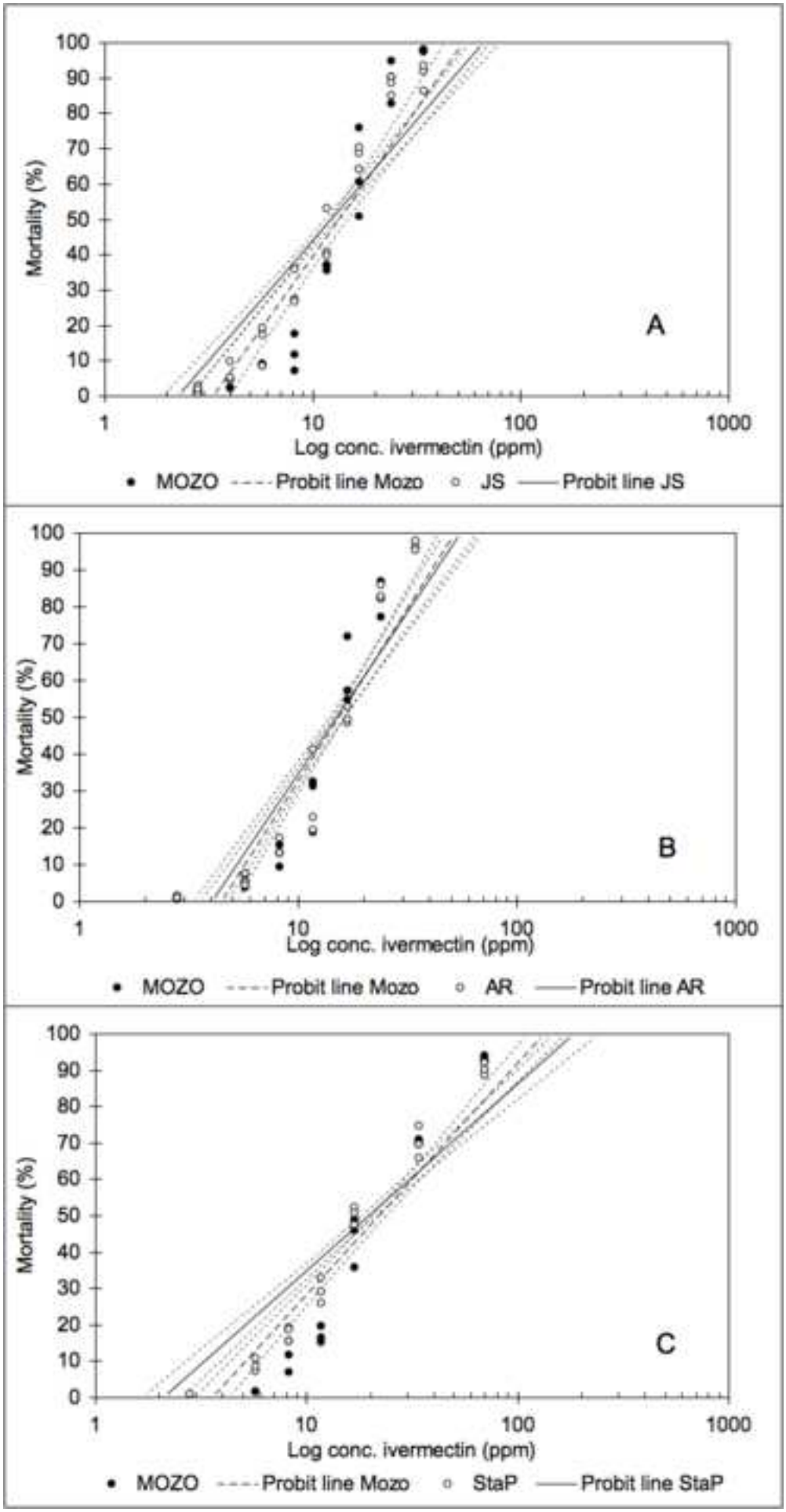


Figure 7

Click here to download high resolution image

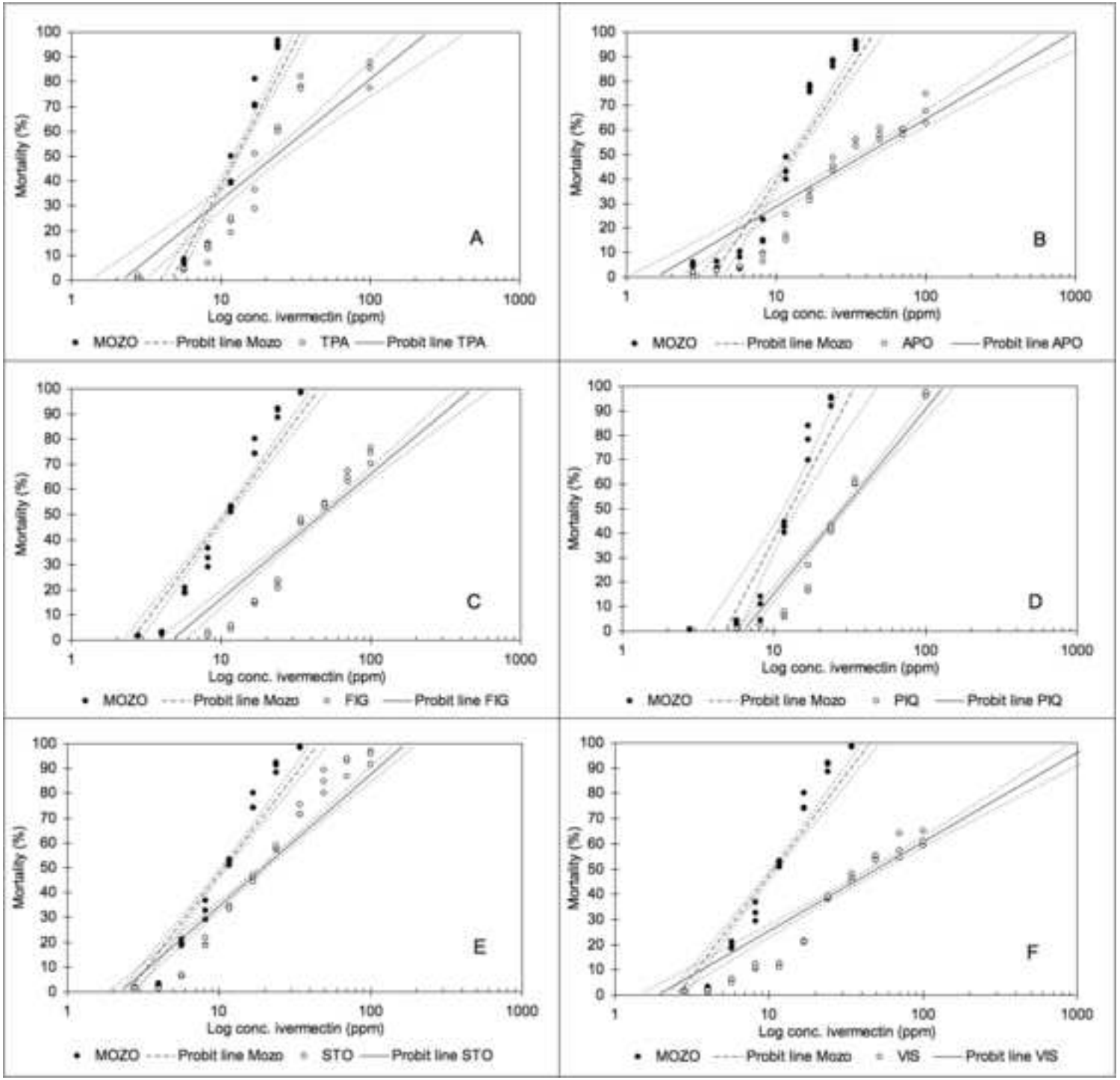
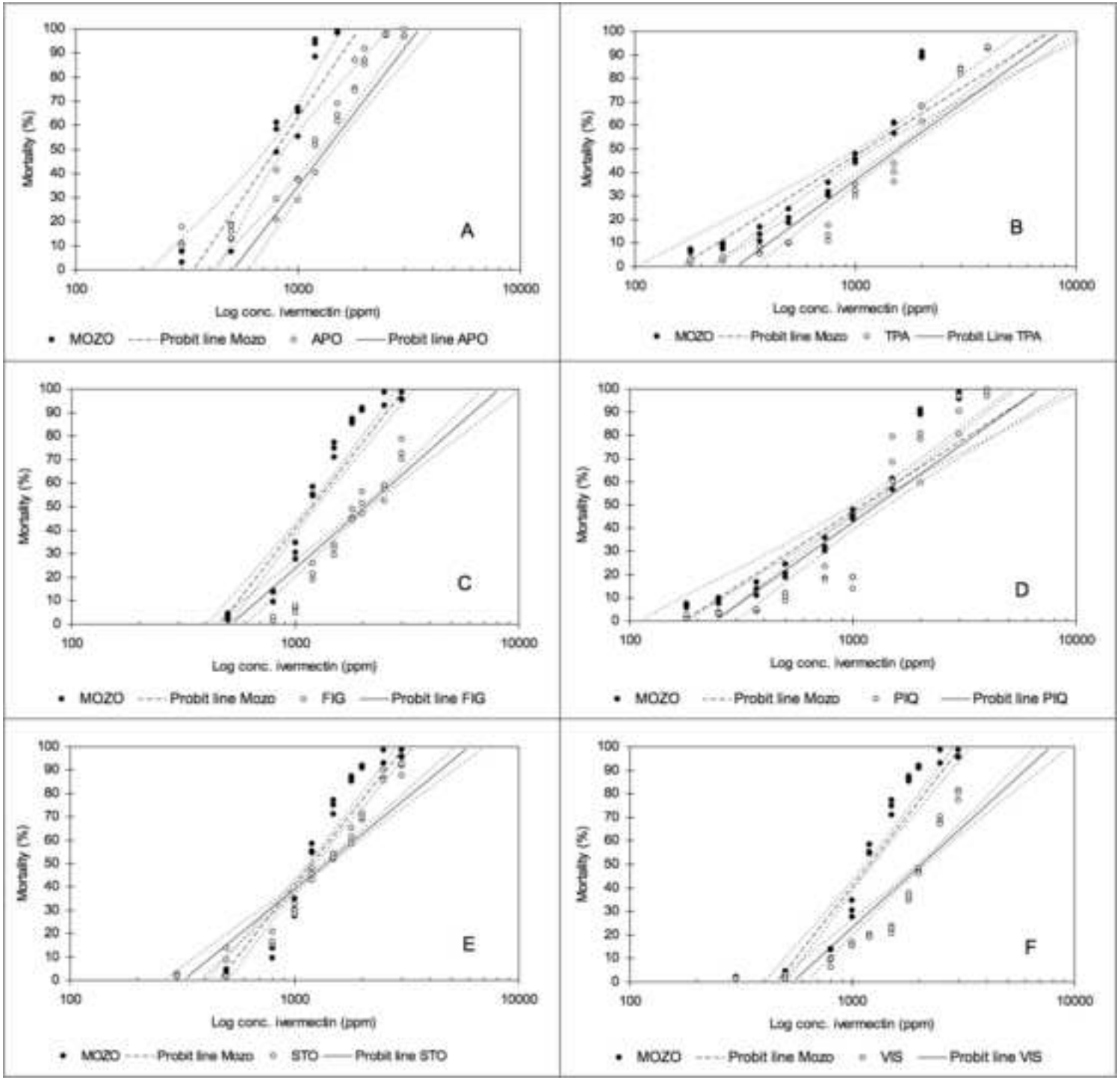


