

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO

**PERFIL DO DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA DO
CARRAPATO *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* FRENTE À
ACARICIDAS DE CONTATO**

Leandro de Oliveira Souza Higa

CAMPO GRANDE, MS
2016

ANO 2016		Perfil do diagnóstico da resistência do carrapato <i>Rhipicephalus microplus</i> frente à acaricidas de contato	DE LIVEIRA SOUZA HIGA
----------	--	--	--------------------------

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL
CURSO DE MESTRADO**

**PERFIL DO DIAGNÓSTICO DA RESISTÊNCIA DO
CARRAPATO *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* FRENTE À
ACARICIDAS DE CONTATO**

Leandro de Oliveira Souza Higa

**Orientador: Prof. Dr. Renato Andreotti
Coorientador: Dr. Marcos Valério Garcia**

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Mato grosso
do Sul, como requisito à obtenção do
título de Mestre em Ciência Animal.
Área de concentração: Saúde Animal.

CAMPO GRANDE, MS 2016

Certificado de aprovação (fornecido pela secretaria)

Dedicatória

Primeiramente a Deus,
Aos meus pais José Senyo Higa e Nilza de
Oliveira Souza Higa, ao meu avô Otacílio Pires
de Souza, por proverem toda minha formação
e pelo apoio para aqui chegar.
Agradecimento à minha companheira e amiga
Camila Yumi Koike pela força em todos os
momentos difíceis e pela paciência.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador Renato Andreotti e Jacqueline Cavalcante Barros pela inestimável oportunidade de fazer parte do grupo e por todos ensinamentos para a vida profissional e pessoal.

Ao meu coorientador Marcos Valério Garcia também pela oportunidade, ensinamentos, auxílio, orientação e grande amizade.

Aos professores que aceitaram participar desta banca de dissertação: Dr Fernando Borges e Dra Zoraida Fernández Grillo.

Aos companheiros de laboratório André Aguirre, Barbara Csordas, Isabela Blecha, Francisco Barradas, Jaqueline Matias, Leandra Oshiro, Pamella Duarte e Vinicius Rodrigues com quem pude consolidar amizades e aprendizado.

À minha família pelo incentivo e apoio durante todo período. E em especial ao meu pai José Senyo Higa e avô Otacílio Pires de Souza (*in memoriam*) pelo grande exemplo de vida.

"Até as mais altas torres começaram do chão."

Provérbio chinês

Resumo

AUTOR, Leandro de Oliveira Souza Higa. Perfil do diagnóstico da resistência do carrapato *Rhipicephalus microplus* frente à acaricidas de contato. Ano. 2016 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

Devido à grande importância econômica do carrapato *Rhipicephalus microplus* na pecuária, estudos visando o controle deste ectoparasito são de grande importância. O objetivo deste estudo foi verificar a eficácia de acaricidas do tipo pulverização em diversas propriedades do estado e do país e conhecer a distribuição da resistência à diversas classes de acaricidas no território nacional por meio de análise de literatura disponível contendo relatos de resistência. As bases utilizadas são pertencentes às seguintes classes: piretróides, organofosforados, aminidínicos e associações entre piretróide e organofosforado. Para as avaliações foram empregados os bioensaios Teste de Imersão de Adultos (TIA) em 28 propriedades distribuídas em diferentes estados (MS, MT, CE, SP, MG e DF) e Teste de Pacote de Larvas (TPL) em 10 propriedades (pertencente aos estados MS, MT, MG e ES), respeitando a diluição comercial de cada produto. Para a avaliação literária da resistência foram analisados artigos contendo relatos de resistência, buscando contemplar informações de todo o país. Os resultados obtidos da análise literária demonstra a presença de mais número de relatos na região centro-sul do país, com destaque ao estado do Rio Grande do Sul, onde foi constatada a resistência a oito classes de acaricidas (considerando associações como classes). Os bioensaios mostram a presença de resistência no Ceará, Espírito Santo e Mato Grosso, estados até então sem relatos na literatura.

Palavras-chave: Carrapato Bovino; Teste de Imersão de Adultos; Teste de Pacote de Larvas; Resistência;

Abstract

AUTHOR, Leandro de Oliveira Souza Higa. Resistance diagnostic of *Rhipicephalus microplus* tick to different contact acaricides in several states from Brazil. Ano. 2016 f. Dissertation (Master) - Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, 2016.

Due to the great economic importance of the tick *Rhipicephalus microplus* in livestock, studies for the control of this ectoparasite are of great importance. The objective of this study was to verify the effectiveness of acaricide spraying type in various properties from the state and the country and get to know about the distribution of acaricide resistance to various classes in the country through available literature containing resistance analysis reports. The chemical bases used are within the following classes: pyrethroids, organophosphates, aminidínicos and associations between pyrethroid and organophosphate. For the evaluations were used bioassays Adults Immersion Test (AIT) in 28 properties distributed in different states (MS, MT, CE, SP, MG and DF) and Larvae Packet Test (TPL) in 10 properties (belonging to MS, MT, MG and ES states), respecting the commercial dilution of each product. For literary evaluation of resistance, articles containing resistance reports were analyzed with information from around the country. The results of literary analysis demonstrates the presence of more number of reports in the south-central region of the country, especially in the state of Rio Grande do Sul, where it was found resistance to eight classes of acaricides (considering associations as classes). Bioassays show the presence of resistance in Ceará, Espírito Santo and Mato Grosso, states up until then without resistance reports in literature.

Keywords: Bovine Tick; Immersion Adult Teste; Larvae Packet Test; Resistance;

SUMÁRIO

Introdução.....	1
Referências.....	3
Artigo 1: Acaricide resistance status of the <i>Rhipicephalus microplus</i> in Brazil: a literature overview	7
Introdução	7
Desenvolvimento da resistência.....	9
Diante de tais fatos, os principais mecanismos da resistência podem ser divididos em:	9
Resistência Acaricida.....	10
Organofosforados.....	11
Resistência aos organofosforados.....	11
Amidinas.....	12
Resistência à amidinas.....	12
Piretróides.....	13
Resistência aos piretróides.....	14
Fenilpirazóis.....	15
Resistência aos fenilpirazóis.....	15
Tiazolinas.....	16
Lactonas Macrocíclicas.....	16
Resistência às lactonas macrocíclicas.....	16
Fluazuron.....	17
Resistência ao Fluazuron.....	17
Spinosad.....	17
Como reduzir a resistência à acaricidas.....	18
Conclusões.....	19
Refêrencias Bibliográficas.....	19
Figura 1: Distribuição da resistência aos acaricidas em <i>R. microplus</i> no Brasil.....	31
Tabela 1: Resistência aos acaricidas em <i>R. microplus</i> no Brasil.....	32
Artigo 2: Avaliação da resistência de <i>Rhipicephalus microplus</i> (Acari: Ixodidae) frente à formulações acaricidas utilizando amostras de diferentes propriedades brasileiras	35
1.0 Introdução.....	36
2.0 Materials and Methods.....	37
2.1 Adult Immersion Test (AIT).....	38
2.2 Larvae Packet Test (LPT).....	39
3.0 Results and Discussion.....	39
3.1 Acaricide Test.....	39
3.2 Pyrethroids.....	40
3.3 Organophosphates.....	41
3.4 Aminidines.....	41
3.5 Associations Formulations.....	42
3.6 Larvae Packet Test (LPT).....	43
3.7 Resistance in Other Brazilian States.....	43
4.0 Final Considerations.....	45
References.....	45
Figure 1: Brazilian states of collected sample.....	50
Tables.....	51
Anexos.....	59

INTRODUÇÃO

Os carrapatos são artrópodes pertencentes a ordem Acari, sendo todos os 896 espécimes descritos no mundo incluídos na subordem Ixodida. Esse táxon por sua vez se divide em três famílias, sendo Ixodidae ("carrapatos duros") com 702 espécies, Argasidae ("carrapatos moles") com 193 espécies e Nuttalliellidae, com apenas uma espécie representante (GUGLIELMONE et al., 2010).

As duas famílias mais diversas de carrapatos são encontradas principalmente na região Neotropical (Pereira et al., 2008) sendo os ixodídeos a família de maior importância para a sanidade animal. Todos os carrapatos são hematófagos obrigatórios, transmitindo patógenos durante sua alimentação e acarretando injúrias ao hospedeiro como piroplasmoses, espiroquetoses e rickettsioses (ARAGÃO, 1936).

Dentre os gêneros da família Ixodidae, destaca-se o *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887), também conhecido como carrapato-do-boi. Este carrapato é originário da Índia e da Ilha de Java, na Ásia, e possivelmente se dispersou nas regiões tropicais e subtropicais através da introdução de animais domésticos. No Brasil, está presente em todas as regiões do país, variando conforme as condições abióticas características de cada local (GONZALES, 1995).

O *Rhipicephalus microplus* necessita de apenas um hospedeiro para completar seu ciclo (monoxeno) (ROCHA, 1984), sendo o boi seu principal hospedeiro. Este carrapato pode infestar eventualmente outros mamíferos, como por exemplo cervídeos em condições desfavoráveis e com proximidade a rebanhos bovinos (SZABÓ et al., 2003).

O Brasil atualmente ocupa o segundo lugar em produção de carne bovina no mundo, movimentando um rebanho de 212,8 milhões de bovinos e exportando cerca de 1,5 milhão de toneladas equivalente de carcaça (ANUALPEC, 2014). Bovinos infestados são acometidos pela diminuição na produção de carne e leite, desvalorização do couro devido a lesões causadas pelas picadas e que por sua vez facilitam o surgimento de miíases (GOMES, 1998). As principais doenças bovínas também estão associadas ao *R. microplus*, onde este cumpre papel de hospedeiro intermediário para os patógenos da babesiose (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e anaplasmose (*Anaplasma marginale*), doenças essas que caracterizam o complexo da Tristeza Parasitária Bovina (TPB).

Além dos prejuízos diretos na cadeia produtiva acima citados, o carrapato bovino também causa perdas indiretas, consistindo em gastos relacionados à mão-de-obra, despesas

com instalações, aquisição de carrapaticidas e de equipamentos de suporte para a aplicação dos mesmos no rebanho (GOMES, 1998). Estudos recentes realizados no Brasil estimam prejuízos da ordem de US\$ 3,24 bilhões na pecuária devido ao parasitismo do carrapato *R. microplus* (GRISI et al., 2014)

Atualmente o controle por vacinas para carrapatos e seleção genética de raças bovinas resistentes ainda não apresentam resultados expressivos no controle/diminuição de carrapatos. Parizi et al. (2009) constatou uma variação na eficácia de vacinas comerciais de 51 a 91%. No Brasil, bovinos imunizados com a Bm86 e desafiados por infestação natural pelo *R. microplus*, obtiveram diminuição entre 45 e 60% na infestação (ANDREOTTI, 2006).

Outros métodos também podem ser aplicados, porém com resultados pouco eloquentes: rotação de pastagens (ELDER et al., 1980); uso de pastagens que desfavorecem a sobrevivência das larvas (SUTHERST et al., 1982); predação natural, por exemplo *Egretta ibis* (garça-vaqueira) (ALVES-BRANCO et al., 1983) e fitoterápicos (ANDREOTTI et al., 2013).

Desde o século XIX, a principal forma de controle do *R. microplus* vem sendo a aplicação de acaricidas. Os acaricidas possuem variados princípios ativos e mecanismos de ação, sendo agrupados em famílias ou grupos químicos. São classificados também quanto ao modo de ação no bovino, consistindo em dois tipos: por contato (pulverização, *pour on* e imersão) e sistêmicos (injeções subcutâneas ou intramusculares), que distribuem o princípio ativo por todo corpo do animal via corrente sanguínea.

Um dos principais problemas na utilização de acaricidas é o surgimento da resistência por parte do parasito à aplicação dos produtos. Embora as formas de desenvolvimento da resistência do carrapato bovino ainda não estão totalmente claras, já se sabe que o uso constante e indiscriminado de um produto químico têm levado parte da população a se tornarem resistentes. Este processo de aplicação do produto o qual provoca mutações e os tornam resistentes é conhecido como o estabelecimento do alelo resistente (FURLONG; MARTINS, 2000).

Após o estabelecimento do alelo resistente ocorre a propagação do mesmo devido a pressão de seleção que produz cada vez mais carrapatos portadores dos genes de resistência, salientando que estes gerarão descendentes também resistentes (FURLONG; MARTINS, 2000).

Pelo fato de existir diversos tipos de princípios químicos para os acaricidas, onde os principais são os baseados em organofosforado, piretróide, lactona macrocíclica, amidina, fipronil e fluazuron (MARTINS, 2004; KLAFFE, 2009), gera-se então diferentes formas de

resistência adquirida pelos carrapatos, as quais variam de acordo com a pressão da seleção e ocasiona diferentes características genéticas e em proporções (grau) diferentes (FREITAS et al., 2005). Além desse prejuízo, o uso inadequado destes produtos pode causar a falha completa no combate aos carrapatos a curto prazo (FERNÁNDEZ-SALAS et al., 2012).

A redução de penetração do acaricida, a insensibilidade a compostos tóxicos e o aumento da detoxificação celular (OAKESHOTT et al., 2003), são as diversas características genéticas que necessitam do aumento da dosagem do acaricida, a alteração na combinação ou a substituição do princípio ativo (SUTHERST et al., 1983).

Para que o controle químico seja aplicado de maneira efetiva, bioensaios se fazem cada vez mais necessários para diagnosticar a resistência nas diferentes populações de carrapatos das propriedades no país, contribuindo assim para uma ação efetiva no controle das infestações. Assim sendo, o objetivo deste estudo foi conhecer o status atual da resistência do carrapato bovino aos acaricidas por meio de análise de literatura e aplicar os bioensaios nomeados Teste de Imersão de Adultos (TIA) e Teste de Pacote de Larvas (TPL) para análise de eficácia das principais bases químicas pertencentes ao tipo pulverização em diversas localidades do país.