Figure 8

Click here to download high resolution image



Veterinary Parasitology 168 (2010) 97–104

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Selection of an ivermectin-resistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil

Guilherme Marcondes Klafke [a,*], Thais Aguiar de Albuquerque [a], Robert John Miller [b], Teresinha Tizu Sato Schumaker [a]

[a] Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, Lab. 41, São Paulo 05508-900, SP, Brazil
[b] USDA-ARS, Cattle Fever Tick Research Laboratory, 22675 North Moorefield Rd, Edinburg, TX 78541, USA

ARTICLE INFO

Article history:
Received 5 May 2009
Received in revised form 1 October 2009
Accepted 4 October 2009

Keywords:
Southern cattle-tick
Resistance
Selection
Ivermectin

ABSTRACT

Resistance to ivermectin (IVM) in field populations of *Rhipicephalus microplus* of Brazil has been observed since 2001. In this work, four selection methods (infestations with: (1) IVM-treated larvae; (2) larvae from IVM-treated adult female ticks; (3) larvae from IVM-treated adult female ticks on an IVM-treated host; and (4) larvae obtained from IVM-treated females that produced eggs with a high eclosion rate) were used on a field population with an initial ivermectin (IVM) resistance ratio at LC50 (RR50) of 1.37 with the objective to obtain experimentally a highly-resistant strain. After ten generations, using these methods combined, the final RR50 was 8.06. This work shows for the first time that it was possible to increase IVM resistance in *R. microplus* in laboratory conditions. The establishment of a drug resistant *R. microplus* strain is a fundamental first step for further research into the mechanisms of ivermectin-resistance in *R. microplus* and potentially methods to control this resistance.

© 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Rhipicephalus microplus infestation is responsible for US$ 1 billion of losses per year in Latin-America (FAO, 2004), considering direct production losses and the cost of chemical control. As in other countries, the situation of resistance to acaricides in Brazil is serious. Resistance has been confirmed for organophosphates (Furlong, 1999), synthetic pyrethroids (Arantes et al., 1996), amitraz (Martins, 1995), and recently to ivermectin (Martins and Furlong, 2001; Klafke et al., 2006) and fipronil (Castro-Janer, personal communication). Fluazuron and spinosad resistance has not yet been detected in *R. microplus*.

In Brazil, from 2002 to 2006, commercialization of endectocides increased by 33%, accumulating US$ 635 million in sales, with prices per dose varying between US$ 0.10 and US$ 1.00 (SINDAN, 2007). As expected, the huge selective pressure caused by the massive application of ivermectin in the past years resulted in the development of resistance to ivermectin in the nematodes *Haemonchus* spp., *Trichostrongylus* spp. and *Cooperia* spp. during this period (Soutello et al., 2007).

The mode of action of ivermectin is attributed to its high-affinity binding to glutamate and/or gamma-amino-butyric acid receptors that control chloride ion-channels located in the muscle and nervous cells of invertebrates (Cully et al., 1994). The uninterrupted opening of these channels causes a slow and irreversible rising of the membrane conductance, leading to muscle paralysis and consequent death of the parasite (Geary et al., 1993).

Resistance to MLs has been described worldwide in number of species of nematodes and arthropods. Intensive use of pesticides along with the lack of early detection of the increase in the number of resistant individuals has been characteristic of many cases of resistance in the field (Shoop, 1993). For ruminant gastrointestinal parasites,

* Corresponding author. Tel.: +55 11 30917273; fax: +55 11 30917417.
E-mail address: gmklafke@usp.br (G.M. Klafke).

0304-4017/$ – see front matter © 2009 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.vetpar.2009.10.003

resistance to MLs has been found wherever these drugs were used (Blackhall et al., 2003). The mechanism of resistance to ivermectin in nematodes has been attributed to the insensitivity of the GluCl receptor, which prevents the drug binding to its target-site (Cully et al., 1994). Studies with *Drosophila melanogaster* also showed that a target-site (GluCl) mutation was responsible for resistance to ivermectin (Kane et al., 2000). Other reports have identified ivermectin-resistance in *Lucillia cuprina* (Rugg et al., 1998), *Sarcoptes scabiei* (Currie et al., 2004) and to abamectin in *Musca domestica* (Scott, 1989) and *Leptinotarsa decemlineata* (Argentine et al., 1992). In arthropods, the major mechanisms of resistance determined have been related to an increase in excretion and oxidative metabolism (by cytochrome P450 monooxigenase activity) and a decrease in drug penetration. Furthermore, conjugation by glutathione-S-transferase and hydrolysis by esterases, have been described as secondary mechanisms (Clark et al., 1994).

In Brazil, farmers have described a lack of ivermectin efficacy and, considering its massive use for approximately 20 years, it is possible that resistance has spread throughout the country.

Martins and Furlong (2001) made the first report of ML resistance in *R. microplus* in the State of Rio Grande do Sul, in southern Brazil. On that study, a preliminary evaluation at field conditions showed that a population of the cattle-tick (São Gabriel strain) was not successfully controlled after treatments with doramectin. Martins isolated and submitted The strain to adult immersion tests (AIT) with MLs using the protocol suggested by Sabatini et al. (2001). The results showed that the São Gabriel strain was able to survive and produce viable eggs after immersion treatment with 200–1000 ppm of ivermectin and moxidectin, and that the susceptible strain (Porto Alegre) presented 100% mortality with those concentrations. However, it was stated that AIT presented too much variation between the tests and to confirm resistance, stall tests were conducted with doramectin, ivermectin and moxidectin that demonstrated low efficacy of these molecules to the control the São Gabriel strain in comparison to Porto Alegre strain (Martins, J.R., personal communication).

In 2004, one experiment was conducted in the Vale do Paraíba region (east of the State of Sao Paulo), an area in which *R. microplus* is endemic with serious problems of acaricide resistance. This research led to the first *in vitro* detection of an ivermectin-resistant population of *R. microplus* (Klafke et al., 2006). Using a larval immersion test (LIT) technique proposed by Sabatini et al. (2001). This study successfully differentiated a Brazilian susceptible reference strain (Porto Alegre) from a population suspected to be resistant (Barra Alegre). The Barra Alegre population was obtained from a property in the municipality of Piquete-SP that had used ivermectin for at least 10 years on tick control, and was shown to have a resistance ratio of 3.78 to ivermectin when compared to a susceptible laboratory-reared strain (Porto Alegre).

With the recent detection of ivermectin-resistance in tick populations, the isolation and maintenance of a resistant strain is crucial, and is important for the determination of the ivermectin-resistance mechanisms in cattle-tick, the standardisation of resistance diagnosis tests, the evaluation of cross-resistance with other acaricides, and the determination of the pattern of inheritance of this resistance trait. Knowledge of these factors is essential for the development of resistance management programs for this important pesticide. Here we report the isolation and methods of selection for resistance to ivermectin in the Piquete strain of *R. microplus*.

2. Materials and methods

2.1. Tick strains

A group of 37 engorged females of Barra Alegre population were manually collected directly from Holstein-Friesian cows on a dairy farm located in the municipality of Piquete (State of Sao Paulo, Brazil – 22°33′45″S, 45°11′15″W) and taken to the laboratory on January, 2005. In order to differentiate the isolated strain from the field population Barra Alegre it will be nominated Piquete strain. The Porto Alegre strain (POA), originally collected from Porto Alegre, State of Rio Grande do Sul, was used as susceptible control.

2.2. Hosts

One-month-old Holstein-Friesan calves were obtained from a dairy farm and cleaned of ticks with a pour-on formulation mixture of chlorpyriphos, cypermethrin, and citronella oil (Colosso® Pour-on, Ouro Fino Saúde Animal, Ribeirão Preto-SP, Brazil). When 4-month-old and 5 days before infestation, each calf was treated for potential babesia infections with 4,4′-diazoamine dibenzamidine diaceturate (Ganaseg®, Novartis, São Paulo-SP, Brazil). The animals were individually held in a 3 m × 3 m pen on a ranch with no other cattle, located at the municipality of Valinhos, SP. Calves were inspected for the presence of ticks before each infestation and all experiments were conducted following the recommendations of the Committee of Ethics on Animal Experimentation of the Institute of Biomedical Sciences/University of Sao Paulo (registry number: 044-15-2).