REFERÊNCIAS

ALVES-BRANCO, F. P. J.; ECHEVERRIA, F. A. M.; SIQUEIRA, A. S. Garça vaqueira (*Egratta ibis*) e o controle biológico do carrapato (*Boophilus microplus*). EMBRAPA-UEPAE Bagé, Comunicado Técnico 1, 1983, 4 p.

ANDREOTTI, R. Performance of two Bm86 antigen vaccin formulation against tick using crossbreed bovines in stall test. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v. 116, n. 3, p. 97-100, 2006.

ANDREOTTI, R.; GARCIA, M.V.; CUNHA, R. C.; BARROS, J. C. Protective action of *Tagetes minuta* (Asteraceae) essential oil in the control of *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) in cattle pen trial. *Veterinary parasitology*, 25 maio. 2013.

ANUALPEC. *Anuário da Pecuária Brasileira*. São Paulo: Informa Economics FNP. 2014

ARAGÃO, H. B. Ixodidas brasileiros e de alguns países limítrofes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 31, n. 4, p. 760, 1936.

DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J., GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, v. 66(1): 130-133, 1973.

ELDER, J. K. et al. A survey concerning cattle tick control in Queensland. 4. Use of resistant cattle and pasture spelling. *Australian Veterinary Journal*, v. 56, n. 5, p. 219-23. maio. 1980.

Food and Agriculture Organization – FAO. Acaricide resistance. In: Food and Agriculture Organization – FAO. *Ticks and tick-borne disease control: A practical field manual*. Rome: FAO. v.1, p. 246-299. 1984

FERNÁNDEZ-SALAS, A.; RODRÍGUES-VIVAS, R. I.; ALONSO-DÍAS M. A. First report of *Rhipicephalus microplus* tick population multiresistant to acaricides and ivermectin in Mexican tropics. *Veterinary Parasitology* v. 183, p. 338-342, 2012.

FREITAS, D. R. J. de; POHL, P. C.; VAZ JR, I. da S. Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. *Acta Scientiae Veterinariae*, v. 33, n. 2, p.109-117, 2005.

FURLONG, J.; MARTINS, J.R.S. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Juiz de Fora, MG: Embrapa Gado de Leite, *Embrapa Gado de Leite. Circular Técnica*, v. 59, 25p., 2000.

GOMES A. O carrapato-do-boi *Boophilus microplus*: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenicidade e controle. In: KESSLER, R. H.; SCHENK, M. A. M. (Ed.). Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos. Campo Grande, MS: EMBRAPA-CNPGC, p. 9-44, 1998.

GONZALES, J. C. O controle do carrapato do boi. 2. ed. Porto Alegre: Edição do Autor. p. 235, 1995.

- GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Brazilian Journal of Veterinary Parasitology, Jaboticabal* v. 23 (2): 150-156, abr.-jun. 2014.
- GUGLIELMONE, A. A. et al. The Argasidae, Ixodidae and Nuttalliellidae (Acari: Ixodida) of the world: a list of valid species names. *Zootaxa*, n. 2528, p. 1-28, 2010.
- KLAFKE, G. M. Resistência de *R. (B.) microplus* contra os carrapaticidas. In: PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. J. P.; KLAFKE, G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Biologia, controle e resistência. Medicina Veterinária Livros, São Paulo, p. 81-106, 2009.
- MARTINS, J. R. Manejo da resistência aos carrapaticidas. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, v.13, 2004. Suplemento 1. Edição dos Resumos do 13 Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária e Simpósio Latino Americano de Rickettsioses, Ouro Preto, MG, 2004.
- OAKESHOTT, J. G.; HOME I.; SUTHERLAND, T. D.; RUSSELL, R. J. The genomics of insecticide resistance. *Genome Biology*, v.4, p. 14, Jan. 2003.
- PARIZI, L. F. et al. Vaccination of cattle with TickGARD induces cross-reactive antibodies binding to conserved linear peptides of Bm86 homologues in *Boophilus decoloratus*. *Veterinary Parasitology*, v. 164, n. 2-4, p. 282-90, 14 out. 2009.
- PEREIRA, M. C.; LABRUNA, M. B.; SZABÓ, M. P.; KLAFKE, G. M. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (biologia, controle e resistência). São Paulo: MedVet, 2008.
- ROCHA, U. R. Biologia e controle biológico do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini). *Boletim Técnico da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal*, n. 3, p. 1-32, 1984.
- ROSADO-AGUILAR, J. A. et al. Actividad ixodicida de extractos crudos de *Diospyros anisandra* contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: ixodidae). *Tropical and Subtropical Agroecosystems*; v. 8(3), p. 297-301. 2008

- 170 SUTHERST, R.W.; MAYWALD, G. F.; KERR, J. D.; SIEGEMAN; D. A. The effect of the
171 cattle tick (*Boophilus microplus*) on the growth of *Bos indicus* x *Bos taurus* steers.
172 *Australian Journal Agricultural Research*, v.34, n.3, p. 317327, 1983.
173
- 174 SZABÓ, M. P. J.; LABRUNA, M. B.; PEREIRA, M. C.; DUARTE, M. B.; Ticks (Acari:
175 Ixodidae) on Wild Marsh-Deer (*Blastocerus dichotomus*) from Southeast Brazil: Infestations
176 Before and After Habitat Loss. *Journal of Medical Entomology*, 40(3):268-274. 2003.
177

INTRODUÇÃO

Artigo publicado na revista Medicinal Chemistry - OMICS group

Acaricide resistance status of the *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview

Leandro de Oliveira Souza Higa²; Marcos Valério Garcia¹; Jacqueline Cavalcante Barros¹;
Wilson Werner Koller¹; Renato Andreotti¹;

*Corresponding author: Renato Andreotti : Av. Rádio Maia nº 830, Zona Rural, CEP 79106-550, Campo Grande, MS, Brazil. Fone: +55 (67) 3368-2173; renato.andreotti@embrapa.br.

¹ Animal Health, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Beef Cattle, Campo Grande/MS, Brazil

² Post Graduate Program in Animal Science, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande/MS, Brazil

Abstract

Rhipicephalus microplus is a monoxenous species whose main host are bovines, leading to considerable losses in cattle production worldwide. In addition, this tick is the transmitter of pathogenic agents responsible for the bovine babesiosis and anaplasmosis (BBA) complex. These ectoparasites are still mainly controlled with chemical products. The constant exposure of ticks to acaricides, associated with the lack of adequate application procedures, accelerates the selection pressure of resistant individuals in the population, inevitably increasing resistance, as reported by many authors around the world. This article presents current information about the resistance situation of *R. microplus* in Brazil. We identify and discuss the main chemical bases being used as a means to guide new research.

Keywords: *Boophilus*; acaricides; bovine tick

Introdução

Ocupando o segundo lugar na produção de carne bovina mundial, estima-se que o Brasil possui um rebanho de 212.8 milhões de bovinos, e exporta cerca de 1.5 milhões de toneladas de carcaça por ano (ANUALPEC, 2014). O carrapato *Rhipicephalus microplus* (Canestrini, 1888), previamente conhecido como *Boophilus microplus*, é o principal carrapato encontrado no Brasil e que afeta diretamente os bovinos, causando perdas econômicas. De

acordo com Gomes (2011), as percas econômicas causadas pelo carrapato *Rhipicephalus microplus* se devem à redução na produção de carne e leite, bem como a desvalorização do couro devido a lesões na pele causadas por altas infestações e possibilidade de instalação de miíases. Esta espécie de carrapato é responsável pela transmissão da babesiose (*Babesia bovis* e *B. bigemina*) e anaplasmose (*Anaplasma marginale*), hemoparasitas que caracterizam a enfermidade chamada Tristeza Parasitária Bovina (TPB). Este carrapato também provoca prejuízos econômicos indiretos devido às horas adicionais de trabalho exigidas, custos de instalação adicionais, aquisição de acaricidas e equipamentos utilizados para a aplicação dos mesmos (Gomes, 2011). Estudos recentes estimam que o parasitismo do *R. microplus* causa prejuízos na pecuária da ordem de 3.24 US\$ por ano (Grisi et al., 2014).

É de amplo conhecimento que os acaricidas têm sido utilizados como a principal forma de controle deste ectoparasita desde 1895, com o uso de arsenicais (Arteche *apud* Merlini; Yamamura, 1998). De acordo com Furlong (2000), esses compostos químicos incluem organofosforados, aminidínicos, piretróide, fenilpirazóis, cimiazóis, naturalyte (acaricidas de contato), lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis (sistêmico), e mais recentemente, benzoilfeniluréias (fluazuron).

Um dos principais problemas enfrentados atualmente pela indústria nacional pecuária com relação ao tratamento e controle de ectoparasitos (principalmente carrapatos) é a ausência de uma política pública de controle oficial administrada por instituições competentes. Isso deixa a responsabilidade de seleção do acaricida com os produtores, assim como os critérios a serem utilizados para o controle. No geral, acaricidas não são escolhidos com base em sua eficácia, sua aplicação ocorre de maneira inadequada e informações sobre a epidemiologia regional do parasita são negligenciadas. O uso contínuo dos produtos e sua aplicação inadequada durante um longo período podem promover a seleção de populações de carrapatos resistentes à acaricidas, aumentando o problema da resistência (Furlong, 2000).

Diante de tais fatos, é evidentemente necessária a detecção da resistência antecipadamente e utilizar os acaricidas de maneira correta, considerando especialmente que o desenvolvimento de novas moléculas capazes de exercer um controle eficiente tem se tornado cada vez mais difícil.

Desenvolvimento da resistência

Embora as formas de desenvolvimento da resistência nos carrapatos ainda não seja totalmente elucidada, sabe-se que o uso constante e indiscriminado de produtos químicos provoca a seleção de mutações e o desenvolvimento da resistência por parte das populações de carrapato. Este processo é conhecido como o estabelecimento do alelo resistente (Furlong, 2000). A resistência também pode ocorrer naturalmente, na frequência de um a cada um milhão de indivíduos nascendo resistentes (Roush, 1993).

Após o estabelecimento do alelo resistente, a pressão de seleção faz com que carrapatos carregando o gene da resistência sejam mais representativos na população em geral, que por sua vez irá gerar mais descendentes resistentes (Roush, 1993).

O tempo ou o número de aplicações necessárias para um alelo resistente se estabelecer na população e a mensuração de quanto tempo é necessário para os acaricidas perderem sua eficácia dependem de diversas variáveis. As variáveis de maior importância são: a forma como foi herdado o alelo resistente (dominante, codominante ou recessiva); a taxa de mutações na população antes da primeira aplicação do acaricida; a quantidade de indivíduos que por diversos motivos não entraram em contato com o acaricida; a frequência de aplicações do carrapaticida juntamente com a dosagem da concentração do acaricida utilizado (FAO, 2003). Apesar da dificuldade para realização de tal avaliação, são necessárias seis aplicações por ano para que se constate uma redução na eficácia, fato que pode contribuir para o aparecimento de indivíduos resistentes (Mendes et al., 2011).

Como anteriormente mencionado, vários tipos de compostos químicos são utilizados nos diferentes acaricidas, sendo a maioria pertencente ao grupo dos organofosforados, piretróide, aminidinas, lactonas macrocíclicas, fenilpirazóis ou benzoilfenilureias (SINDAN, 2014). Com isso, as populações de carrapatos podem gerar diferentes formas de resistência adquirida, as quais variam de acordo com a pressão de seleção e ocasiona diferentes características genéticas e em proporções (graus) diferentes (Freitas et al., 2005).

Diante de tais fatos, os principais mecanismos da resistência podem ser divididos em:

- Resistência metabólica: aumento do processo de se detoxificar e/ou eliminar os produtos químicos. Geralmente isso é possível devido à melhora de expressão ou de especificidade das enzimas responsáveis pelo metabolismo de drogas (Li et al., 2007). Alguns insetos respondem à presença de moléculas xenobióticas super-expressando enzimas pertencentes ao complexo citocromo P450

(Hemingway et al., 2002). Esterases (Est) e glutathione S-transferase também compõem as principais famílias de proteínas envolvidas na resposta apresentada pelo carrapato.

- Resistência pela insensibilidade no sítio de ação: alterações em região codante podem causar alterações em aminoácidos, que por sua vez pode gerar uma alteração na estrutura tridimensional da proteína final. Todas essas alterações podem interferir na ligação das moléculas em seus respectivos sítios de ação (Pereira et al., 2008).

Por meio de estudos relacionados aos mecanismos de ação dos acaricidas, é possível explicar as ações moleculares que causam a resistência, o que inclui o aumento da expressão gênica ou da atividade de enzimas envolvidas em metabolismo xenobiótico/detoxificador e mutação(ões) em neuroreceptores para acaricidas relatados como neuromoduladores, dependendo da classe acaricida (ou seja, a resistência aos acaricidas em cada classe pode ter diferentes causas). O metabolismo xenobiótico/detoxificador também pode estar associado com a capacidade celular em modular as moléculas das drogas no meio extracelular. Também há acaricidas que agem no sistema nervoso de artrópodes afetando os neurônios pré-sinápticos, neurotransmissores ou neurônios pós-sinápticos, causando mutações em canais iônicos (alguns acaricidas utilizam o canal de sódio para neutralizar o carrapato) (Rufingier et al., 1999; Martin et al., 2003; Oakeshott et al., 2003; Lovis et al., 2012).

Resistência Acaricida

A resistência dos carrapatos à um dos primeiros acaricidas a serem desenvolvidos, os arsenicais, foi primeiramente reportada no ano de 1936, na Austrália, e posteriormente no ano de 1938, na África (Wharton, 1980). No Brasil, assim como em outros países (Argentina e Austrália), a resistência às primeiras bases químicas (arsenicais, organoclorados, organofosfatos e carbamatos) desenvolveu-se rapidamente (Wharton, 1974). Resistência aos arsenicais foi relatada pela primeira vez no Brasil no ano de 1953 (Freire, 1953). Figura 1 ilustra a distribuição da resistência no Brasil para seis diferentes classes de acaricidas, assim como para suas respectivas associações (organofosforados e piretróides; organofosforados e aminidinas). No primeiro relato publicado no Brasil contendo amostras resistentes à seis classes de acaricidas (organofosforados, piretróides sintéticos, aminidinas, lactonas

macrocíclicas, fipronil e fluazuron) conduzido no Brasil (Rio Grande do Sul), Reck et al. (2014) constatou resistência ao fluazuron em populações do carrapato *R. microplus*.