2.3. Ivermectin-resistance evaluation

2.3.1. Ticks

R. microplus engorged females of the Piquete strain were collected three times a day (early morning, mid-day and late afternoon) after natural detachment from the experimental animals. After washing with distilled water and drying on paper towels, females were weighted and placed in Petri dishes (90 mm diameter × 20 mm high). The ticks were maintained in an incubator at 27–28 °C, 85–90% R.H. in the dark. Fourteen days after oviposition, females were discarded, and their eggs were transferred to glass vials closed with cotton plugs until larval hatching. All larvae used for the infestations and bioassays were 14–21 days old. Approximately 20,000 larvae were used on each infestation. These procedures were repeated for each generation.

2.3.2. Larval immersion test

The modified larval immersion test (Klafke et al., 2006) was performed on each generation of the Piquete strain using ivermectin injectable formulation 1% (IVOMEC®, Merial Saúde Animal Ltda., Campinas-SP, Brazil; batch number 195/03, exp. date August, 2007). The Porto Alegre (POA) strain was used as susceptible control.

In 15 mL centrifuge plastic tubes, 1% commercial formulation of ivermectin was diluted with a vehicle, consisting of an aqueous solution containing ethanol P.A. (1%) with 0.02% Triton-X 100, in order to prepare the high concentration immersion solutions for each of the assays. The high concentration solutions were then serially diluted by 50% using additional vehicle solution in 15 mL plastic centrifuge tubes in order to obtain several concentrations aiming to achieve 0–100% larval mortality in each test. One milliliter of each solution was distributed in 1.5 mL microcentrifuge tubes, and approximately 500 larvae were added with a paintbrush to each tube, which was closed and shaken for 10 min. After shaking, the tubes were opened and approximately 100 larvae of each solution were transferred with a clean paintbrush to a filter paper. The filter paper was then folded in the half and sealed with sticky tape (Highland® 3 M, Sumare-SP, Brazil), forming a packet. These packets were incubated for 24 h at 27–28 °C, 85–90% R.H., in the dark. After this, the packets were opened and the alive and dead larvae were counted for the determination of mortality. Larvae that were moving their legs but without the capability of walk were considered dead. All concentrations were replicated at least three times.

3. Data analysis

Probit analysis was run on the bioassay results using Polo-Plus (LeOra Software, 2004). For each test, the following parameters were estimated: LC50 and LC99 (Lethal Concentration for 50% or 99% mortality) and the slope of the regression line. The resistance ratio (RR) was calculated as the comparative susceptibility of the resistant population to the susceptible reference population, the LC50 and LC99 for the each generation of the Piquete strain and the LC50 and LC99 for the Porto Alegre strain, respectively. Resistance ratios for comparison at LC50 and LC99 and their confidence intervals were generated using the formula described by Robertson et al. (2007). The significance of each comparison was determined when the calculated confidence intervals (95% CI) were $\neq$1.0.

4. Selection for ivermectin-resistance

4.1. In vitro selection of larvae

Approximately 40,000 larvae of Piquete strain, generation F2, were treated by immersion in an ivermectin solution in water with ethanol 1% and 0.02% Triton-X at the LC50 for this generation. LC50 was chosen to allow the survival of at least 50% of the larvae (approximately 20,000). After 24 h, the remaining larvae were used to infest the host. As a treatment control, another calf was infested with larvae treated with ethanol 1% and 0.02% Triton-X.

4.2. In vitro selection of engorged females

A group of 30 engorged females (generation F2 and F3) were submitted to immersion in a 50 mL centrifuge tube, with 20 mL of 250 ppm ivermectin aqueous solution for 30 min. This concentration was used because it allowed females oviposition and production of at least 20,000 larvae. After ivermectin exposure, the females were dried on paper towels and placed in plastic Petri dishes for oviposition. After 14 days, the egg masses were weighed and transferred to glass tubes for the larvae eclosion. Fourteen-day-old larvae (F3 and F4) from treated adults (F2 and F3) were used to infest cattle, and samples of larvae from the untreated adults were used in the LIT for resistance assessments of the respective generations.

4.3. Selection by treatment of the engorged females and the host

Generations F5, F6, and F7, were treated twice. Approximately 20,000 larvae, obtained from treated engorged females (as described in the above section), were used to infest calves treated on the infestation day with a commercial formulation of ivermectin 1% (IVOMEC1%), at the label rate (200 μg/kg L.W.).

4.4. Selection according to the reproductive performance of engorged females

Egg masses from engorged females (F7 and F8) fed on ivermectin-treated calves were separated into three groups. One group included egg masses of high hatchability (>80%). A second group was formed from egg masses with low hatchability (<30%). A third group was formed from larvae of the remaining females independent of larval hatch. From each group, three samples of larvae were submitted to LIT for resistance evaluation. The group with the highest observed resistance ratio was used to infest an ivermectin-treated calf for colony propagation.

5. Results

Bioassay results from the F1 generation of the Piquete strain compared to the susceptible Porto Alegre strain produced a RR (95% CI) of 1.37 (1.09–1.98) and 1.98 (1.15–8.57) at the LC_{50} and LC_{99} estimates, respectively. The first generation larvae were used to infest an untreated calf to produce the F2 generation. The bioassay results of the F2 larvae produced a RR (95% CI) of 1.44 (1.07–1.93) and 2.90 (1.84–6.98) at the LC_{50} and LC_{99} estimates, respectively. There were no changes in dose–response estimates of ivermectin between F1 and F2 generations, and their RR_{50} and RR_{99} presented no significant differences (Fig. 1, Table 1).

5.1. Selection by treatment of larvae

The infestation of surviving larvae of the F2 generation treated with ivermectin at LC_{50} (7.6 ppm) on untreated calves resulted in no engorged females, whereas infestation with larvae treated with only the vehicle (ETH-TX2%) succeeded in producing engorged females. The F2 untreated

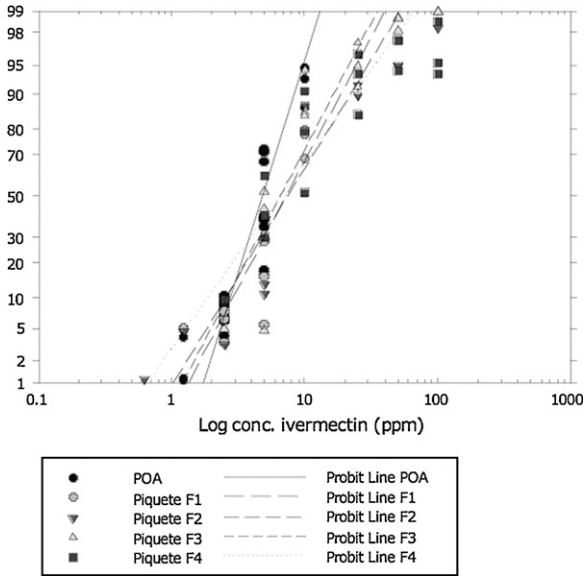


Fig. 1. Dose mortality lines for ivermectin of *Rhipicephalus microplus* larvae from POA and generations F1–F4 of the Piquete strain, determined with the LIT technique.

larvae were used to infest a calf and obtain F2 engorged females.

5.2. Selection by adult treatment

F2 and F3 engorged females treated by immersion in ivermectin at 250 ppm were used to obtain the respective F3 and F4 larvae that were infested on untreated calves. Resistance to ivermectin assessed by LIT did not change, RR_{50} and RR_{99} (95% CI) were 1.25 (0.88–1.78), 1.85 (1.14–6.09) and 1.30 (0.96–1.76), 3.16 (1.92–8.35) for the F3 and F4 generations, respectively. No significant changes on slope values were noted (Fig. 1, Table 1).

5.3. Selection by treatment of the engorged females and the host

Infestations conducted with larvae from the F4 generation on ivermectin-treated calves at 200 μg/kg resulted in fully engorged, fertile females. Larvae of the F5 generation showed a significant increase on the RR estimates, 3.33 (2.50–4.31) and 18.74 (12.01–36.65) for the LC_{50} and LC_{99} estimates, respectively, compared to F4. The slope value (±standard error) of F5 (1.809 ± 0.047) was significantly different of F4 (2.526 ± 0.095) ($p < 0.05$). For the F6 and F7 generations, both obtained from ivermectin-treated calves at 200 μg/kg, the measured level of ivermectin-resistance was stable. The RR_{50} and RR_{99} and slope values between F5, F6 and F7 showed no significant differences (Table 1).

5.4. Selection according larvae hatchability

Table 2 shows the fertility parameters of the F7 females, RRs at the LC_{50} and LC_{99} estimates, and slope values for each group of F8 larvae (low hatchability, high hatchability

Table 1
Lethal concentrations and resistance ratios to ivermectin obtained by Larval Immersion Tests with *Rhipicephalus microplus*, POA strain and the different generations of the Piquete strain.

Strain generation	*N*	Slope (S.E.)	LC_{50} (95% CI) (ppm)	LC_{99} (95% CI) (ppm)	RR_{50} (95% CI)	RR_{99} (95% CI)
POA (sus)	17,287	4.343 ± 0.111	5.31 (5.14–5.49) a	18.22 (16.84–19.86)	–	–
Piq.F1[a]	2,204	3.349 ± 0.140	7.28 (5.62–10.90) b	36.06 (19.38–170.16)	1.37 (1.09–1.98) a	1.98 (1.15–8.57)
Piq.F2[a]	2,157	2.776 ± 0.107	7.66 (5.48–10.60) ab	52.77 (30.94–138.65)	1.44 (1.07–1.93) a	2.90 (1.84–6.98)
Piq.F3[b]	4,529	3.299 ± 0.094	6.65 (4.51–9.79) ab	33.74 (19.13 – 121.04)	1.25 (0.88–1.78) a	1.85 (1.14–6.09)
Piq.F4[b]	2,075	2.526 ± 0.095	6.91 (4.90–9.64) ab	57.62 (32.33–165.74)	1.30 (0.96–1.76) a	3.16 (1.92–8.35)
Piq.F5[c]	1,949	1.809 ± 0.047	17.68 (12.83–23.66) c	341.41 (202.29–727.90)	3.33 (2.50–4.31) b	18.74 (12.01–36.65)
Piq.F6[c]	3,052	1.454 ± 0.035	18.22 (12.68–26.08) c	725.69 (360.73–2010.64)	3.43 (2.47–4.75) b	39.83 (21.42–101.24)
Piq.F7[c]	3,359	1.558 ± 0.045	14.95 (8.56–24.31) bc	465.26 (194.55–2290.98)	2.82 (1.67–4.43) ab	25.54 (11.55–115.36)
Piq.F8[d]	1,518	1.209 ± 0.036	21.16 (16.82–26.64) c	1776.30 (1083.03–3256.64)	3.98 (3.27–4.85) b	97.49 (64.31–136.98)
Piq.F9[d]	1,886	1.193 ± 0.027	43.20 (35.35–53.15) d	3855.43 (2313.98–7223.75)	8.14 (6.88–9.68) c	211.60 (137.40–363.73)
Piq.F10[d]	2,290	1.200 ± 0.045	42.84 (29.76–62.53) d	3716.88 (1500.64–15086.89)	8.06 (5.79–11.39) c	204.00 (89.11–759.66)

N: number of larvae tested; S.E.: standard error; LC: lethal concentration; CI: confidence interval; RR: resistance ratio; different letters within the same columns refer to statistically different values.
[a] No treatment.
[b] Adult treatment.
[c] Host treatment.
[d] Selection according larvae hatchability.