Neste documento analisamos 69 relatos de resistência à acaricidas provenientes de diferentes áreas do Brasil, pertencentes à 32 artigos de pesquisa publicados ou em resumos de congresso. Um total de 44.93% dos relatos são oriundos da região sudeste do Brasil, possivelmente devido à alta atividade pecuária regional associada ao intenso uso de acaricidas para combater o *R. microplus* (Table 1).

Novas metodologias têm sido desenvolvidas para o diagnóstico da resistência, como por exemplo o teste de imersão de larvas (Klafke et al., 2012) e o teste larval tarsal (Lovis et al., 2013). Estes testes são descritos como eficientes e podem ser uma opção em relação aos testes então sugeridos pela FAO (Food and Agriculture Organisation) (teste de imersão de adulto e teste de pacote de larvas).

É importante notar que os testes disponíveis atualmente são úteis apenas para diagnosticar o problema quando este já se encontra instalado, mas não funcionam na detecção da resistência antes que ela ocorra. Por conseguinte, os testes não são úteis para prevenção do problema da resistência, apenas diagnóstico.

Organofosforados

Organofosforados surgiram no Brasil pela primeira vez no ano de 1956 (Wharton, 1974) para substituir os organoclorados, os quais apresentaram resistência em diferentes espécies de carrapato (*Rhipicephalus microplus*, *R. appendiculatus*, *R. decoloratus*) e alto poder residual no ambiente (George et al., 2008). Organofosforados não apresentam poder residual, sugerindo um intervalo de tratamento de 21 dias. Atualmente podem ser encontrados em associação com piretróides ou produtos para controle de larvas.

Tal classe é caracterizada pelo seu mecanismo de ação, ou seja, inibição da enzima acetilcolinesterase (AChEs) (Guerrero et al., 2014). Baffi et al (2008) também encontraram relação destas enzimas com organofosforado e piretróides. Temeyer et al. (2010) também verificou que uma de três enzimas AChEs testadas em seu estudo foram insensíveis à compostos fosforados. A ausência desta enzima causa um aumento na acetilcolina, que passa a ser tóxica aos carrapatos, causando um aumento da contração muscular e paralisia.

Resistência aos organofosforados

A resistência de carrapatos aos organofosforados são normalmente associados a um único gene semi-dominante; em outras palavras, indivíduos heterozigotos também apresentam a condição de resistência, mesmo que em menor escala que indivíduos homozigotos (dominantes). Os mecanismos da resistência aos organofosforados ainda precisam ser efetivamente desvendados, mas sabe-se que existe relação com a insensibilidade da acetilcolinesterase (Foil et al., 2004), com o aumento do metabolismo das esterases localizadas no integumento de teleóginas resistentes e com a superexpressão dessas enzimas em larvas (Villarino et al., 2001).

No ano de 1963, o rebanho no Rio Grande do Sul se constituía principalmente de raças européias, propícias ao desenvolvimento de carrapatos. Tal fato explica as altas infestações e o desenvolvimento de resistência aos organofosforados (Wharton; Roulston, 1977). Em 1970, a maioria das populações de carrapatos já apresentavam resistência acaricida aos organofosforados (Wharton, 1974).

Amidinas

Na década de 1970, os organofosforados foram substituídos pelas amidinas, acaricidas que apresentam 14 dias de poder residual, permitindo assim intervalos maiores de tratamento. Amidinas estão entre os acaricidas mais populares para o controle do carrapato bovino na Austrália, América Latina e parte da África. Esta classe apresenta ainda uma baixa toxicidade tanto para bovinos quanto para humanos, e não possuem período de carência para abate (Jonsson; Hope, 2007).

Nos carrapatos, os aminidínicos são metabolizados no composto N-2,4 - dimetilfenil N-metilformamidina, o qual afeta fortemente a postura de ovos e apresenta toxicidade para todas fases de vida do carrapato, principalmente larvas.

A ação deste produto está relacionada com enzimas importantes para o metabolismo do carrapato, como as monooxidasas (Holden; Hadfield, 1975). Baxter e Barker (1999) não obtiveram sucesso em correlacionar o receptor da octopamina/tiramina com populações de *R. microplus* resistentes ao amitraz, e Corley et al (2013) verificou um aumento na frequência de genes do receptor de octopamina (Rm β AOR) em amostras que passaram por condições pressão de seleção com o uso de amitraz, correlacionando então a mudança na frequência à resistência desta classe.

Resistência à amidinas

Relatos de resistência ao amitraz foram evidenciados no estado do Rio Grande do Sul em 1994 (Nolan, 1994) e posteriormente em 1999 (Furlong, 1999). O maior nível de resistência ao amitraz pertence à cepa Santa Luiza, o qual foi constada como sendo 154 vezes mais resistente do que a amostra do grupo controle (Miller et al., 2002).

Entre os anos de 2005 e 2011, foram avaliadas a sensibilidade e resistência de fêmeas ingurgitadas ao amitraz e cipermetrina, no estado do Rio Grande do Sul. Durante o período de estudo, a porcentagem de amostras de carrapatos resistentes ao amitraz variou entre 48 e 85% do total analisado, enquanto que a resistência à cipermetrina variou entre 29 e 75%, sendo ambas bases químicas consideradas ineficazes no controle do ectoparasito (Santos; Vogel, 2012).

Em um estudo recente conduzido no Rio Grande do Norte por Coelho et al. (Coelho et al., 2013), o produto à base de cipermetrina 5% (95.1%) apresentou eficácia média maior que o produto de formulação amitraz 12.5% (84.6%). Mendes et al (Mendes et al., 2013) encontrou populações resistentes ao amitraz nos estados de São Paulo e Paraná, por meio do Teste de Imersão de Larvas.

Piretróides

Surgiram em 1977 devido ao desenvolvimento da resistência aos organofosforados, onde houve então grande estímulo no uso desta base química. Apresentam dois métodos de aplicação: pulverização, com intervalo de 21 dias, e, "*pour on*", com poder residual de sete dias.

O canal de sódio regulado por voltagem é o local alvo para a ação/atividade, bem como resistência, dos piretróides. Miller et al. (1999), trabalhando com populações resistentes à piretróides no México, e He et al. (1999), utilizando o sequenciamento de genes, indentificou a substituição de um aminoácido específico no domínio III (fenilalamina por isoleucina) do canal de sódio de nestas populações de *R. microplus*.

Um ensaio de diagnóstico foi desenvolvido (Guerrero et al., 2001), o qual permitiu a rápida detecção da substituição do aminoácido mencionado em carrapatos, larvas e ovos. Um grande número de carrapatos foi submetido a essa metodologia, sendo então o referido mecanismo confirmado em todas amostras estudadas no México (Rosário-Cruz et al., 2009).

De acordo com Lovis et al (2012), a mutação L641 no domínio II dos canais de sódio é responsável pela resistência em vários piretróides, e possuem ampla distribuição. Os autores

encontraram a presença de populações de carrapato resistente à piretróides no Brasil, Argentina, Austrália e África do Sul. Neste estudo, uma mutação presente no domínio III também foi relatada, mas somente no México, o que sugere uma separação geográfica para a ocorrência de mutações nestes dois domínios. Domingues et al. (2012) também encontraram no Brasil a mutação C190A (domínio II) no estado de Minas Gerais.

Andreotti et al. (2011) verificou a ausência de mutações no canal de sódio (domínio III) em amostras de carrapatos resistentes à piretróides em Mato Grosso do Sul, Brasil. A mutação no canal de sódio do domínio III também não foi detectada em populações brasileiras e australianas de carrapatos (Guerrero et al., 2012). No entanto, Morgan et al. (2009) e Jonsson et al. (2010) reportaram diferenças em nucleotídeos pertencentes à região do domínio II dos canais de sódio em populações de carrapatos bovinos resistentes à piretróides na Austrália. Lovis et al. (2012) também encontraram uma mutação específica para flumetrina (G72V) apenas na Austrália (Brasil, Argentina, México e África do Sul foram os outros países estudados).

Utilizando amostras provenientes de Estados Unidos e México, Stone et al. (2014) confirmaram a presença de mutações não apenas no domínio III (T213A), mas também no domínio II (C190A). Além disso, a mutação conhecida como 'super-knockdown' (M918T/TI70C), previamente encontrada apenas em insetos, também foi identificado.

Resistência aos piretróides

No ano de 1987, testes *in vitro* foram realizados utilizando fêmeas de carrapato ingurgitadas oriundas do estado de São Paulo, com o intuito de avaliar a eficiência de seis acaricidas: triclorfon + coumaphos, amitraz, fenvalerato, decametrina e cipermetrina *high cis*. Os autores concluíram que a amostra avaliada de *R. microplus* apresentou resistência aos princípios ativos decametrina e fenvelarato, amobos piretróides sintéticos (Pereira; Lucas, 1987).

Testes *in vitro* conduzidos em 1988 no Rio de Janeiro apresentaram menor sensibilidade para acaricidas baseados em piretróides: cipermetrina, alfametrina e fenvelarato, entre outros (Leite, 1988).

Testes *in vitro* conduzidos no estado do Pernambuco demonstraram que o carrapato bovino apresentava resistência aos piretróides sintéticos (cipermetrina e deltametrina), assim como para aminidínicos (Flausino et al., 1995).

No ano de 2001, os efeitos da cipermetrina, deltametrina e permetrina foram avaliados em larvas de *R. microplus* coletados no estado de Goiás. Permetrina à 2,500 ppm eliminou 100% dos carrapatos, sendo o único dos três compostos a atingir o nível recomendado de eficácia (>95%) preconizada no Brasil (Fernandes, 2001). Populações resistentes aos piretróides sintéticos também foram identificadas nos estados de São Paulo, Paraná, Mato Grosso do Sul e Minas Gerais (Nolan, 1994).

Em 2008, a cepa de *R. microplus* de Santa Luiza, proveniente da região sul do Brasil, foi relatada como resistente à permetrina e amitraz (Li et al., 2008). Utilizando bioensaios, Mendes et al. (Mendes et al., 2013) observou que populações de carrapato pertencentes ao Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul demonstravam condições de resistência à cipermetrina, deltametrina e flumetrina. Tal ocorrência foi então, o primeiro relato de resistência à flumetrina no Brasil.

No estado de Mato Grosso do Sul, no ano de 2011, Gomes et al. reportaram a resistência de *R. microplus* à organofosforados, piretróides sintéticos e aminidinas, sendo a maioria destes, ineficientes (eficácia < 95%). Apenas duas associações apresentaram efeitos nocivos aos carrapatos: DDVP 60% + clorfenvinfós 20% e cipermetrina 15% + clorpirifós 25% + butóxido de piperonila 15% + citronela 1% [58%].

Fenilpirazóis

Os fenilpirazóis foram desenvolvidos na década de 1980, e disponibilizados para o mercado nos anos 90, para utilização na agricultura e medicina veterinária [Tanner et al., 1997; Chandler et al., 2004]. Seu método de aplicação é na forma "pour on", sendo proibidos para animais em lactação.

O mecanismo de ação ocorre por meio de neuromodulação realizada pela molécula de fipronil, gerando o antagonismo dos receptores GABA (Ácido γ -Aminobutírico) e bloqueando os canais de cloro (Rauh et al., 1990), levando à hiperexcitação e morte [Tanner et al., 1997].

Originalmente, o fipronil foi empregado no controle de pragas agrícolas e outros insetos, e posteriormente utilizado para ectoparasitos de bovinos. O uso de produtos baseados em fipronil na agricultura pode interferir no controle do *R. microplus* e contribuir para a resistência a este composto (Castro-Janer, 2010).

Resistência aos Fenilpirazóis

A resistência de *R. microplus* ao fipronil em populações de campo foi primeiramente documentada no Brasil e Uruguai (Castro-Janer, 2010). Entre os anos de 2006 e 2009, na cidade de Lages, em Santa Catarina, um estudo foi conduzido utilizando fipronil 1% durante 14 tratamentos. Por meio de teste de estábulo, foi possível concluir que depois de seis tratamentos, a eficácia sofreu um decréscimo de 100 para 79.3%, sugerindo uma resistência parcial do produto (Souza et al., 2014).

Tiazolinas

Representante da nova geração de acaricidas, a tiazolina possui formulação em associação com piretróide. Este carrapaticida possui aplicação tanto na forma de pulverização quanto por imersão. O período de carência para o abate é de três dias e o uso é liberado para animais em lactação. Até o presente momento não há relatos na literatura que acuse resistência de carrapatos a este princípio ativo. Ainda não há relatos de resistência a esta classe acaricida, no entanto, Furlong et al. (2007) analisando diversos princípios ativos e associações, constatou a eficiência média de 61,2% de um produto contendo tiazolina e piretroide em associação, em estudo realizado entre os anos de 1997 a 2006.

Lactonas macrocíclicas

As lactonas macrocíclicas surgiram no início da década de 1980. São compostos derivados de produtos obtidos da fermentação de fungos actinomicetos do gênero *Streptomyces*. Essa classe dispõe de um poder residual maior que em piretróides, e seu espectro de ação parasiticida é mais amplo. Assim sendo, apresentam eficiência em diferentes vermes parasitas e larvas de *Dermatobia hominis*.

De acordo com Martin et al. (2012), lactonas macrocíclicas agem bloqueando a transmissão de atividade elétrica em nervos e células musculares, estimulando a liberação e ligação de GABA em terminações nervosas. Isto provoca um influxo de íons cloreto para dentro da célula, provocando a hiperpolarização e subsequente paralisia do sistema neuromuscular (Bloomquist, 1993).

Resistência às lactonas macrocíclicas

O primeiro relato de resistência a lactonas macrocíclicas no Brasil foi verificado no Rio Grande do Sul (Martins; Furlong, 2001). Empregando o teste de imersão de larvas (TIL), Klafke et al. (2006) publicou o primeiro relato de resistência à ivermectina diagnosticado de forma *in vitro*. Os autores também detectaram resistência à doramectina (avermectina) por meio do teste de imersão de adultos (TIA). Quatro anos depois, Klafke et al. (Klafke, 2011) também reportaram resistência à ivermectina em larvas no estado de São Paulo, utilizando o TIL e o teste de pacote de larvas (TPL).

Fluazuron

Fluazuron é um composto pertencente à classe benzoilfeniluréia, que age regulando o crescimento do carrapato por meio da inibição de incorporação de quitina na cutícula (Kemp et al., 1990).

Estudos realizados por Cruz et al. (2014), sugerem que o fluazuron apresenta efeito deletério apenas na eclodibilidade de larvas provenientes de fêmeas tratadas. Os autores também analisaram a associação entre fluazuron 3.0 g e abamectina 0.5 g, onde foi concluído que a associação com lactonas macrocíclicas possuem efeitos nocivos aos parâmetros reprodutivos de fêmeas de *R. microplus*.

Resistência ao fluazuron

O primeiro relato de resistência ao fluazuron no Brasil foi reportado por Reck et al. (2014), estudando população de carrapato originárias do estado do Rio Grande do Sul. Os autores observaram resistência à maioria das classes de acaricidas utilizados no país.

Spinosad

Grupo químico considerado recente, o spinosad é gerado a partir da fermentação de um fungo actinomiceto *Saccharopolyspora spinosa* encontrado naturalmente no solo, com uso liberado para vacas em lactação [64]. Esse princípio ativo foi originalmente desenvolvido para o controle de insetos na agricultura, e foi o primeiro representante da classe dos produtos naturais (Naturalyte). Este produto apresenta ação neuromuscular, inicialmente causando contrações musculares involuntárias, seguido de paralisia (Salgado, 1998).

O spinosad se mostrou efetivo no controle de *R. microplus* (Jonsson et al., 2010), *R. turanicus* e *Argas persicus* (Cetin et al., 2009), sendo nenhum relato de resistência publicado até então. Testes *in vitro* apresentaram também, a eficiência do spinosad para o controle de *Amblyomma americanum* e *Dermacentor variabilis* (Miller et al., 2011). No Brasil, embora não seja amplamente empregado comercialmente, o spinosad quando utilizado alcançou eficácia média de 99,96% em populações de *R. microplus* provenientes de fazendas localizados no estado de Rondônia (Brito et al., 2011).

Como reduzir a resistência à acaricidas

• Uso de testes de diagnóstico

Para preservar a eficácia acaricida, é recomendado o uso de bioensaios *in vitro* para avaliação da resistência acaricida antes da aplicação dos produtos, permitindo o uso da base química mais adequada. Os testes normalmente empregados são: TIA (Drummond et al., 1973), TPL (FAO, 2004) e TIL (Shaw, 1966).

No TIA, utiliza-se fêmeas ingurgitadas para imersão em frascos contendo diluições comerciais dos acaricidas. Posteriormente, os parâmetros reprodutivos e eclodibilidade das larvas revelam a eficácia do produto testado.

O TPL é um teste realizado com larvas, onde estas são alocadas em papéis filtro previamente embebidos em 670 µL, sendo vedados com presilhas, formando pacotes. Após o período de 24h, a taxa de mortalidade é avaliada. O TIL dispõe de uma metodologia similar ao TIA, testando em larvas as diferentes diluições de acaricidas. Este teste é importante para o diagnóstico da eficácia de acaricidas *pour on*, como as lactonas macrocíclicas (Klafke et al., 2006)

• Combinação Acaricidas e Monitoramento Regular

Por meio da literatura aqui analisada, podemos observar que a maioria dos casos de resistência pertencem à produtos com apenas uma classe química. Assim sendo, classes acaricidas em combinação e o monitoramento da resistência por meio de testes de diagnóstico, em associação com a aplicação correta do acaricida, são as principais formas de aumentar a durabilidade da eficácia dos produtos, diminuindo o aparecimento da resistência.

Conclusões

Muitas publicações recentes tem detalhado o mecanismo de ação e resistência dos piretróides, incluindo as diferentes mutações que causam resistência em carrapatos. Este tipo de trabalho contribui para um melhor entendimento do diagnóstico molecular.

Princípios ativos como a flumetrina (piretróide) e o fluazuron também foram inseridos recentemente à lista de grupos químicos os quais os carrapatos já desenvolveram resistência. Fipronil e lactonas macrocíclicas vêm apresentando também, cada vez mais relatos de resistência. Tal fato evidencia a necessidade de criar um programa de controle de carrapatos no Brasil, o que requer tempo e investimentos.

Basicamente, existem diferenças na eficiência acaricida entre populações de *R. microplus* no Brasil e no mundo. Essas diferenças podem ser observadas até mesmo entre propriedades vizinhas, sendo estas causadas principalmente devido à falta de padronização quanto à escolha do produto acaricida que seja eficaz e o não cumprimento das recomendações do fabricante. Sendo assim, o uso de testes para avaliar resistência da população de carrapatos de cada fazenda se torna cada vez mais necessária, afim de se obter um maior controle do carrapato bovino e evitar o surgimento de populações cada vez mais resistentes (incluindo os multirresistentes).

Referências Bibliográficas

Andreotti R, Guerrero FD, Soares MA, Barros JC, Miller RJ, et al. (2011) Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil Rev Bras Parasitol Vet 20: 127-33.

ANUALPEC (2014). Anuário brasileiro da pecuária.

Baffi MA, de Souza GRL, de Sousa CS, Ceron CR, Bonetti, AM. (2008) Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephallus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae). Mol Biochem Parasit 160: 70-73.

Baxter GD, Barker SC (1999) Isolation of cDNA for an octopamine-like G-protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. Insect Bioch Mol Biol 29: 461-7.

- 616 Bloomquist JR (1993) Toxicology, mode of action and target site-mediated resistance to
617 insecticides acting on chloride channels. *Comp Bioch and Physiol* 106: 301-314.
- 618
- 619 Brito LG, Barbieri FB, Rocha RB, Oliveira MCS, Ribeiro ES. (2011) Evaluation of the
620 Efficacy of Acaricides Used to Control the Cattle Tick, *Rhipicephalus microplus*, in Dairy
621 Herds Raised in the Brazilian Southwestern Amazon. *Vet Med Inter* 2011: 6
- 622
- 623 Camillo G, Vogell FF, Sangionil LA, Cadore GC (2009) Ferrari R. Eficiência *in*
624 *vitro* de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil.
625 *Cien Rural* 39: 490-95.
- 626
- 627 Campos Júnior DA, Oliveira PR (2005) Avaliação *in vitro* da eficácia de acaricidas
628 sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município
629 de Ilhéus, Bahia, Brasil. *Cien Rural* 35: 1386-92.
- 630
- 631 Castro-Janer EA (2010) Resistência de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:Ixodidae)
632 a fipronil: padronização de bioensaios *in vitro*, detecção de resistência em populações de
633 campo e avaliação sobre resistência cruzada com outras drogas.
- 634
- 635 Cetin H, Cilek JE, Oz E, Aydin L, Deveci O, et al. (2009) Comparative efficacy of spinosad
636 with conventional acaricides against hard and soft tick populations from Antalya, Turkey. *Vet*
637 *Par* 163: 101-104.
- 638
- 639 Chandler GT, Cary TL, Volz DC, Walse SS, Ferry JL, et al. (2004) Fipronil effects on
640 estuarine copepod (*Amphiascus tenuiremis*) development, fertility, and reproduction: a rapid
641 life-cycle assay in 96-well microplate format. *Environ Toxic Chem* 23: 117-124.
- 642
- 643 Coelho WAC, Pereira JS, Fonseca ZAAS, Andre WPP, Bessa EM, et al. (2013) Resistência
644 de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente à cipermetrina e amitraz em bovinos leiteiros
645 no nordeste do Brasil. *Act Vet Bras*, 7: 229-32.
- 646
- 647 Corley SW, Jonsson NN, Piper EK, Cutullé C, Stear MJ, et al. (2013) Mutation in the
648 Rm β AOR gene is associated with amitraz resistance in the cattle tick *Rhipicephalus*
649 *microplus*. *P Natl Acad Sci USA* 110: 16772 - 16777.

- Cruz BC, Teixeira WFP, Maciel WG, Felipelli G, Fávero FC, et al. (2014) Effects of fluazuron (2.5 mg/kg) and a combination of fluazuron (3.0 mg/kg) + abamectin (0.5 mg/kg) on the reproductive parameters of a field population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* on experimentally infested cattle. Res Vet Sci 97: 80-4.
- Domingues LN, Brasil BSAF, Belloa ACPP, Cunha AP, Barros ATM, et al. (2012). Survey of pyrethroid and organophosphate resistance in Brazilian field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Detection of C190A mutation in domain II of the para-type sodium channel gene. Vet Par 189: 327-32.
- Drummon DRO, Ernst SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH (1973). *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory tests of insecticides. J Econ Ento, 66(1): 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, p. 25–77
- Farias NA, Ruas JL, Santos TRB (2008) Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato *Boophilus microplus*, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul. Cien. Rural 38: 1700-04.
- Fernandes FF (2001) Efeitos toxicológicos e resistência a piretroides em *Boophilus microplus* de Goiás. Arq Bras Med Vet Zootec 53: 538-43.
- Flausino JRN, Gomes CCG, Grisi L (1995) Avaliação da resistência do carrapato *Boophilus microplus* ao amitraz e a piretróides, no município de Seropédica, Rio de Janeiro. Rev Bras Parasitol Vet 4 Suppl: 45.
- Foil LD, Coleman P, Eisler M, Fragoso-Sanchez H, Garcia-Vazquez Z, et al. (2004) Factors that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. Vet Par 125: 163-181.

Food and Agriculture Organization – FAO (2003) Producción y Sanidad Animal. In: Food and Agriculture Organization – FAO. Resistencia a los antiparasitarios: Estado actual com énfasis en América Latina. 157a ed. Roma: FAO, 2003.

Freire, JJ (1953). Arseno e cloro-resistência e emprego do Tiofosfato de Dietilparanitrofenila (parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1888). Bol Dir Prod Anim 9: 3-31.

Freitas DRJ, de Polh PC, Vaz Junior I da S (2005) Caracterização da resistência para acaricidas no carrapato *Boophilus microplus*. Act Scien Vet 33: 109-17.

Furlong J (1999) IV Seminario internacional de parasitologia animal - Control de la resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten. Diagnosis of the susceptibility of the cattle tick, *Boophilus microplus*, to acaracides, Minas Gerais, Brazil 4: 41–6.

Furlong J, Prata JRS (2000) Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Embrapa Gado de Leite.

Furlong J, Prata MCA, Martins JR. (2007) O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? A Hora Vet 159: 26-32.

George JE, Pound JM, Davey RB (2008). Acaricides for controlling ticks on cattle and the problem of acaricide resistance: 415-416. Ticks: biology, disease and control. (1stedn) Bowman AS, Nuttall PA, editors.

Gomes A, Koller WW, Barros ATM. (2011) Suscetibilidade de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. Cien Rural 41: 1447-52.

Gomes, A (1998). O carrapato-do-boi *Boophilus microplus*: ciclo, biologia, epidemiologia, patogenia e controle. In: Kessler RH, Schenk, MA. M. (Ed.). Carrapato, tristeza parasitária e tripanossomose dos bovinos.

- Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, et al. (2014) Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz J Vet Parasitol* 23: 150-156.
- Guerrero FD, Davey RB, Miller RJ. (2001) Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J of Med Entomol* 38: 44-50.
- Guerrero FD, de León AAP, Rodriguez-Vivaz, Jonsson N, Miller RJ, et al (2014). Acaricide research and development, resistance, and resistance monitoring. *Biology of Ticks*. (2nd ed.) Edited by Sonenshine DE, Roe RM, Oxford University Press: 353 - 374.
- Guerrero FD, Lovis L, Martins JR. (2012) Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet* 21: 1-6.
- He H, Chen A, Davey RB, Ivie GW, Wagner GG, George JE (1999) Sequence analysis of the knockdown resistance-homologous regions of the para-type sodium channel gene from pyrethroid-resistance *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J of Med Entomol* 36(5): 539 – 543.
- Hemingway J, Field L, Vontas J (2002). An overview of insecticide resistance. *Sci* 298: 96-97.
- Holden JS, Hadfield JR (1975) Chlorodimeform and its effect on monoamine oxidase activity in the cattle tick, *Boophilus microplus*. *Exp* 30: 1015–17.
- Jonsson NN, Cutellé C, Corley SW, Eddon JM (2010) Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* associated with resistance to flumethrin but not cypermethrin. *Inter J Parasitol* 40: 1659-1664.
- Jonsson NN, Hope M. (2007) Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Par* 146: 193–8.

- Jonsson NN, Miller RJ, Kemp DH, Knowles A, Ardila AE, et al. (2010) Rotation of treatments between spinosad and amitraz for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations with amitraz resistance. Vet Par 169: 157–164.
- Kemp DH, Dunster S, Binnington KC, Bird PE, Nolan J (1990) Mode of action of CGA 157419 on the cattle tick *Boophilus microplus*. Bull Soc Fr Parasitol 8: 100-48.
- Klafke GM, Castro-Janer E, Mendes MC, Namindome A, Schumaker TTS (2012) Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Vet Par 184: 212-220.
- Klafke GM, Sabatini GA, Albuquerque TA de, Martins JR, Kemp DH, et al. (2006) Larval Immersion Tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. Vet Par 142: 386-90.
- Klafke GM. (2011) Diagnóstico e mecanismos da resistência a ivermectina em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). PhD thesis. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.
- Koller WW, Gomes A, Barros ATM (2009) Diagnóstico da resistência do carrapato-do-boi a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul. Embrapa Gado de Corte. ISSN 1983-9715
- Laranja RS.; Martins JR.; Cereser VH.; Corrêa BL.; Ferraz C (1989) Seminário Brasileiro De Parasitologia Veterinária 6 - 1989. Identificação de uma estirpe de *Boophilus microplus* resistente a carrapaticidas piretróides, no Estado do Rio Grande do Sul, Bagé.
- Leite RC. (1988) *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiográficas da Baixada do Grande Rio e Rio de Janeiro: uma abordagem epidemiológica. PhD thesis. Rio de Janeiro: UFRRJ Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- Li AY, Davey RB, Miller RJ, Guerrero FD, George JE. (2008) Genetics and mechanisms of permethrin resistance in the Santa Luiza Strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 45: 427-38.