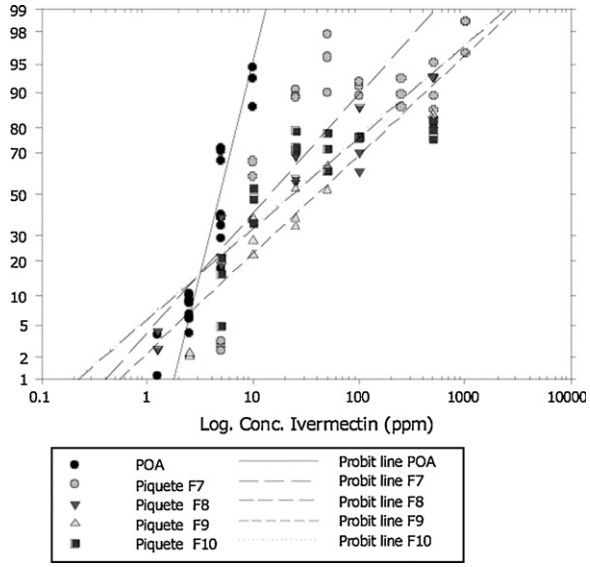


Fig. 2. Dose mortality lines for ivermectin of *Rhipicephalus microplus* larvae from POA and generations F7–F10 of the Piquete strain, host treatment and selection according larvae percent hatch, determined with the LIT technique.

and pool of all females). The observed RR_{50} (95% CI) of the F8 larvae of high and low percent hatch groups were significantly different, 3.17 (2.47–4.04) and 1.46 (1.09–1.95), respectively. No increase in RR was observed between larvae from the F8 and F7 generations. The larvae from F8 high percent hatch group were used to infest an ivermectin-treated calf and the resultant F9 larvae showed a significant increase on RR_{50} (95% CI) (8.14 (6.88–9.68)) (Fig. 2, Table 1). However, when the F9 larvae of the high percent hatch group were infested on untreated cattle, there was no increase in ivermectin-resistance for the F10 larvae, RR_{50} (95% CI) 8.06 (5.79–11.39). The increase of the resistance ratios at LC_{99} from F1 to F10 generations of the Piquete strain, in relation with the method of selection, is illustrated in Fig. 3.

6. Discussion

Considering that ivermectin and its analogues have been used intensively for the control of endo and ectoparasites worldwide, it is reasonable to theorize that the spread of parasite resistant populations and the accompanying producer complaints about the lack of efficacy of these products is due to the evolution of resistance to these molecules in brazilian cattle-tick populations.

In Brazil, although the utilization of MLs for cattle-tick control is intensive and there is a suspicion that is widespread, there are only two reports that document the presence of ML resistance in the country (Martins and Furlong, 2001; Klafke et al., 2006). The study of ivermectin-resistance, the ML most used for tick control, is fundamental for the development of strategic control programs for these ectoparasites. With this study, we successfully selected one ivermectin-resistant strain in order to begin

Table 2
Mean values for engorged females weight, egg mass weight, hatchability and fertility indexes from POA and generation F7 of Piquete strain of *Rhipicephalus microplus*; and, toxicity values of ivermectin for generation F8 of larvae of the Piquete strain.

Adult females	*N*	Female weight (±S.D.) (mg)	Egg weight (±S.D.) (mg)	Hatchability (±S.D.) (%)	Fertility indexes (±S.D.)	LC_{50} (95% CI) larvae F8	RR_{50} (95% CI) larvae F8
POA	51	260 ± 56	140 ± 114	70 ± 30	0.37 ± 0.17 a	5.31 (5.14–5.49) a	–
F7 low hatch	28	137 ± 61	53 ± 30	16 ± 11	0.06 ± 0.05 b	7.80 (5.61–10.73) a	1.46 (1.09–1.95) a
F7 pool	129	145 ± 53	63 ± 31	51 ± 34	0.24 ± 0.18 c	16.83 (12.68–22.18) b	3.17 (2.47–4.04) b
F7 high hatch	33	134 ± 55	64 ± 33	84 ± 10	0.39 ± 0.09 a	21.16 (16.82–26.64) b	3.98 (3.27–4.85) b

N: number of observed engorged females; S.D.: standard deviation; LC: lethal concentration; CI: confidence intervals; RR: resistance ratio; different letters within the same columns refer to statistically different values (*t* test for fertility index; interpolation of 95% CI for RRs and LCs).

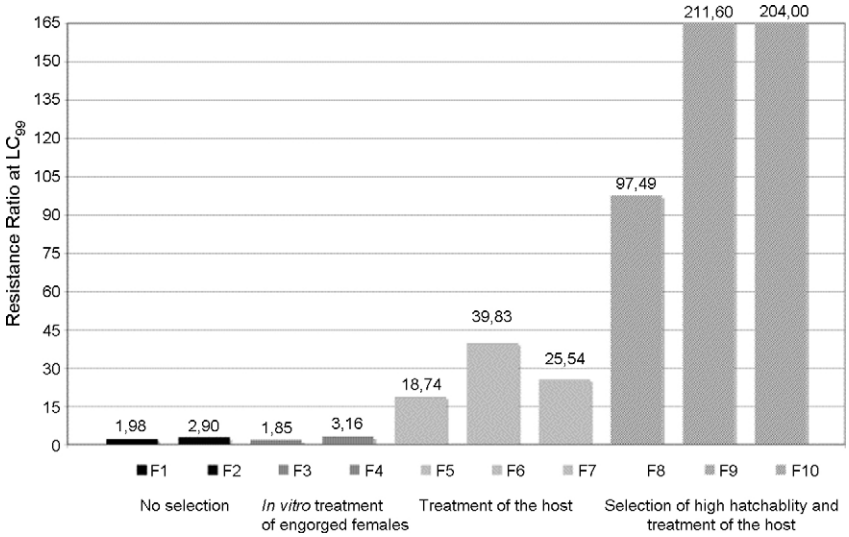


Fig. 3. Resistance ratios at LC_{99} to ivermectin, determined by the Larval Immersion Test with *Rhipicephalus microplus* of the Piquete strain generations F1–F10, according the method of selection.

the work to characterize ivermectin-resistance in the future.

The selection and isolation of acaricide resistant strains of *R. microplus* has been achieved for amitraz (Vargas et al., 2003), permethrin (Davey and George, 1998) and coumaphos (Davey et al., 2003). In all of these experiments, the selection of resistant individuals was made using larvae exposed to pesticide, after which the survivors were used to infest the hosts in order to propagate the next generation. In the present paper, four methodologies were used in order to select the ivermectin-resistant strain: (1) cattle infestation with IVM-treated larvae; (2) with larvae from IVM-treated adult female ticks; (3) with larvae from IVM-treated adult female ticks on an IVM-treated host; and (4) with larvae obtained from IVM-treated females that produced eggs with a high eclosion rate.

The application to calves of larvae selected by immersion in ivermectin at LC50 calculated for generation F2 and F3 (respectively, 7.66 ppm and 6.65 ppm) did not succeed. At the time of infestation, 24 h after treatment, the surviving larvae were active. However, after 1 week, there were no observable larvae or nymphs on the host. A possible effect of the solution vehicle (Triton-X 100 and ethanol) was assessed, but this hypothesis was discarded because vehicle treated larvae could develop on the host. It is possible that the residual effect of ivermectin killed the remaining larvae. To assess this effect, the mortalities of one group of larvae treated by immersion with 1.25 ppm of ivermectin, and a control group (vehicle treated) were evaluated for 36 days (data not shown). Six days after treatment, it was observed that 15% of the ivermectin-treated larvae had died, and by the 30th day, mortality had reached 100%. Within the control group, 80% of larvae stayed alive until the 36th day. This is suggestive of a residual effect of ivermectin on treated larvae (toxicosis), preventing their attachment to the host.

For the adult immersion assays, it was observed that engorged females exposed to a concentration of 1000 ppm were capable of laying eggs and generating viable larvae. However the amount of larvae obtained was insufficient to infest cattle. The concentration of 250 ppm of ivermectin was then chosen to treat engorged females of generations F2 and F3. This concentration was used because it allowed the production of at least 20,000 larvae for follow-on infestations. Although these infestations produced viable engorged females, there were no significant differences in the resistance ratios between the F2–F4 generations (Table 1, Fig. 3).