- Li X, Schuler MA, Berenbaum MR (2007) Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *An Rev Entomol* 52: 231-53.
- Lopes Wdz, Cruz BC, Teixeira WFP, Felippelli G, Maciel WG, et al. (2014) Efficacy of fipronil (1.0 mg/kg) against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* strains resistant to ivermectin (0.63 mg/kg). *Prev Vet Med* 115: 88-93.
- Lovis L, Guerrero FD, Miller RJ, Bodine DM, Betschart B, et al. (2012) Distribution patterns of three sodium channel mutations associated with pyrethroid resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations from North and South America, South Africa and Australia. *Int J Parasitol* 2: 216 - 224.
- Lovis L, Mendes MC, Perret JL, Martins JR, Bouvier J, et al. (2013) Use of the Larval Tarsal Test to determine acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* Brazilian field populations. *Vet Par* 191: 323-31.
- Machado FA, Pivoto FL; Ferreira MST, Gregorio FV, Vogel FSF, et al. (2014) *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in the western-central region of Rio Grande do Sul, Brazil: multiresistant tick. *Braz J Vet Parasitol* 23: 337-42.
- Martin RJ, Buxton SK, Neveu C, Charvet CL, Robertson AP (2012) Emodepside and SL0-1 potassium channels: a review. *Exp Parasitol* 132: 40–46.
- Martin T, Ochou OG, Vaissayre M, Fournier D (2003) Oxidases responsible for resistance to pyrethroids sensitize *Helicoverpa armigera* (Hubner) to triazophos in West Africa. *Ins Bioch Mol Biol* 33: 883-87.
- Martins JR (1995) A situation report on resistance to acaricides by the cattle tick *Boophilus microplus* in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil. *Seminário Internacional De Parasitologia Animal Acapulco, México*. In: INIFAP.

Martins JR, Correa BL, Maia JZ (1992) Resistência de carrapatos a carrapaticida Piretroide no Rio Grande do Sul, Gramado, Rio Grande do Sul: p. 46. Congresso Estadual de Medicina Veterinária, 11.

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

Mendes EC, Mendes MC, Sato ME (2013) Diagnosis of amitraz resistance in Brazilian populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) with larval immersion test. Exp Appl Acarol 61: 357–369.

Mendes MC, Duarte FC, Martins JR, Klafke GM, Fiorini LC, et al. (2013) Caracterização do perfil de resistência do *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a piretroides em populações dos estados do Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul, Brasil. Rev Bras Parasitol Vet 22: 379-84.

Mendes MC, Lima CKP, Nogueira AHC, Yoshihara E, Chiebao DP, et al. (2011) Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of State of São Paulo, Brazil. Vet Par 178: 383-88.

Mendes MC, Silva MX, Bracco JE. (2001) Teste bioquímico para determinar a resistência de duas cepas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) Biochemical test to determine the resistance of two strains of the tick *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Rev Bra de Parasitol Vet 10: 61-5.

Merlini LS, Yamamura MH (1998) Estudo *in vitro* da resistência de *Boophilus microplus* a carrapaticidas na pecuária leiteira do norte do estado do Paraná. Semina: Ci. Agrárias 19: 38-44.

Miller RJ, Davey RB, George JE (1999) Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 36: 533-8.

- 846 Miller RJ, Davey RB, George JE (2002) Modification of the food and agriculture organization
847 larval packet test to measure amitraz-susceptibility against Ixodidae. J Med Entomol 39: 645-
848 651.
- 849
- 850 Miller RJ, White WH, Davey RB, George JE, De Leon AP. (2011) Efficacy of Spinosad
851 Against Acaricide Resistant and Susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and
852 Acaricide Susceptible *Amblyomma americanum* and *Dermacentor variabilis*. J of Med
853 Entomol 48: 358-365.
- 854
- 855 Morgan JAT, Corley SW, Jackson LA, Lew-Tabor A.E, Moolhuijzen PM, et al. (2009)
856 Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus*
857 (*Boophilus*) *microplus* associated with resistance to synthetic pyrethroid acaricides. Inter J
858 Parasitol 39: 775-779.
- 859
- 860 Nolan J (FAO/UN 1994) Acaricide resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. Report
861 of Workshop Leader, 21-25
- 862
- 863 Oakeshott JG, Home I, Sutherland TD, Russell RJ (2003) The genomics of insecticide
864 resistance. Gen Biol 4: 1-4.
- 865
- 866 Pereira JR (2006) Eficácia in vitro de formulações comerciais de carrapaticidas em
867 teleóginas de *Boophilus microplus* coletadas de bovinos leiteiros do Vale do Paraíba,
868 Estado de São Paulo 2006. Rev Bras de Parasitol Vet 15: 45-8.
- 869
- 870 Pereira MC, Labruna MB, Szabó MP, Klafke GM (2008). *Rhipicephalus (Boophilus)*
871 *microplus* (biologia, controle e resistência). (1stedn), MedVet Livros, São Paulo, Brazil
- 872 Pereira MC, Lucas R (1987) Estudos *in vitro* da eficiência de carrapaticidas linhagem de
873 *Boophilus microplus*, proveniente de Jacarei, SP, Brasil. Rev Facul Med Vet Zoot 24: 7-11.
- 874 PhD thesis. Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de
875 São Paulo. [http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-17012011-113819/pt-](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-17012011-113819/pt-br.php)
876 [br.php](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42135/tde-17012011-113819/pt-br.php)
- 877
- 878 Ranson H, Claudianos C, Ortellì F, Abgrall C, Hemingway J, et al. (2002) Evolution of
879 supergene families associated with insecticide resistance. Sci 298: 179-81.

880

881 Rauh JJ, Lummis SCR, Sattelle DB (1990) Pharmacological and biochemical properties of
882 insect GABA receptors. *Trend Pharmacol Sci* 11: 325-329.

883

884 Raynal JT, da Silva AAB, Sousa TJ, Bahiense TC, Meyer R, et al. (2013) Acaricides
885 efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region.
886 *Rev Bras Parasitol Vet* 22: 71-7.

887

888 Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall'Angol B, Scheffer R, et al. (2014) First report of
889 fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six
890 classes of acaricides. *Vet Par* 201: 128–36.

891

892 Rosário-Cruz R, Guerrero FD, Miller RJ, Rodriguez-Vivas RI, Tijerina M, et al. (2009)
893 Molecular survey of pyrethroid resistance mechanisms in Mexican field populations of
894 *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitol Res* 105: 1145-53.

895

896 Roush RT (1993) Occurrence, genetics and management of insecticide resistance. *Parasitol*
897 *Tod*, 9: 174-179, (in press)

898

899 Rufingier C, Pasteur N, Lagnel J, Martin C, Navajas M (1999) Mechanisms of insecticide
900 resistance in the aphid *Nasonovia ribisnigri* (Mosley) (Homoptera: Aphididae) from France.
901 *Ins Bioch Mol Biol* 29: 385-91.

902

903 Salgado VL. (1998) Studies on the Mode of action of Spinosad: Insects Symptoms and
904 Physiological Correlates. *Pest Biochem Phy* 60: 91-102.

905 Santana BS, Ramos AN, Santana MA, Alves LC, Carvalho A (2013) Susceptibility of
906 *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to pyrethroids and their associations in
907 Pernambuco, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 22(2): 276-280.

908

909 Santos FCC, Vogel FSL. (2012) Resistência do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus)*
910 *microplus* frente ao amitraz e cipermetrina em rebanhos bovinos no Rio Grande do Sul de
911 2005 a 2011. *Rev Port Ciên Vet* 107: 121-4.

912

Santos TRB dos, Farias NA da R, Cunha Filho NA, Vaz Junior I da S. (2008) Uso de acaricidas em *Rhipicephalus (B.) microplus* de duas regiões fisiográficas do Rio Grande do Sul. Acta Sci Vet, 36: 25-30.

Shaw RD. (1966) Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Canestrini) and assessment of its resistance spectrum. B Entomol Res, 56: 398-405.

Silva MCL, Sobrinho RN, Linhares GFC. (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. Cien Anim Bras 2: 143-8.

Silva WW, Athayde ACR, Araújo GMB, Santos VD dos, Silva Neto AB da. (2005) Resistência de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) a carrapaticidas no semi-árido paraibano: efeito da cipermetrina e do amitraz. Agropec. Cien no Semi-árido 1: 59-62.

SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para Saúde Animal), Compêndio de Produtos Veterinários SINDAN 2014. <http://www.cpv.com.br/cpv/pesquisar.aspx>

Souza AP, Paim F, Bellato V, Sartor AA, Moura AB, et al. (2014) Avaliação da eficácia do fipronil em *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em tratamentos consecutivos. Arq Bras Med Vet Zootec 66: 55-60.

Souza AP, Sartor AM, Bellato V, Perussolo S. (2003) Eficácia de carrapaticidas em rebanhos de bovinos leiteiros de municípios da região centro sul do Paraná. Rev de Cien Agrovet 2:131-5.

Stone NE, Olafson PU, Davey RB, Buckmeier G, Bodine D, et al. (2014) Multiple mutations in the para-sodium channel gene are associated with pyrethroid resistance in *Rhipicephalus microplus* from the United States and Mexico. Parasit Vectors 7: 456.

Tanner PA, Meo NJ, Sparer D, Romano MN, Keister DM, et al. (1997) Advances in the treatment of heartworm, fleas and ticks. Can Pract 22: 40-7.

- 947 Temeyer KB, Pruett JH, Olafson PU (2010) Baculovirus expression, biochemical
 948 characterization and organophosphate sensitivity of rBmAChE1, rBmAChE2, and
 949 rBmAChE3 of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vet Parasitol 172: 114-121.
 950
- 951 Veiga LPHN, Souza AP, Bellato V, Sartor AA, Nunes APO, (2012) Resistance to
 952 cypermethrin and amitraz in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* on the Santa Catarina
 953 Plateau, Brazil. Rev Bras Parasitol Vet 21: 133-6.
 954
- 955 Villarino MA, Waghela SD, Wagner GG (2001). Histochemical localizations on esterases in
 956 integument of the female *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Tick J Medi Entomol 38:
 957 780-2.
 958
- 959 Wharton RH (1974). Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. Control of
 960 Arthropods of Med and Vet Imp 35-52 (in press)
 961
- 962 Wharton RH, Norris KR (1980). Control of parasitic arthropods. Vet Parasitol 6: 135-64.
 963 Wharton RH, Roulston WJ (1977). Acaricide resistance in *Boophilus microplus* in Austrália.
 964 In: Workshop on hemoparasites (Anaplasmosis and Babesiosis). Cent Inter Agr Trop 2: 73-
 965 | 92.

Distribution of acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus* in Brazil

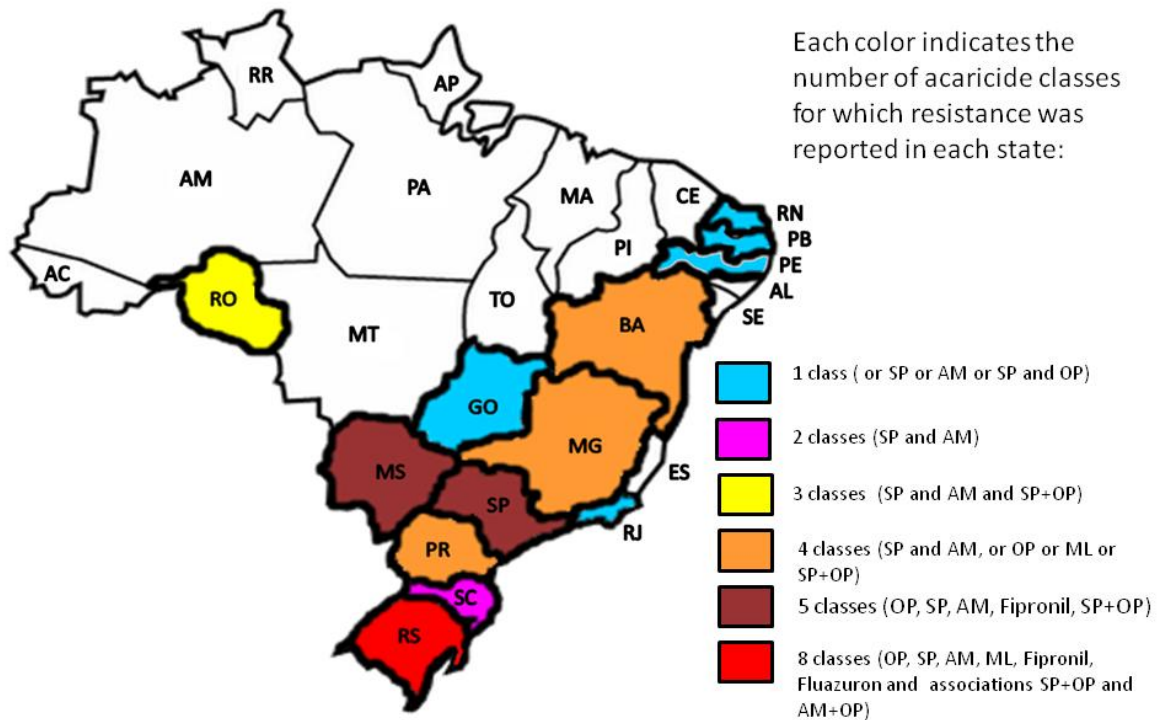


Figure 1: accumulated resistance to organophosphates (OP), syntethic pyrethroids (SP), amidine (AM), macrocyclic lactones (ML), fipronil and fluzazuron. The associations between organophosphates and pyrethroids (OP+SP) and amidines and organophosphates (AM+OP) were also considered as classes. The number of resistance classes evaluated are shown with a color code indicating at least one resistance report, and each report is related to a class. We included a total of 70 descriptions found in 33 publications, representing a ‘sampling’ of the current resistance situation in Brazil.

Sources: Andreotti et al. (2011); Brito et al. (2011); Camillo et al. (2009); Campos Junior and Oliveira (2005); Castro-Janer et al. (2010); Coelho et al. (2013); Domingues et al. (2012); Farias et al. (2008); Fernandes (2001); Flausino et al. (1995); Furlong (1999); Gomes et al. (2011); Klafke et al. (2006); Koller et al. (2009); Laranja et al. (1989); Leite (1988); Lopes et al. (2014); Machado et al. (2014); Martins (1995); Martins et al. (1992); Martins et al. (2001); Mendes et al. (2013); Mendes et al. (2011); Mendes et al. (2001); Pereira (2006); Raynal et al. (2013), Reck et al. (2014); Santana et al. (2013); Santos et al. (2008); Silva et al. (2000); Silva et al. (2005); Souza et al. (2003); Veiga et al. (2012).

984 Table 1: Resistance to organophosphates (OP), pyrethroids, amidine (AM), macrocyclic
985 lactones, fipronil and fluazuron classes; and associations between aminidine and
986 organophosphate (AM + OP), organophosphate and pyrethroid (OP + SP). This table shows
987 70 resistance descriptions found in 33 publications distributed in the brazilian states.
988 Resistance reports were found in RS (Rio Grande do Sul), SC (Santa Catarina), PR (Paraná),
989 SP (São Paulo), RJ (Rio de Janeiro), MG (Minas Gerais), MS (Mato Grosso do Sul), GO
990 (Goiás), RO (Rondônia), BA (Bahia), PE (Pernambuco), PB (Paraíba) e RN (Rio Grande do
991 Norte).

States	Organophosphates	Pyrethroids	Aminidine	Macrocyclic Lactones	Fipronil	Fluazuron	SP + OP	AM + OP
RS	(Wharton; Roulston, 1977) (Martins, 1995) (Farias et al., 2008) (Reck et al., 2014)	(Laranja et al., 1989) (Martins, 1995) (Martins et al., 1992) (Farias et al., 2008) (Santos et al., 2008) (Camillo et al., 2009) (Mendes et al., 2013) (Reck et al., 2014) (Machado et al., 2014)	(Farias et al., 2008) (Santos et al., 2008) (Camillo et al., 2009) (Reck et al., 2014) (Machado et al., 2014)	(Martin; Furlong, 2001) (Reck et al., 2014)	(Castro-Janer et al., 2010) (Reck et al., 2014)	(Reck et al., 2014)	(Farias et al., 2008) (Camillo et al., 2009) (Machado et al., 2014)	Machado et al., 2014)
SC		(Veiga et al., 2012)	(Veiga et al., 2012)					
PR		(Souza et al., 2003)	(Souza et al., 2003)				(Souza et al., 2003)	
SP	(Mendes et al., 2001) (Mendes et al., 2011)	(Mendes et al., 2001) (Pereira, 2006) (Mendes et al., 2011)	(Pereira, 2006)	(Klafke et al., 2006)	(Castro-Janer et al., 2010)		(Pereira, 2006) (Mendes et al., 2011)	
RJ		(Leite, 1988) (Flausino et al., 1995)						
ES								
MG	(Domingues et al., 2012)	(Domingues et al., 2012)	(Furlong, 1999)	(Lopes et al., 2014)				
MS	(Koller et al., 2009) (Gomes et al., 2011)	(Koller et al., 2009) (Mendes et al., 2013) (Gomes et al., 2011)	(Koller et al., 2009) (Gomes et al., 2011)		(Castro-Janer et al., 2010)		(Gomes et al., 2011) (Andreotti et al., 2011)	
MT								
GO		(Fernandes, 2001) (Silva et al., 2000)						
RO		(Brito et al., 2011)	(Brito et al., 2011)				(Brito et al., 2011)	
AC								
AM								
PA								
RR								
AP								
TO								
BA	(Raynal et al., 2013)	(Campos Junior; Oliveira, 2005) (Raynal et al., 2013)	(Campos Junior; Oliveira, 2005)				(Campos Junior; Oliveira, 2005) (Raynal et al., 2013)	
PI								
MA								
CE								
SE								
AL								
PE							(Santana et al., 2013)	
PB		(Silva et al., 2005)						

RN

(Coelho et
al., 2013)

992

993

Artigo 2

Resistance evaluation of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to acaricide formulations using samples from different Brazilian properties

Avaliação da resistência de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) frente à formulações acaricidas utilizando amostras de diferentes propriedades brasileiras

Leandro de Oliveira Souza Higa²; Marcos Valério Garcia¹; Jacqueline Cavalcante Barros¹; Wilson Werner Koller¹; Renato Andreotti¹

¹Laboratório de Sanidade Animal, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Gado de Corte, Campo Grande/MS, Brazil

²Programa de Pós-graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brasil

*Corresponding author: Renato Andreotti - Av. Rádio Maia no. 830, Zona Rural, CEP. 79106-550, Campo Grande, MS. Telephone: +55 (67) 3368-2173. e-mail: renato.andreotti@embrapa.br.

Abstract

The *Rhipicephalus microplus* tick is responsible for considerable economic losses in Brazil, causing leather damage, weight loss and reduced milk production in cattle and transmission of pathogens. Currently, the main method for controlling this tick is using acaricides, but their indiscriminate use is one of the major causes of resistance dissemination. In this study, the adult immersion test (AIT) was used to evaluate resistance in ticks from 28 properties located in five different states (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Ceará, São Paulo, e Minas Gerais) and the Distrito Federal (DF) of Brazil. The resistance was found in 47,64% of the sample, showing an efficacy of less than 90% (cutoff value for a sample to be considered resistant) in various locations throughout the country. The larvae packet test was used to evaluate samples from ten properties in four states (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais and Espírito Santo). Contact products belonging to the main classes of acaricides, including mixtures formulations, were used in both types of test. New occurrences of resistance were found on properties within the states of Ceará, Espírito Santo and Mato Grosso, where such resistance was not previously reported.

Keywords: Cattle tick; Adult Immersion Test; Larval Packet Test; Acaricide

resistance

Keywords: Cattle tick; Adult Immersion Test; Larval Packet Test; Acaricide

resistance

Resumo

O carrapato *Rhiphicephalus microplus* é responsável por consideráveis perdas econômicas no Brasil, causando nos bovinos, danos ao couro, perda de peso, redução na produção de leite e transmissão de patógenos. Atualmente, o principal método de controle a este carrapato é com a utilização de acaricidas, porém seu uso indiscriminado é uma das principais causas da disseminação da resistência. Neste estudo, o teste de imersão de adultos (TIA) foi utilizado para avaliar a resistência em populações de carrapatos provenientes de 28 propriedades localizadas em cinco estados brasileiros (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Ceará, São Paulo e Minas Gerais) e no Distrito Federal (DF). A resistência foi encontrada em 47,64% da população amostral demonstrando uma eficácia de menos de 90% (valor estabelecido para classificar uma amostra como resistente) em vários lugares do país. O teste do pacote de larva foi utilizado para avaliar amostras de 10 propriedades em quatro estados (Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, Minas Gerais e Espírito Santo). Produtos de pulverização pertencentes às principais classes de acaricidas, incluindo associações, foram utilizados em ambos os testes. Novas ocorrências de resistência foram encontrados em propriedades nos estados do Ceará, Espírito Santo and Mato Grosso, onde a resistência ainda não havia sido previamente reportada.

Palavras chave: Carrapato bovino; Teste de Imersão de Adultos; Teste de Pacote de

Larvas; Resistência acaricida

1. Introduction

Currently, it is estimated that Brazil has approximately 212.8 million bovines and exports approximately 1,5 million tons of carcass annually, thereby holding second place in world-wide meat production (ANUALPEC, 2014) and fifth place in milk production (FAO, 2015). However, one of the main obstacles to increase the profit of the supply chain is the presence of the *Rhiphicephalus microplus* tick, which occurs throughout intertropical regions and causes economic losses in many countries. According to Grisi et al. (2014), the annual losses in Brazil due to this tick are estimated to be 3.24 billion US dollars.

According to Gomes et al. (2011), in addition to reduce meat and milk production, the skin lesions caused by tick infestation affect leather prices and contribute to the development

of myiasis. This ectoparasite has also been associated with the transmission of pathogens, such as *Babesia bovis*, *B. bigemina* and *Anaplasma marginale* (Bovine Babesiosis and Anaplasmosis Complex).

Over decades, many classes of acaricide have been developed and used for tick control. Generally, each class has a different mechanism of action, but the efficacy of each of them is susceptible to the development of resistant tick populations. Resistance is defined as "the ability of a parasite strain to survive and/or to multiply despite the administration and absorption of a drug given in doses equal to or higher than those usually recommended but within the limits of tolerance of the subject" (WHO, 1965).

An integrated program to control ticks has not been established in Brazil, and the acaricides to be used in tick control are selected based on non-technical parameters. This selection process, in addition to drug underdosing, are the main factors contributing to the development of resistant populations (FURLONG and PRATA, 2000) and consequently, the propagation of alleles that confer resistance to the next generations of parasites. Therefore, reports of acaricide resistant *R. microplus* populations in Brazil, including reports of multiresistant strains, have become more frequent and have been received from locations throughout the country (HIGA et al., 2015), (RECK et al., 2014).

Due to this situation, the objective of this study was to evaluate the current status of the acaricide-resistant *R. microplus* ticks on different properties in Brazil to help beef and dairy cattle producers to choose effective acaricidal products based on the specific resistant tick populations on each property, which can be determined using toxicological bioassays.

2. Materials and Methods

Different spray acaricides were evaluated using bioassays to monitor resistance. The efficacy of the tested products was determined using tick samples collected from different locations in the country, according to the guidelines provided on the Embrapa Beef Cattle website. The samples were generally from farms with bovine tick-infestation problems. The following classes of acaricides were analyzed: pyrethroids, organophosphates, aminidines, and pyrethroid/organophosphate mixtures.

Adult Immersion Tests (AIT) (Drummond et al., 1973) using samples from 28 properties located in five states: Mato Grosso do Sul (MS), Mato Grosso (MT), Ceará (CE), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG) and the Distrito Federal (DF) were conducted. The samples from Mato Grosso do Sul were from the cities of Anastácio (latitude 20° 28' S and

longitudes 55° 48' W), Aparecida do Taboado (latitude 20° 5' S and longitude 51° 5' W), Bela Vista (latitude 22° 6' S and longitudes 56° 31' W), Campo Grande (latitude 20° 28' S and longitudes 54° 37' W), Dois Irmãos do Buriti (latitude 20° 36' S and longitudes 55° 21' W), Dourados (latitude 22° 13' S and longitudes 54° 48' W), Iguatemi (latitude 23° 25' and longitudes 54° 31' W), Jaraguari (latitude 20° 15' S and longitudes 54° 20' W), Nioaque (latitude 21° 7' and longitudes 55° 56' W), Nova Alvorada do Sul (latitude 21° 27' and longitudes 54° 22' W), Terenos (latitudes 20° 26' S and longitudes 54° 51' W) and Vicentina (latitude 22° 24' S and 54° 26' W). The samples from Mato Grosso were from Nova Mutum (latitude 13° 49' S and longitudes 56° 5' W); the samples from Ceará were from Pacajus (latitudes 4° 11' S and longitudes 38° 31' W); the samples from São Paulo were from Jaboticabal (latitude 21° 15' S and longitudes 48° 19' W); and the samples from Minas Gerais were from Estrela do Sul (latitude 18° 44' and longitudes 47° 41' W). Finally, the samples from the Distrito Federal (latitude 15° 49' and longitudes 47° 55' W) were from Brasília.

The Larvae Packet Test (LPT) was performed using samples from 10 properties with beef and milk cattle in four states (MS, MT, MG and ES). The samples of larvae and engorged females from the state of Mato Grosso do Sul were from the following cities: Aparecida do Taboado (latitude 20° 5' S and longitude 51° 5' W), Campo Grande (latitude 20° 28' S and longitudes 54° 37' W), Dourados (latitude 22° 13' S and longitudes 54° 48' W)(two properties), Iguatemi (latitude 23° 25' and longitudes 54° 31' W)(two properties), and Rochedo (latitude 19°57' S and longitudes 54° 53' W); those from Mato Grosso were from Brasnorte (latitude 12° 22' S and longitudes 58° 11' W); those from Minas Gerais were from Monte Carmelo (latitude 18° 43' S and longitudes 47° 29' W); and those from Espírito Santo were from Montanha (latitude 18° 7' S and longitudes 40° 21' W). (Figure 1)

2.1. Adult Immersion Test (AIT)

For the AITs, engorged females were washed with running water and then were dried with paper towels. In determining which engorged females to test, their physical condition, engorgement level and mobility (physical force) were considered. The ticks were weighed and were distributed into groups of 10 specimens (treatment), while maintaining the closest approximate weight of each treatment (± 0.5 g).

All products tested were commercial formulations. Commercial dilutions of each tested product were prepared in disposable bottles containing 200 mL of water and shaken to

homogenize the solution. Each group was submerged in the respective dilution for five minutes. Next, the ticks were removed from the solution and were dried with filter paper. Then, they were allocated in Petri dishes, fixed dorsally using double-sided tape and packed in BOD (Biochemical Oxygen Demand) at 28°C with a relative humidity of 80% (UR) for 14 days. When oviposition was complete, the eggs were allocated in cotton sealed syringes (cotton plug) and were maintained in BOD for another 10 days. The reproductive parameters (engorged female weight, egg weight, and hatchability rate) were analyzed according to the “Acaricide Efficacy” (AE) protocol described by Drummond et al. (1973). An acaricide product is considered efficacious when the AE is $\geq 95\%$.