Selection by injection of the host resulted in effective selection for resistance to ivermectin. Ivermectin acts systemically and it is distributed through the blood plasma of the animal (Fink and Porras, 1989). As ticks feed on treated cattle, they ingest the drug. It is known that macrocyclic lactones are much more toxic for arthropods when ingested than topically (Rugg et al., 2005). The F4 larvae were used to infest an ivermectin-treated calf and developed normally into fertile engorged females. The offspring (F5) collected from this selection, showed a higher RR. Two follow-on infestations were conducted on treated hosts, resulting in fertile engorged females. These females produced the F6 and F7 generations of larvae, submitted to LIT. Although RR_{99} of these two generations did not show significant differences between them, it did produce a significant increase on RR_{99} when compared to the selection based on treatment of engorged females only. Moreover, the number of surviving larvae at high doses (>100 ppm of ivermectin) rose from 5% in the F6 generation to approximately 15% in the F7 generation (Fig. 4), suggesting an increase in the frequency of resistant individuals within the population.

As a response to ongoing selection, the confidence interval estimates from LC_{50} and LC_{99} increased significantly, indicating an increase in the proportion of individuals that could survive at higher concentrations of ivermectin. This was reflected in the slope values of

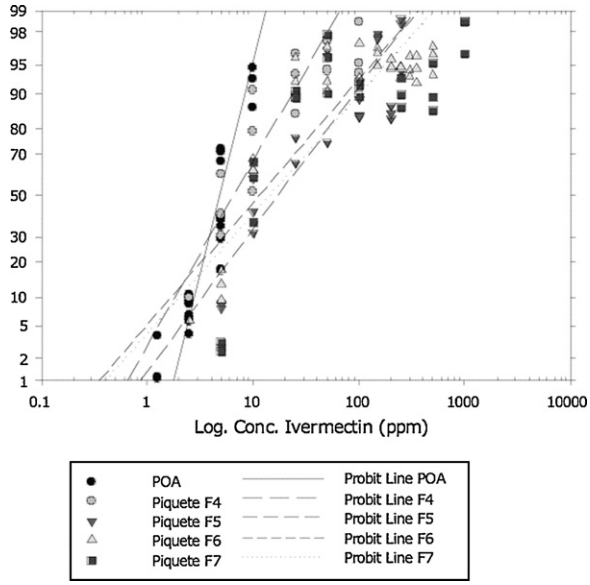


Fig. 4. Dose mortality lines for ivermectin of *Rhipicephalus microplus* larvae from POA and generations F4–F7 of the Piquete strain, host treatment and engorged females selection method, determined with the LIT technique.

dose–response lines, which decreased from 3.299 (F3) to 1.454 (F6). Decrease in the slope values is characteristic of populations under selection for resistance (Roush and Tabashnik, 1990).

One of the effects of the intoxication by ivermectin in ticks is the reduction of the reproductive performance of engorged females. Individual egg masses from engorged females fed on treated cattle (F7), were separated into groups of high hatch (above 80%) and low hatch (below 30%). Larvae (F8) from these groups were submitted to LIT and it was observed that the high hatchability group presented a 3-fold higher RR than the low percent hatch group. It is important to note that the LC_{50} of the low percent hatch group was not significantly different from LC_{50} value of POA susceptible strain (Table 2). It is possible that the low percent hatch group is representative of the susceptible individuals of the studied strain, and the high percent hatch group represents the resistant individuals. Next, when the high percent hatch group was used to infest the hosts, a significant increase on the RR_{50} from F7 (2.82) to F9 (8.14) was observed (Table 1), showing that the frequency of resistant individuals in the population increased. The present research does not allow us to draw any conclusion about the efficiency of each adopted strategy alone for the strain selection, since the F10 RRs are the result of the combined effects of all treatments together and of the time-effect of selection itself.

With the recent detection of LM resistant cattle-tick populations and the experimental isolation of an ivermectin-resistant strain, new opportunities for research are now available for the characterization of inheritance and mechanisms of ivermectin-resistance to these molecules, contributing to rational resistance management in *R. microplus*.

7. Conclusion

In the present work we produced, under different conditions of selective pressure, a significant increase in the resistance ratios of ivermectin from the initial generation (F2) to the last generation analyzed (F10), and established experimentally the first isolation of ivermectin-resistant strain of *R. microplus*.

Acknowledgements

We would like to thank Dr. Itabajara da Silva Vaz Junior, from Núcleo de Biotecnologia of UFRGS, RS, Brazil, for providing the Porto Alegre strain, the financial support of "Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico" (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and the reviewers of Veterinary Parasitology for the critical review of this article.

References

Arantes, G.J., Marques, A.O., Honer, M.R., 1996. The cattle tick, *Boophilus microplus*, in the municipality of Uberlandia, MG: analysis of its resistance to commercial acaricides. Rev. Bras. Paras. Vet. 4, 89–93.

Argentine, J.A., Clark, J.M., Lin, H., 1992. Genetics and biochemical mechanisms of abamectin resistance in two isogenic strains of Colorado potato beetle. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 44, 191–207.

Blackhall, W.J., Prichard, R.K., Beech, R.N., 2003. Selection at a gamma-aminobutyric acid receptor gene in *Haemonchus contortus* resistant to avermectins/milbemycins. Mol. Biochem. Parasitol. 131, 137–145.

Clark, J.K., Scott, J.G., Campos, F., Bloomquist, J.R., 1994. Resistance to avermectins: extent. Mechanisms and management implications. Ann. Rev. Entomol. 40, 1–30.

Cully, D.F., Vassilatis, D.K., Liu, K.K., Paress, P.S., Van Der Ploeg, L.H.T., Schaeffer, J.M., Arena, J.P., 1994. Cloning of an avermectin-sensitive glutamate-gated chloride channels from *Caenorhabditis elegans*. Nature 371, 707–711.

Currie, B.J., Harunal, P., Mckinnon, M., Walton, S.F., 2004. First documentation of in vivo and in vitro ivermectin resistance in *Sarcoptes scabiei*. Clin. Infect. Dis. 39, e8–e12.

Davey, R.B., George, J.E., 1998. In vitro and in vivo evaluations of a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) selected for resistance to permethrin. J. Med. Entomol. 35, 1013–1019.

Davey, R.B., George, J.E., Miller, R.J., 2003. Efficacy of various concentrations of coumaphos to control adult, nymphal, and larval stages of an organophosphate-resistant strain of *Boophilus microplus* on infested cattle. Am. J. Vet. Res. 64, 684–689.

FAO, 2004. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants – Guidelines, Module 1 – Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention. Food and Agriculture Organization, Animal Production and Health Division, Rome, p. 53.

Fink, D.W., Porras, A.G., 1989. Pharmacokinetics of ivermectin in animals and humans. In: Campbell, W.C. (Ed.), Ivermectin and Abamectin. Spring-Verlag, New York, pp. 111–130.

Furlong, J., 1999. Diagnosis of the susceptibility of the cattle tick, *Boophilus* spp. to acaricides in Minas Gerais State, Brazil.In: V Seminario Internacional de Parasitologia Animal, CONASAGA, Puerto Vallarta, Mexico, pp. 41–46.

Geary, T.G., Sims, S.M., Thomas, E.M., Vanover, L., Davis, J.P., Winterrowd, C.A., Klein, R.D., Ho, N.F., Thompson, D.P., 1993. *Haemonchus contortus*: ivermectin-induced paralysis of the pharynx. Exp. Parasitol. 77, 88–96.

Kane, N.S., Hirschberg, B., Qian, S., 2000. Drug-resistant *Drosophila* indicate glutamate-gated chloride channels are target for the antiparasitic nodulospuric acid and ivermectin. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 97, 13949–13954.

Klafke, G.M., Sabatini, G.A., Albuquerque, T.A., Martins, J.R., Kemp, D.H., Miller, R.J., Schumaker, T.T.S., 2006. Larval Immersion Tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*)

microplus (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. Vet. Parasitol. 142, 386–390.

LeOra Software, 2004. Polo Plus Probit and Logit Analysis: User's Guide, Berkeley, p. 36.

Martins, J.R., 1995. A situation report on resistance to acaricides by the cattle tick *Boophilus microplus* in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. In: III Seminario Internacional de Parasitologia Animal, INIFAP, Acapulco, Mexico, pp. 1–8.

Martins, J.R., Furlong, J., 2001. Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. Vet. Rec. 149, 64.

Robertson, J.L., Preisler, H.K., Russel, R., Savin, N.E., 2007. Bioassays with Arthropods, 2nd revised edition. CRC Press, Taylor & Francis, p. 224.

Roush, R.T., Tabashnik, B.E., 1990. Pesticide Resistance in Arthropods. Chapman and Hall, London, p. 303.

Rugg, D., Kotze, A.C., Thompson, D.R., Rose, H.A., 1998. Susceptibility of laboratory-selected and field strains of the *Lucilia cuprina* (Diptera: Calliphoridae) to ivermectin. J. Econ. Entomol. 91, 601–607.

Rugg, D., Buckingham, S.D., Sattelle, D.B., Jansson, R.K., 2005. The Insecticidal macrocyclic lactones. In: Gilbert, L.I., Iatrou, K., Gill, S.S. (Eds.), Comprehensive Molecular Insect Science. Elsevier, Amsterdam, pp. 25–52.

Sabatini, G.A., Kemp, D.H., Hughes, S., Nari, A., Hansen, J., 2001. Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. Vet. Parasitol. 95, 53–62.

Scott, J.G., 1989. Cross-resistance to the biological insecticide abamectin in pyrethroid-resistant house flies. Pestic. Biochem. Physiol. 34, 27–31.

Shoop, W.L., 1993. Ivermectin resistance. Parasitol. Today 9, 154–159.

SINDAN, 2007. Mercado veterinário por classe terapêutica e espécie animal, São Paulo, Brazil, http://www.sindan.org.br.

Soutello, R.G., Seno, M.C., Amarante, A.F., 2007. Anthelmintic resistance in cattle nematodes in northwestern São Paulo State, Brazil. Vet. Parasitol. 148, 360–364.

Vargas, S.M., Céspedes, N.S., Sánchez, H.F., Martins, J.R., Céspedes, C.O.C., 2003. Avaliação in vitro de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à amitraz. Cienc. Rural. 33, 737.