2.2. Larvae Packet Test (LPT)

The LPT was performed according to the protocol proposed by FAO (2004). Filter papers were impregnated with 700 μL of the commercial dilution of each product. After 24 h, approximately 100 *R. microplus* larvae were placed in a container with the impregnated paper, which was subsequently closed with a tab. After 24 h, the mortality and acaricide efficacy were evaluated using the following formula:

$$\text{Corrected mortality \%} = ((\% \text{mortality treated} - \% \text{mortality control}) / (100\% - \% \text{mortality control})) \times 100$$

3. Results and Discussion

3.1. Acaricide test

R. microplus specimens from each property were tested using different acaricides belonging to the different classes. Each acaricide tested on a given property was considered a repetition. In this study, 102 of the 212 performed repetitions revealed the presence of resistance in the evaluated population (efficacy of less 90%). Therefore, as shown in Table 1, the average efficacy of the tested classes of acaricides was 47.64%, which was an unsatisfactory result.

In general, the main chemical classes to which resistance was found were amidines and pyrethroids (Table 1). In 20 of the 29 times that products containing amidines were tested, the acaricide efficacy was less than 90% (68.9%). Pyrethroids were tested 49 times and

showed an efficacy of less than 90% 42 times (85.6%). These results demonstrate the broad dissemination of resistance to single-base acaricides on the sampled properties.

The acaricides belonging to the organophosphate class that were tested in this study had the following formulations: Dichlorvos 60g + chlorfenvinphos 20g + *calcium alkylaryl sulfonate* 20 g + xylol and dichlorvos 60 g + chlorpyrifos 20 g. The results of the 43 tests performed using chemicals in this class showed that efficacy rates of less than 90% were obtained for specimens from only nine properties. These data suggest that acaricides in this class are effective alternative control chemicals on many properties, which can be confirmed using a specific bioassay.

Regarding combination acaricide formulations, cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 25 g + citronella 1 g + piperonyl butoxide 15 g was highly efficacious, reaching the recommended efficacy in every test that was performed.. Formulations with a high concentration of active ingredients can even develop resistance, which consequently fail to control the *R. microplus* tick.

3.2. Pyrethroids

In this study, resistance (efficacy $\leq$ 95%) to products belonging to the pyrethroid class was found in *R. microplus* specimens from the states of São Paulo, Ceará, Minas Gerais and on many farms in Mato Grosso do Sul (Table 3 and 4), with these products exhibiting efficacy ranging from zero to 100% for the three analyzed active ingredients (alpha-cypermethrin, cypermethrin and deltamethrin). These results confirmed the results obtained by Koller et al. (2009), Gomes et al. (2011) and Mendes et al. (2013) in Mato Grosso do Sul and those obtained by Mendes et al. (2001), Pereira (2006) and Mendes et al. (2011) in the state of São Paulo. There are no reports of such resistance in Ceará (HIGA et al., 2015), but it has been reported in other states in the northeastern region of Brazil, including Bahia (CAMPOS Júnior and OLIVEIRA, 2005; RAYNAL et al., 2013) and Pernambuco (SILVA et al., 2005).

Kruskal-Wallis variance analysis was applied to the data regarding the efficacy of the three pyrethroid active ingredients to kill ticks from the various properties, which showed that the efficacy of alpha-cypermethrin was different from that of the cypermethrin formulation ($p < 0.05$) at the same concentration. The average efficacy (%) of alpha-cypermethrin was 41.89% and that of cypermethrin was 81.78, suggesting that efficacy changes according to a change in the chemical structure of the drug used in the chosen locations. A second Kruskal-

Wallis variance analysis of the data related to these two chemical products was performed, which showed that their effects differed ($p < 0.05$).

Synthetic pyrethroids have been used in Brazil since the 1970s, and the first cases of resistance were reported in 1989 (ARANTES et al., 1995). Since then, pyrethroids have been widely used, and no new drugs or combined formulations of active ingredients in the same class have been developed, as was the case for the organophosphates.

3.3. Organophosphates

The acaricidal efficacy of the product with the formulation "DDVP 60 g + chlorpyrifos 20 g" was less than 95% for *R. microplus* specimens from 6 of the 24 (25%) properties evaluated, with an average efficacy of 88.13%. These data confirmed the results of Koller et al. (2009) and Gomes et al. (2011), who also tested this product using the "Adult Immersion Test" and found unsatisfactory average efficacies of 85.64% and 85.28%, respectively.

The formulation "DDVP 60 g + chlorfenvinphos 20 g + calcium alkylaryl sulfonate 20 g + xylol" was also tested, achieving an average efficacy of 91.89% and found to be ineffective on only two properties (Campo Grande and Nova Alvorada do Sul, both in Mato Grosso do Sul). These results confirm the findings of de Landim et al. (2006), who also identified a location in Uberaba (MG) for which the efficacy of this product was below the recommended level. Koller et al. (2009) and Gomes et al. (2011) also found that a product formulated as "chlorfenvinphos 20 g" combined with "DDVP 60 g" had a higher efficacy, reaching 97.68 and 100.00%. The positive response due to including this product in some mixed formulations may be related to the higher efficacy of chlorfenvinphos because its use in other studies led to a higher average efficacy than did association formulations containing chlorpyrifos. A similar result was obtained in the present study. In a study of properties in the state of Goiás, Silva et al. (2000), obtained an average efficacy of 100% using only chlorfenvinphos, supporting the results of this study.

3.4. Aminidines

Two products containing chemicals in this class were used, which were described in their documentation as "Amitraz 25 g" and "formamidine 12,5 g". The efficacy of the former

ranged from 17.76 to 100%, for an average efficacy of 76.02%. The efficacy of the latter acaricide ranged from 0 to 100%, for an average efficacy of 57.89%.

The differences in the average efficacies of these two products may be due to differences in the concentration of the ingredients, but because they were used on different properties, it is impossible to compare them because their usage histories were most likely different on the different properties. The fact that the efficacy of both products widely varied is consistent with the results described in a literature review prepared by this research team (HIGA et al., 2015), which noted that there are many reports of resistance to aminidines from locations widely distributed throughout the country.

3.5. Association Formulations

Based on the data shown in Tables 3 and 4, different acaricides in combination with organophosphates and pyrethroids were tested in this study. However, even though active ingredients from two classes have different mechanisms of action or types of activity in ticks, only one of the association formulations exhibited the recommended efficacy ($\geq 95\%$) of the FAO (1984)(Table 2, 5 and 6) for AIT tests. This product had the following formulation: cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 25 g + citronella 1 g + piperonyl butoxide 15 g". This result corroborates the findings of Koller et al. (2009), Andreotti et al. (2011), Gomes et al. (2011) and Santana et al. (2013), who found that the combination of cypermethrin chlorpyrifos, and piperonyl butoxide achieved an average efficacy of 100% in most tests.

The high level of efficacy of this product may be related to the presence of the synergist piperonyl butoxide, which is an agent that potentiates the activity of pyrethroid acaricide, increasing its efficacy. This synergist appears to act on cytochrome P450, which may inhibit the activity of acaricides such as malathion (GUEDES and ZHU, 1998), and consequently, it is used in combination with certain acaricides. In this study, this product was tested on specimens from 21 of the 28 evaluated properties and was found to be effective in controlling *R. microplus* from almost 100% of the properties (resistance had begun to appear on only one property, with the product having 94.9% efficacy).

A product with the formulation "cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 25 g + citronella 1 g" was also evaluated. This formulation was found to be effective on four of the 10 properties that were analyzed (Table 2) and exhibited an average efficacy of 71.99%. Another association formulation, "cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 30 g + fenthion 15 g", was

effective on seven of nine evaluated properties and exhibited an average efficacy of 89.24%. A Kruskal-Wallis variance test of the results obtained using these two formulations was performed due to their similar contents. This test showed that the effects of the formulations differed ($p < 0.05$), suggesting that the difference may be related to the presence of fenthion instead of citronella 1 g, as well as the increased concentration of chlorpyrifos. This result suggests that citronella may not have a sufficient acaricidal effect at this concentration (1 g) on bovine ticks and that the use of two active ingredients belonging to the organophosphate class in combination with pyrethroids may be an alternative method of tick control.

Another product with a higher concentration of chlorpyrifos was also used in this study (cypermethrin 20 g + chlorpyrifos 50 g), which achieved an average efficacy of 87.69% and was effective on 10 of the 16 properties where it was evaluated.

3.6. Larvae Packet Test

The result obtained using the LPT, similar to those obtained using the AIT, showed that the association formulations and the organophosphates were more effective than were the other products tested. Resistance to formamidines was found in various locations, and in 9 of 11 properties, its efficacy was not satisfactory ($<95\%$) (Table 7).

Using the LPT, resistance to all of the tested active ingredients was found, even resistance to the association formulation "cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 25 g + citronella 1 g + piperonyl butoxide 15 g" (Table 7), which had demonstrated a satisfactory efficacy using the AIT test. In this specific case, the owner had been using the product for a prolonged period, which demonstrates that resistance to a product that is 100% effective on other properties can develop if it is used exclusively for a long period.

Using the LPT in samples from Espírito Santo state acaricide resistance was found for formamidine 12,5 g and organophosphate: dichlorvos 60 g + chlorpyrifos 20 g. There were no reports regarding acaricide-resistant ticks in this state (HIGA et al, 2015).

It was possible to compare the two sets of samples evaluated using the two tests (AIT and LPT), as shown in the table below (Table 5). In the case of samples from Aparecida do Taboado (MS), the adult ticks were more sensitive to the acaricides than were the larvae, which was also observed in samples from a property located in Dourados, MS (Table 8).

3.7. Resistance in other Brazilian States

1294

1295 The tests of ticks in the state of Mato Grosso were conducted using samples from
 1296 properties located in the city of Nova Mutum. Resistance against the following formulations
 1297 was found: pyrethroid: cypermethrin 15 g, alpha-cypermethrin 15 g and deltamethrin 25 g;
 1298 organophosphate: dichlorvos 60 g + chlorpyrifos 20 g and associations: dichlorvos 45 g +
 1299 cypermethrin 50 g; cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 25 g + citronella 1 g and cypermethrin
 1300 15 g + chlorpyrifos 30 g + fenthion 15g.

1301 It is important to mention that until the beginning of 2015 there were no reports
 1302 regarding acaricide-resistant ticks in the state of Mato Grosso (HIGA et al., 2015). Acaricide
 1303 resistance in ticks is a serious problem for the local beef supply chain because some of the
 1304 largest herds in Brazil is in Mato Grosso. The situation regarding products in the amidine
 1305 class is unknown because they have not been tested. However, resistance to pyrethroids,
 1306 organophosphates and association formulation was found on two properties, which is a
 1307 sufficient reason for concern.

1308 Ticks resistant to the product "alpha-cypermethrin 15 g" were found on a property in
 1309 Brasília, which is also in the mid-western region of the country. This result confirms results
 1310 obtained in Goiás, where only pyrethroids had efficacy below the recommended level (SILVA
 1311 et al., 2000; FERNANDES, 2001).

1312 Tests of samples from Pacajús, in Ceará, revealed the existence of a tick population
 1313 resistant to many acaricides, including pyrethroids and amitraz. The products that did not
 1314 achieve the desired efficacy in the evaluations had the following formulations: pyrethroid:
 1315 cypermethrin 15 g, alpha-cypermethrin 15 g and deltamethrin 25 g; formamidine 12,5 g and
 1316 associations: cypermethrin 20 g + chlorpyrifos 50 g; dichlorvos 45 g + cypermethrin 50 g and
 1317 ethion 60 g + cypermethrin 8 g. This is the first report of an acaricide resistant tick population
 1318 in the state of Ceará.

1319 In the state of São Paulo, acaricide-resistant ticks were found in the municipality of
 1320 Jaboticabal, but they were resistant only to products in the pyrethroid and aminidine classes,
 1321 confirming what was previously observed by Mendes et al. (2011).

1322 On one property in the municipality of Terenos, MS, a strain that was sensitive to all
 1323 of the classes of acaricide was found, whereas on another property that is close to the first
 1324 one, ticks resistant to one combination formulation (cypermethrin 5 g + dichlorvos 45 g) and
 1325 to amitraz (Tables 3, 4 and 5) were found. These results support the proposition that each
 1326 producer who is worried about having an efficient control system needs technical guidance

based on the results of resistance bioassays to choose the appropriate product for the property. This study showed that there is acaricide resistance in tick populations in places where resistance has not been reported (Ceará, Espírito Santo and Mato Grosso). The results of this study also demonstrated that an increasing number of association formulations have an efficacy below the recommended level. Finally, considering that it has become harder to develop new effective acaricidal molecules, it is necessary to focus technical and research efforts on identifying products that are effective in controlling *R. microplus* on a given property and to investigate alternative control methods using different techniques, such as molecular biological methods.

4. Final Considerations

Due to the spread of acaricide-resistant tick populations into farms throughout Brazil, performing bioassay-based resistance diagnoses is extremely important. Knowing which chemical is effective on each property, in addition to being the first step in creating a control strategy, is a highly applicable low-cost strategy for controlling *R. microplus*. The results of such tests also facilitate the correct choose of acaricides with the objective of maintaining their efficacy (CORDOVÉS et al., 2001) because the development of new molecules with acaricidal activity is very expensive. In addition, bioassays are more amenable to the producers than are tests based on molecular assays, such as PCR.

The Molecular and biochemical aspects of pyrethroid and organophosphate classes are better understood due to recent research in the area (Guerrero et al., 2012; Abbas et al., 2014); therefore, performing toxicological bioassays (*pour on* and pulverization) of all other main classes of these acaricides (Furlong et al., 2007) will allow more effective phenotypical diagnoses of tick populations.