Veterinary Parasitology xxx (2011) xxx–xxx

Contents lists available at ScienceDirect

Veterinary Parasitology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/vetpar

Short communication

Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyriphos in populations of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil

M.C. Mendes[a,*], C.K.P. Lima[a], A.H.C. Nogueira[a], E. Yoshihara[b], D.P. Chiebao[c], F.H.L. Gabriel[c], T.E.H. Ueno[d], A. Namindome[e], G.M. Klafke[e]

[a] *Centro de Pesquisa e Desenvolvimento em Sanidade Animal, Instituto Biológico, Avenida Conselheiro Rodrigues Alves, 1252, CEP: 0414-002, São Paulo, SP, Brazil*
[b] *Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Pólo Regional Alta Sorocabana, Rodovia Raposo Tavares, Km 561, CEP: 19015-970, Presidente Prudente, SP, Brazil*
[c] *Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios Pólo Regional Centro de Insumos, Rua Antonio Gomes Morgado, 340, CEP: 18013-440, Sorocaba, SP, Brazil*
[d] *Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, Pólo Regional Centro Norte, Rodovia Washington Luiz, Km 372, CEP: 15830-000, Pindorama, SP, Brazil*
[e] *Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, Av. Prof. Lineu Prestes, 1374, CEP: 05508-900 São Paulo, SP, Brazil*

ARTICLE INFO

Article history:
Received 11 August 2010
Received in revised form
28 December 2010
Accepted 7 January 2011

Keywords:
Rhipicephalus (*Boophilus*) *microplus*
Acaricide resistance
Synthetic pyrethroids
Organophosphates
Larval packet test

ABSTRACT

A field survey of resistance was conducted based on the larval packet test technique with synthetic pyrethroids (cypermethrin and deltamethrin) and organophosphates (chlorpyriphos) in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* field populations from six different regions of the State of São Paulo (Brazil). 82.6% of the populations showed resistance to cypermethrin, 86.36% to deltamethrin and 65.25% to chlorpyriphos, with 50% presenting resistance to both SP and OP acaricide. According to the questionnaires completed by the producers, OP + SP mixtures followed by SP-only formulations were the products most commonly used for controlling the cattle tick in the surveyed areas. The present study showed high occurrence of resistance to SP and OP in the State of São Paulo, Brazil and revealed the type of strategy adopted by small dairy farms in this state. This information is fundamental in order to establish the monitoring of resistance on each farm individually, contributing to the rational use of acaricides for the control of *R.* (*B.*) *microplus*.

© 2011 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Among cattle ectoparasites, infestation by *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1887) continues to be one of the major causes of economic losses in the cattle production of Brazil. In Brazil, acaricide resistance in cattle-tick populations is widespread (Graf et al., 2004). There are reports of resistance to organophosphates (OP), synthetic pyrethroids (SP), amitraz, ivermectin and fipronil representing the greater part of the classes of acaricides now available on the market (Furlong, 1999; Molento and Dias, 2000; Mendes et al., 2001; Silva et al., 2000; Klafke et al., 2006; Castro Janer et al., 2008). This is a serious cause of concern considering the lack of new molecules to control the cattle ticks. Detection of resistance in the field is essential to establish management procedures to delay its development and to assure a sustainable use of acaricides (FAO, 2004)

In 2001, a study using the adult immersion bioassay technique (Drummond et al., 1973) with cattle-tick populations from the State of São Paulo (southeast of Brazil) demonstrated that the compounds tested

* Corresponding author.
E-mail address: mendes@biologico.sp.gov.br (M.C. Mendes).

0304-4017/$ – see front matter © 2011 Published by Elsevier B.V.
doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.006

Please cite this article in press as: Mendes, M.C., et al., Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyriphos in populations of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.006

(cypermethrin–chlorpyriphos mixture (CCM), cypermethrin, deltamethrin, coumaphos, and amitraz) had no appropriate efficacy against *R.* (*B.*) *microplus*. The cypermethrin–chlorpyriphos mixture efficacy was between 66.3% and 94.4%, cypermethrin 20.5% and 42.2%, coumaphos 57% and 79.3%, and amitraz 81.4% and 95.8% (Mendes et al., 2001). However, the adult test alone might not provide complete information about the resistance, only being indicative of its occurrence (Jonsson and Miller, 2007).

The larval packet test (LPT) is the reference test proposed by the Food and Agriculture Organization (FAO) for the diagnosis of OP and SP resistant populations of the cattle-tick (FAO, 2004). The larval tests are particularly efficient to measure levels of resistance on a cattle-tick population with the calculation of the resistance ratios.

Dairy and beef cattle production represents a great part of primary industry economy in the State of São Paulo and is endangered by parasitism with *R.* (*B.*) *microplus* on a year-round basis (IEA, 2008). The dependence on the use of acaricides for the control of cattle ticks favours the development of resistance, which increases the economic losses.

The detection of resistance in the field, together with the annotation of historical acaricide usage on the farm, can give valuable information to manage the control of ticks and acaricide resistance in the field. This information is important for the implementation of rational acaricide use, involving farmers, pharmaceutical companies, and veterinarians.

The objectives of this study were to detect resistance to the most commonly used acaricide groups (SP and OP) on *R.* (*B.*) *microplus* within cattle production areas of the State of São Paulo and to gather information about the common most strategies used to control *R.* (*B.*) *microplus* in this areas.

2. Materials and methods

2.1. Characterisation of cattle-tick control

Questionnaires were completed by ranchers and/or farm employees in order to characterise the management of tick control in the areas studied. A total of 24 ranches from different regions of the state of São Paulo, Brazil, were surveyed between March 2007 and November 2008. The following items were considered for the characterization of the properties: cattle population; breed of the animals, and main production type (beef or dairy cattle). The profile of cattle tick control management was characterised considering the following aspects: acaricides used in the past two years; acaricides used on the last treatment before the collection of ticks; interval between treatments, application method (spraying; injectable formulations and pour-on formulations) and influence on the choice of a specific acaricide (veterinary prescription; market/salespeople; neighbours/cooperative indication).

2.2. Ticks

2.2.1. Susceptible strain

The susceptible reference strain used, Mozo, was originally collected in Uruguay in 1973 and has been maintained at the Instituto Biológico de São Paulo since 2006 under laboratory conditions with artificial infestations on Holstein–Friesian steers. Animals were held in 3 m × 3 m pens following the recommendations of the Ethics Committee of the Instituto Biológico de São Paulo (protocol no 90/09).

2.2.2. Field populations

On each ranch, approximately 100 semi-engorged and fully engorged females were taken directly from the infested cattle and transported inside a plastic canister (105 mm height, 80 mm diameter) with holes in the lid to allow the passage of air. The canisters were maintained in a polystyrene box with iced-gel until arrival at the laboratory.

2.2.3. Preparation of ticks

Collected females were washed with distilled water and dried with paper towels, then weighed and placed in Petri dishes (90 mm diameter × 20 mm high), maintained in an incubator at 27–28 °C, 85–90% R.H., and with a photoperiod of 0:24 L:D. Fourteen days after oviposition, the females were discarded, and their eggs were transferred to glass vials closed with cotton plugs until larval hatching. Larvae used for the bioassays were 14–21 days old.

2.3. Bioassays

2.3.1. Acaricides

Technical grade acaricides used on the larval tests were: chlorpyriphos 99.9% (Syngenta, São Paulo, Brazil), cypermethrin 95.5% (Novartis, São Paulo, Brazil) and deltamethrin 99.2% (Intervet-Schering Plough, São Paulo, Brazil).

2.3.2. Larval packet test

The larval packet test (LPT) was used for the detection of chlorpyriphos, cypermethrin, and deltamethrin resistance (Stone and Haydock technique, 1962). Technical grade acaricides were serially diluted in two parts of trichloroethylene (TCE) (Synth, Diadema-SP, Brazil) and one part of olive oil (OO) (Sigma–Aldrich) in order to prepare the treatment solutions. 0.67 mL of each solution was deposited onto an 850 mm × 750 mm Whatman No 1 filter paper (Whatman International Ltd., Maidstone, England). Control groups were prepared with the TCE-OO solution free of acaricides. The papers were then allowed to dry for 24 h at room temperature before the test. The following concentrations of the acaricides were used on the tests (in % of active ingredient): Cypermethrin, 3.2; 1.6; 0.8; 0.4; 0.2; 0.1 and 0.025 for field populations and 0.1; 0.06; 0.0216; 0.013; 0.0078; 0.0047; 0.0028; 0.0017 for Mozo strain; deltamethrin, 0.8; 0.4; 0.2; 0.1; 0.05; 0.025; 0.0125 and 0.00625 for field populations and 0.01; 0.008; 0.006; 0.004; 0.003; 0.002; 0.0015; 0.001; 0.0008; 0.0005; 0.0003 and 0.0002 for Mozo strain; chlorpyriphos: 0.064; 0.032; 0.016; 0.008; 0.004; 0.002; 0.001; 0.0005; and 0.00025 for field populations and Mozo strain.

Samples of 70–100 larvae were collected from the rearing tubes with a paintbrush and transferred to each packet that was folded in half and sealed with metal clips. The

Please cite this article in press as: Mendes, M.C., et al., Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyriphos in populations of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.006

packets were then incubated at 27–28 °C, 85–90% RH, and a photoperiod of 0:24 L:D. After 24 h, the packets were opened and the numbers of live and dead larvae were counted. Two replicates were made for each concentration.

2.3.3. Data analysis

Probit analysis was run on the bioassay results using Polo-Plus (LeOra Software, 2001). For each test, the following parameters were estimated: LC_{50} (lethal concentration for 50%) with its confidence intervals of 95% (CI95%) and the slope of the regression line. The resistance ratio (RR) was calculated as the comparative susceptibility of the field population to the susceptible reference strain, the LC_{50} for each field population and the LC_{50} for the Mozo strain, respectively. Resistance ratios for comparison at LC_{50} and their confidence intervals were generated using the formula described by Robertson et al. (2007). The significance of each comparison was determined when the calculated RR CI95% were >1.0.

3. Results

3.1. Characterization of cattle-tick control at the farms

The tick collections and surveys were completed mostly in dairy farms. Most dairy farms surveyed used crossbred animals of *Bos indicus* and *Bos taurus* (83.3%), followed by purebred *B. taurus* (16.7%). Number of cattle varied between 1 and 189 head.

The results of the survey regarding cattle-tick control are presented in Tables 1 and 3. All classes of acaricides available had been used within a period of three years at the farms surveyed to include 30.2%; 21.4%; 19.3%, and 16% mixtures of (OP + SP), pyrethroids, macrocyclic lactones, and amitraz, respectively (Table 1).

The major influences over producers' choice of acaricides were: salesmanship indication (25%), neighbours usage (21.4%), veterinarian prescription (21.4%), pharmaceutical company events (18%), and results from adult immersion tests (3.4%). 10.8% of the producers reported no criteria of choice.

Treatment according to the infestation of animals was the most common strategy for tick control (37%) followed by a 15-day interval between treatments (27%), and 30-day intervals (18%). Spray formulations are used by 65.4% of the farmers, followed by injectable formulations (30.8%), and finally, pour on products (3.8%).

3.2. Resistance detection on the field

To provide the baseline of comparison with the Mozo strain, the LC_{50}s (in % of active ingredient) of this strain for each acaricide were determined (Table 2). For cypermethrin the LC50 (CI95%) was 0.0147 (0.0140–0.0155), deltamethrin 0.0037 (0.0036–0.0039), and chlorpyriphos 0.0179 (0.0169–0.0190).

The results obtained from the LPTs conducted with cypermethrin showed that 82.6% (19/23) of the populations studied were shown to be resistant (Table 3). The levels of resistance measured varied from low (minimum of 2.38) to high (maximum of 95.44), depending on the population.

Deltamethrin resistance was detected in 86.36% (19/22) of the populations tested (Table 4). Similarly, the levels of resistance to deltamethrin were variable depending on the population, with RRs varying from 2.16 to 149.45.

Chlorpyriphos resistance was detected in 70.8% (17/24) of the populations tested (Table 5). Again, the level of resistance varied between populations, the least resistant was population AS (RR = 2.68) and the most resistant was population SV (RR = 65.25).

4. Discussion

The collection of ticks and application of the questionnaire were taken mostly in small family-owned dairy farms, with no more than 50 head of crossbreed *B. indicus* and *B. taurus* cattle. All of the producers stated they were experiencing problems with cattle-tick control. In general, within the studied areas, all of the acaricides available on the market had been used in the recent past, with predilection for OP/SP mixtures, macrocyclic lactones, and amitraz. Treatment according to the infestation was the major strategy for controlling ticks, followed by 15 days of interval between treatments. Most of the producers used spray formulations on their cattle. In studies conducted in Mexico (Rodriguez Vivas et al., 2008) and Australia (Jonsson et al., 2000), the spraying of cattle, associated with more than 5–6 treatments per year were considered risk factors for the development of resistance to SP. High incidence of resistance to SP was associated with less than 3 weeks of interval on treatments in a study conducted in New Caledonia (Bianchi et al., 2003).

The information obtained about the acaricide usage in cattle-tick control, specifically indiscriminate choice of the acaricide, frequent usage of spray formulations, high frequency of treatments, and random substitution of acaricide groups reveals a favourable scenario for the rapid development of resistance in the areas surveyed for this study.

In general resistance to the three acaricides tested was diagnosed. Significantly, in twelve populations (AA; AB; AS; FN; MO; MU; PA; PR; RZ; SM; SS and SV) resistance was detected to both SP and OP acaricides.

Synthetic pyrethroids have been used in Brazil since the beginning of the 1980s (Leal et al., 2003). In the beginning of the 1990s, there were reports of lack of efficacy to these compounds for tick control, which was indicated by adult immersion tests in the state of Minas Gerais (Furlong, 1999). In 2001, in the State of São Paulo, reduced SP efficacy was observed measured by the AIT, with efficacies between 20.5% and 42.1% depending on the region (Mendes et al., 2001). In the present study, the incidence of resistance to cypermethrin and deltamethrin determined by the LPT was high, affecting 82.6% and 86.36% of ranches surveyed, respectively. These values were comparable to the incidence of SP resistance in Mexico, reported by Rodriguez Vivas et al. (2008) to be 61.2% for deltamethrin and 59.2% for cypermethrin. The variation on the cypermethrin RR values of the studied populations was similar to the variation found in study conducted in Mexico (Cabrera-Jiménez, 2008). All resistant populations were from farms with intensive use of cypermethrin, in single or OP-associated formulations. Resistance to deltamethrin in populations

Table 1
Classes of acaricides with their respective active ingredients for the control of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*, used at ranches from the State of São Paulo, Brazil.

Acaricide class (% of total products)	Active ingredient	Percentage of farms ($n = 24$)
OPs (4.4%)	Dichlorvos + Chlorfenviphos	2.2%
	Chlorpyriphos + Dichlorvos	1.1%
	Fenthion	1.1%
Amidines (16%)	Amitraz	16%
Amidines + OP mixtures (3.2%)	Amitraz + chlorpyriphos	3.2%
SPs (21.4%)	Cypermethrin	10.7%
	Deltamethrin	10.7%
OP+SP mixtures (30.2%)	Cypermethrin + Dichlorvos	2.2%
	Trichlorphon + coumaphos + cyfluthrine	6.4%
	Cypermethrin + chlorpyriphos+ citronella oil	14%
	Cypermethrin + ethion	1,1%
	Cypermethrin + chlorpyriphos	3.2%
	Cypermethrin + chlorpyriphos + Dichlorvos	2.2%
	Cymiazol + cypermethrin	1.1%
Phenylpyrazoles (2.2%)	Fipronil	2.2%
MLs (19.3%)	Ivermectin	11.8%
	Doramectin	4.3%
	Abamectin	3.2%
Growth regulators (3.3%)	Fluazuron	1.1%
	Diflubenzuron	2.2%

Table 2
Results from the larval packet tests with cypermethrin, deltamethrin, and chlorpyriphos, conducted with *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* from the Mozo strain maintained in São Paulo, Brazil.

Active ingredient	*N*	*n*	Slope (S.E.)	LC_{50} (CI95%) (% I.A.)	$LC_{99.9}$ (CI95%) (% I.A.)
Cypermethrin	10	13,353	4.132 (0.068)	0.0147 (0.0140–0.0155)	0.1374 (0.1153–0.1691)
Deltamethrin	10	24,119	4.671 (0.05)	0.0037 (0.0036–0.0039)	0.0271 (0.0242–0.0309)
Chlorpyriphos	10	21,623	2.344 (0.028)	0.0179 (0.0169–0.0190)	0.9127 (0.7331–1.1662)

N: number of assays; *n*: number of larvae tested; S.E. standard error; LC: lethal concentration; CI95%: confidence intervals of 95%.

Table 3
Results from the larval packet tests with cypermethrin conducted with *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* from 23 populations of the State of São Paulo and the susceptible reference Mozo.

Strain	*n*	Slope (S.E.)	LC_{50} (CI95%) (% I.A.)	RR
MOZO	13,353	4.132 (0.068)	0.0147 (0.014–0.0155)	–
SN	1363	4.86 (0.282)	0.027 (0.024–0.029)	1.8
AS	1940	1.822 (0.125)	0.471 (0.396–0.589)	32.04
BV	2226	2.009 (0.143)	0.009 (0.007–0.010)	0.61
JS	788	1.7 (0.105)	0.053 (0.042–0.067)	3.6
PA	1497	1.33 (0.155)	0.896 (0.474–5.246)	60.95
AB	3249	1.749 (0.058)	0.265 (0.221–0.326)	18.02
AA	1751	3.834 (0.221)	0.356 (0.333–0.380)	24.21
ST	1675	3.759 (0.259)	0.538 (0.493–0.593)	36.59
IT	1398	2.056 (0.129)	0.014 (0.008–0.021)	0.95
RZ	805	4.619 (0.384)	0.392 (0.367–0.423)	10.5
SS	2184	1.270 (0.054)	0.164 (0.095–0.364)	11.15
BO	1441	2.234 (0.123)	0.402 (0.305–0.587)	27.34
LU	1500	0.707 (0.085)	1.403 (0.516–18.665)	95.44
AT	1209	0.916 (0.074)	0.018 (0.012–0.024)	1.22
SA	1276	1.811 (0.090)	0.035 (0.025–0.048)	2.38
PR	1369	3.659 (0.329)	0.681 (0.605–0.783)	46.32
SM	2203	3.443 (0.34)	1.007 (0.836–1.394)	68.5
MO	1544	3.772 (0.403)	0.861 (0.731–1.190)	58.57
SV	2094	3.088 (0.176)	0.568 (0.485–0.685)	38.63
SS	2184	1.270 (0.054)	0.164 (0.095–0.364)	11.15
LJ	2772	4.863 (0.308)	0.287 (0.267–0.309)	19.52
FN	1744	5.515 (1.189)	1.025 (0.928–1.281)	69.72
ML	2139	5.3 (0.573)	0.911 (0.851–0.999)	61.97

n: number of larvae tested; S.E.: standard error; LC_{50}: lethal concentration for 50% of individuals; CI95% 95% confidence interval; %I.A. percentage of active ingredient; RR: resistance ratio.

Please cite this article in press as: Mendes, M.C., et al., Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyriphos in populations of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.006

Table 4
Results from the larval packet tests with deltamethrin conducted with *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* from 23 populations of the State of São Paulo and the susceptible reference.

Strain	*n*	Slope (S.E.)	LC_{50} (CI95%) (%I.A.)	RR
MOZO	24,119	4.671 (0.095)	0.0037 (0.0036–0.0039)	–
SN	1414	2.852 (0.31)	0.007 (0.005–0.009)	1.89
AS	2319	2.474 (0.0157)	0.183 (0.015–0.23)	49.45
BV	1895	1.979 (0.266)	0.003 (0.001–0.005)	0.81
JS	2232	4.473 (0.174)	0.031 (0.03–0.033)	8.37
PA	1388	1.527 (0.097)	0.177 (0.14–0.236)	47.83
AB	3877	1.852 (0.051)	0.104 (0.094–0.117)	28.10
AA	1889	4.332 (0.259)	0.126 (0.118–0.135)	34.05
MG	1882	4.636 (0.278)	0.215 (0.203–0.228)	58.10
RZ	3066	3.302 (0.179)	0.214 (0.187–0.248)	57.83
SS	2593	2.010 (0.069)	0.145 (0.126–0.168)	39.18
BO	1347	5.141 (0.344)	0.343 (0.304–0.392)	92.7
ST	1633	4.613 (0.386)	0.25 (0.227–0.275)	67.56
LU	1819	0.656 (0.058)	0.020 (0.005–0.038)	5.4
AT	1386	0.716 (0.072)	0.003 (0.001–0.006)	0.81
SA	1413	1.387 (0.098)	0.008 (0.002–0.014)	2.16
PR	1222	3.026 (0.302)	0.314 (0.281–0.356)	84.86
SM	2265	2.659 (0.270)	0.553 (0.458–0.747)	149.45
MO	2048	1.891 (0.133)	0.511 (0.318–2.022)	138.1
SV	2531	2.893 (0.108)	0.207 (0.189–0.228)	55.94
LJ	1208	3.697 (0.211)	0.094 (0.076–0.118)	25.4
FN	1489	4.233 (0.291)	0.212 (0.194–0.233)	57.29
PP2	2658	2.367 (0.08)	0.218 (0.18–0.267)	58.91
ML	2628	3.759 (0.201)	0.412 (0.388–0.439)	111.35

N: number of larvae tested; S.E.: standard error; LC_{50}: lethal concentration for 50% of individuals; CI95% 95% confidence interval; %I.A. percentage of active ingredient; RR: resistance ratio.

that were not treated with this molecule (populations MU, PA, PR and RZ) but with cypermethrin indicates cross-resistance between these two molecules.

The climate in the neotropical region is favourable, throughout the year, to many ectoparasites of cattle (i.e. *Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans* and *Cochliomyia hominivorax*) which are commonly treated with the same active ingredients used to control *R.* (*B.*) *microplus*. This situation may play a role in the resistance selection on the cattle tick.

Table 5
Results from the larval packet tests with chlorpyriphos conducted with *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* from 24 populations of the State of São Paulo and the susceptible reference Mozo.

Strain	*n*	Slope (S.E.)	LC_{50} (CI95%) (%I.A.)	RR50
MOZO	21,623	2.344 (0.028)	0.0179 (0.0169–0.0190)	–
SN	1955	2.613 (0.112)	0.513 (0.452–0.581)	28.65
AS	2147	2.345 (0.083)	0.048 (0.04–0.053)	2.68
BV	2569	2.169 (0.076)	0.219 (0.185–0.257)	12.23
IT	1743	1.887 (0.139)	0.421 (0.352–0.535)	23.51
JS	1440	2.345 (0.122)	0.022 (0.02–0.025)	1.22
PA	1342	2.802 (0.292)	0.23 (0.172–0.456)	12.84
AB	2555	1.171 (0.049)	0.233 (0.08–0.53)	13.06
AA	1474	1.408 (0.077)	0.505 (0.418–0.626)	28.21
MG	1614	2.011 (0.087)	0.273 (0.248–0.3)	15.25
RZ	1944	1.347 (0.094)	0.369 (0.281–0.53)	20.61
SS	2710	2.666 (0.121)	0.0839 (0.03781–0.1441)	4.68
BO	1801	1.652 (0.087)	0.02 (0.015–0.026)	1.11
LU	1215	6.232 (0.818)	0.009 (0.007–0.01)	0.5
PP2	2109	1.791 (0.084)	0.193 (0.173–0.216)	10.78
ST	1214	1.765 (0.118)	0.02 (0.014–0.025)	1.11
AT	1233	2.589 (0.252)	0.01 (0.008–0.011)	0.55
SA	1309	4.013 (0.23)	0.016 (0.013–0.019)	0.89
PR	1025	1.158 (0.089)	0.117 (0.093–0.0152)	6.53
SM	1622	1.190 (0.078)	0.25 (0.167–0.478)	13.96
MO	1335	1.32 (0.119)	0.847 (0.597–1.405)	47.31
SV	2709	2.358 (0.105)	1.189 (1.057–1.328)	66.42
LJ	2130	2.126 (0.1)	0.02 (0.017–0.022)	1.11
FN	1743	2.048 (0.157)	0.426 (0.348–0.568)	23.79
ML	1831	1.276 (0.088)	0.257 (0.21–0.332)	14.35

N: number of larvae tested; S.E.: standard error; LC_{50}: lethal concentration for 50% of individuals; CI95% 95% confidence interval; %I.A. percentage of active ingredient; RR: resistance ratio.

Please cite this article in press as: Mendes, M.C., et al., Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyriphos in populations of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. Vet. Parasitol. (2011), doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.006

In Brazil, resistance to OP acaricides has been known since 1968 (Shaw et al., 1968). Later, usage of this class of acaricides was substituted by SP, amitraz, and macrocyclic lactones. From the beginning of the 1990s there was a reintroduction of these acaricides for the control of *R.* (*B.*) *microplus* with the development of mixture formulations. (SP + OP; OP + OP). OP resistance reported in this study (70.8%) indicates a re-emergence of its occurrence on the State of São Paulo.

The data obtained in this study is alarming, considering that acaricide resistance is widespread over the state of São Paulo, with some ranches presenting a multi-resistance profile, encompassing all of the three most used classes of acaricides available on the market.

The present study showed a high occurrence of resistance to SP and OP in the State of São Paulo, Brazil and revealed the type of strategy adopted by small dairy farms in this state. This information is fundamental, in order to establish the monitoring of resistance on each farm individually, contributing to the rational use of acaricides for the control of *R.* (*B.*) *microplus*.

Acknowledgement

This project was done with financial support of Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (Processo No. 2006/55934-4).

References

Bianchi, M.W., Barré, N., Messad, S., 2003. Factors related to cattle level resistance to acaricides in *Boophilus microplus* tick populations in New Caledonia. Vet. Parasitol. 112, (1/2), 75–89.

E. Castro Janer, J.R. Martins, M.C. Mendes, T.T.S. Schumaker, Primeiros diagnósticos de resistência de Boophilus microplus ao Fipronil no Brasil através de bioensaios in vitro, presented at the 15th Brazilian Congress of Veterinary Parasitology and the 2nd Seminar on Veterinary Parasitology, Curitiba, Paraná, Brazil; 2008.

Drummond, R.O., Crust, S.F., Trevino, J.L., Gladney, W.J., Graham, O.H., 1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory tests of insecticides. J. Econ. Entomol. 66, 130–133.

FAO, 2004. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants: Guidelines, http://www.fao.org/ag/aga.html.

Furlong, J., 1999. Diagnosis of the susceptibility of the cattle tick, Boophilus microplus to acaricides in Minas Gerais state, Brazil. In: 4th International Seminar on Animal Parasitology. Control de la resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que trasmiten CONASAG-INIFAP-INFARVET-IICA-AMPAVE-FILASA , Puerto Vallarta, Jalisco, Mexico, pp. 41–46.

Graf, J.F., Gogolewsk, N., Leach-Bing, G.A., Sabatini, M.B., Molento, E.L., Arantes, G.J., 2004. Tick control: an industry point of view. Parasitology 129, S427–S442.

IEA, 2009. Estimativa da Produção Animal no Estado de São Paulo para 2008, vol. 3, no. 12, http://www.iea.sp.gov.br.

Jonsson, N.N., Miller, R.J., 2007. Critical evaluation of the modified-adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates. Vet. Parasitol. 146, 307–315.

Jonsson, N.N., Mayer, D.G., Green, P.E., 2000. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). Vet. Parasitol. 88, 79–92.

Klafke, G.M., Sabatini, G.A., Albuquerque, T.A.A., Martins, J.R., Kemp, D.H., Miller, R.J., Schumaker, T.T.S., 2006. Larval Immersion Tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari: Ixodidae) from the State of Sao Paulo, Brazil. Vet. Parasitol. 142, 386–390.

Leal, A.T., Freitas, D.R.J., Vaz Junior, I.S., 2003. Perspectivas para o controle do carrapato bovino. Acta Sci. Vet. 31, 1–11.

Mendes, M.C., Veríssimo, C.J., Kaneto, C.N., Pereira, J.R., 2001. Bioassay for measuring the acaricides susceptibility of cattle tick Boophilus microplus (Canestrini, 1887) in São Paulo State, Brazil. Arq. Inst. Biol. São Paulo 68, 23–27.

Molento, M.B., Dias, B., 2000. Avaliação da eficácia de produtos carrapaticidas contra o *Boophilus microplus* na região de Umuarama, Paraná. Arquivos Ciências Veterinárias Zool. – UNIPAR 3, 231.

Robertson, J.L., Russell, R.M., Presiler, H.K., Savin, N.E., 2007. Quarantine statistics. In: Bioassays with Arthropods , 2nd ed. CRC Press.

Rodriguez Vivas, R.I., Rosado-Aguilar, J.A.M.A., Rosário-Cruz, R., Garcia-Vazquez, Z., Alonso-Díaz, M.A., 2008. 6th International Seminar on Animal Parasitology , Boca del Río Veracruz, 3–5 September.

Shaw, R.D., Cook, M., Carson, R.F., 1968. Developments in the resistance status of the southern cattle tick to organophosphorus and carbamate insecticides. J. Econ. Entomol. 61, 1590–1594.

Silva, M.C.L., Sobrinho, R.N., Linhares, G.F.C., 2000. Avaliação in vitro da eficácia do clorfenvinfós e da cialotrina sobre o Boophilus microplus colhidos em bovinos da bacia leiteira da microrregião de Goiânia, Goiás. Cic. Anim. Bras. (1), 143–148.

Software, 2004. Polo Plus Probit and Logit Analysis: User's Guide. LeOra, Berkeley, 36 pp.

Stone, B.F., Haydock, K.P., 1962. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). Bull. Entomol. Res. 53, 563–578.