References

Abbas RZ, Zaman MA, Colwell DD, Gilleard J, Iqbal Z.. Acaricide resistance in cattle ticks and approaches to its management: The state of play. *Vet Parasitol* 2014; 203: 6-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.03.006>

- 1359 Andreotti R., Guerrero FD, Soares MA, Barros JC, Miller RJ, León AP. Acaricide resistance
 1360 of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras*
 1361 *Parasitol Vet* 2011; 20: 127-133. ISSN 1984-2961
 1362
- 1363 Anualpec., 2014. Anuário brasileiro da pecuária – Consultancy and information in
 1364 agribusiness. ISSN 1808-5172
 1365
- 1366 Arantes GJ, Marques AO, Honer MR. O carrapato bovino *Boophilus microplus* no município
 1367 de Uberlândia, MG: análise de sua resistência contra carrapaticidas comerciais. *Rev Bras*
 1368 *Parasitol Vet* 1995; 4: 89-93.
 1369
- 1370 Campos Júnior DA, Oliveira PR. Avaliação *in vitro* da eficácia de acaricidas sobre
 1371 *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de
 1372 Ilhéus, Bahia, Brasil. *Cienc Rural* 2005; 35: 1386-1392. ISSN 0103-8478
 1373
- 1374 Cordovés CO, Lopez DP, Dias MM. Fundamento e manejo para retardar a resistência de
 1375 *Boophilus microplus* e *Haematobia irritans* no continente americano. *A Hora Vet* 2001;
 1376 21: 37-44.
 1377
- 1378 Drummond RO, Ernst SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH. *Boophilus annulatus* and *B.*
 1379 *microplus*: Laboratory tests of insecticides. *J Econ Entomol* 1973; 66: 130-133.
 1380
- 1381 Embrapa Gado de Corte website: <http://cloud.cnpqg.embrapa.br/controle-do-carrapato->
 1382 [ms/coleta-e-envio-de-materiais/](http://cloud.cnpqg.embrapa.br/controle-do-carrapato-ms/coleta-e-envio-de-materiais/)
 1383
- 1384 FAO - Food and Agriculture Organization. Acaricide resistance. In: Food and Agriculture
 1385 Organization – FAO. *Ticks and tick-borne disease control: A practical field manual*. Rome:
 1386 FAO. Tick control 1984; 1: 246-299.
 1387
- 1388 FAO - Working Group on Parasite Resistance. Resistance management and integrated
 1389 parasite control in ruminants: Guidelines. Module 1. Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis,
 1390 Management and Prevention. 2004; 25-77.
 1391

- 1392 FAO, Dairy production and products, 2015. <http://www.fao.org/agriculture/dairy->
 1393 [gateway/milk-production/en/#.VdpAxflViko](http://www.fao.org/agriculture/dairy-gateway/milk-production/en/#.VdpAxflViko).
 1394
- 1395 Fernandes FF. Efeitos toxicológicos e resistência a piretróides em *Boophilus microplus* de
 1396 Goiás. *Arq Bras Med Vet Zootec* 2001; 53: 538-543. [http://dx.doi.org/10.1590/S0102-](http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352001000500004)
 1397 [09352001000500004](http://dx.doi.org/10.1590/S0102-09352001000500004)
 1398
- 1399 Furlong J, Prata MCA. Resistência dos carrapatos aos carrapaticidas. Instrução técnica para o
 1400 produtor de leite, Embrapa Gado de Leite 2000; 34. ISSN 1517-4816
 1401
- 1402 Furlong J, Prata, MCA, Martins JR. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que
 1403 comemorar? *A Hora Vet* 2007; 159: 26-32.
 1404
- 1405 Gomes A, Koller WW, Barros ATM. Suscetibilidade de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
 1406 a carrapaticidas em Mato Grosso do Sul, Brasil. *Ciêñ Rural* 2011; 41: 1447-1452. ISSN 0103-
 1407 8478
 1408
- 1409 Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R, Cançado PH, León AA, Pereira
 1410 JB, Villela HS. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil.
 1411 *Braz J Vet Parasitol* 2014; 23: 150-156.
 1412 <http://dx.doi.org/10.1590/S1984-29612014042>
 1413
- 1414 Guedes RNC, Zhu KY. Characterization of malathion resistance in Mexican population of
 1415 *Rhyzoperta dominica*. *Pestic Sci* 1998; 53: 15-20. DOI: 10.1002/(SICI)1096-
 1416 9063(199805)53:1<15::AID-PS746>3.0.CO;2-Q
 1417
- 1418 Guerrero FD, Lovis L, Martins JR. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus*
 1419 (*Boophilus*) *microplus*. *Rev Bras Parasitol Vet* 2012; 21: 1-6. ISSN 1984-2961
 1420
- 1421 Higa LOS, Garcia MV, Barros JC, Koller WW, Andreotti R. Acaricide resistance status of the
 1422 *Rhipicephalus microplus* in Brazil: a literature overview. *Med Chem* 2015; 5: 326-333.
 1423 <http://dx.doi.org/10.4172/2161-0444.1000281>
 1424

- 1425 Koller WW, Gomes A, Barros ATM. Diagnóstico da resistência do carrapato-do-boi a
 1426 carrapaticidas em Mato Grosso do Sul. -- Dados eletrônicos -- Campo Grande, MS: *Embrapa*
 1427 *Gado de Corte, Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento* 2009; 25: 47 ISSN 1983-9715
 1428
- 1429 Landim, VJC, Silva EA, Paes JM, Fernandes LO, Couto GS, Fidalgo EL, Silva NL, Furlong J.
 1430 Diagnosis of the situation of resistance to acaricides in *Boophilus microplus* in beef and dairy
 1431 cattle in the Uberaba region. *FAZU Journal* 2006; 3: 63-69.
 1432
- 1433 Mendes MC, Silva MX, Bracco JE. Teste bioquímico para determinar a resistência de duas
 1434 cepas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Rev Bras Parasitol Vet* 2001; 10:
 1435 61-65.
 1436
- 1437 Mendes MC, Lima CKP, Nogueira AHC, Yoshihara E, Chiebao DP, Gabriel FH, Ueno TE,
 1438 Namindome A, Klafke GM. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in
 1439 populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of
 1440 State of São Paulo, Brazil. *Vet Par* 2011; 178: 383-88. doi:10.1016/j.vetpar.2011.01.006
 1441
- 1442 Mendes EC, Mendes MC, Sato ME. Diagnosis of amitraz resistance in brazilian populations
 1443 of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) with larval immersion test. *Exp*
 1444 *Appl Acarol* 2013; 61: 357-369. doi: 10.1007/s10493-013-9697-3
 1445
- 1446 Pereira JR. Eficácia in vitro de formulações comerciais de carrapaticidas em teleóginas
 1447 de *Boophilus microplus* coletadas de bovinos leiteiros do Vale do Paraíba, Estado de São
 1448 Paulo 2006. *Rev Bras Parasitol Vet* 2006; 15: 45-48.
 1449
- 1450 Raynal JT, Silva AAB, Sousa TJ, Bahiense TC, Meyer R., Portela RW. Acaricides efficiency
 1451 on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia State North-Central region. *Rev Bras*
 1452 *Parasitol Vet* 2013; 22: 71-77. ISSN 1984-2961
 1453
- 1454 Reck J, Klafke GM, Webster A, Dall'Angol B, Scheffer R, Souza UA, Corassini VB, Vargas
 1455 R, Santos JS, Martins JRS. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A
 1456 field tick population resistant to six classes of acaricides. *Vet Par* 2014; 201: 128-36.
 1457 <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2014.01.012>
 1458

Santana BS, Ramos AN, Santana MA, Alves LC, Carvalho A. Susceptibility of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to pyrethroids and their associations in Pernambuco, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2013; 22 276-280.

ISSN 1984-2961

Silva MCL, Sobrinho RN, Linhares GFC. 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. *Ciência Animal Bras* 2000; 2: 143-148.

Silva WW, Athayde ACR, Araújo GMB, Santos VD, Silva Neto AB. Resistência de fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* e *Rhipicephalus sanguineus* (ACARI: IXODIDAE) a carrapaticidas no Semi-árido paraibano: efeito da cipermetrina e do amitraz. *Agropec Científica no Semi-árido* 2005; 1: 59-62.

WHO - World Health Organization,. Technical Report Series 1965; 296: 29.

Figures

Figure 1: Brazilian states of collected sample. Adult Immersion Tests (AIT) was performed using samples from 28 farms located in five states: Mato Grosso do Sul (MS), Mato Grosso (MT), Ceará (CE), São Paulo (SP), Minas Gerais (MG) and the Distrito Federal (DF). The Larvae Packet Test (LPT) was performed using samples from 10 farms located in four states: MS, MT, MG and Espírito Santo (ES).

Tables

Table 1: Profile of samples demonstrating acaricide resistance to different classes and associations, based on samples sent to Embrapa Beef Cattle, as determined using the Adult Immersion Test

Table 2: Total number of samples and number of samples demonstrating resistance to different “association” acaricide formulations, based on samples sent to Embrapa Beef Cattle, as determined using the Adult Immersion Test.

Table 3: Average efficacy of pyrethroids, organophosphates and aminidines in controlling *Rhipicephalus microplus* on various properties, based on samples sent to Embrapa Beef Cattle, as determined using the Adult Immersion Test.

Table 4: Average efficacy of pyrethroids, organophosphates and aminidines in controlling *Rhipicephalus microplus* on various properties, based on samples sent to Embrapa Beef Cattle, as determined using the Adult Immersion Test.

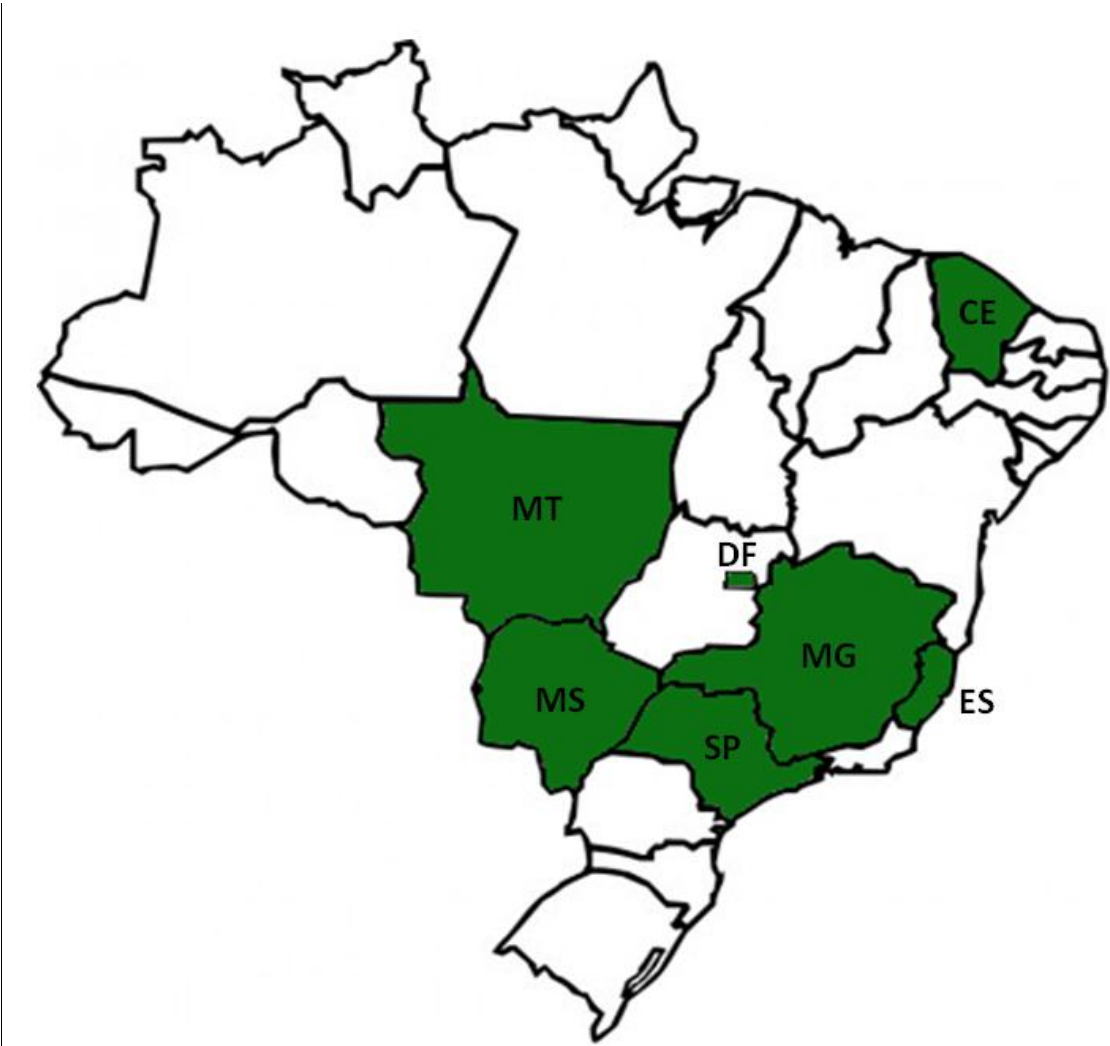
Table 5: Average efficacy of acaricides formulated with a pyrethroid in association with an organophosphate in controlling *Rhipicephalus microplus* on various properties, based on samples sent to Embrapa Beef Cattle, as determined using the Adult Immersion Test (AIT).

Table 6: Average efficacy of acaricides formulated with a pyrethroid in association with an organophosphate in controlling *Rhipicephalus microplus* on various properties, based on samples sent to Embrapa Beef Cattle, as determined using the Adult Immersion Test (AIT).

Table 7: Evaluation of the efficacy of different acaricides in controlling *Rhipicephalus microplus* on various properties, based on samples sent to Embrapa Beef Cattle, as determined using the Larvae Packet Test – LPT

Table 8: Comparison of the efficacy of different acaricides in controlling *Rhipicephalus microplus* on two properties in the State of Mato Grosso do Sul, as determined using the Larvae Packet Test (LPT) and the Adult Immersion Test (AIT)

Figure 1:



1514 Table 1:

Chemical Class	Total repetitions for each class	Total repetitions with efficacy of less than 90% (resistance)	Percentage of non-effective repetitions for each class
Association	91	30	32.9%
Formamidine	29	20	68.9%
Pyrethroid	49	42	85.7%
Organophosphate	43	9	20.9%
Total	212	101	
Total percentage	100%	47.64%	

1515 * Each acaricide product tested on specimens from each property was considered a repetition

1516 Table 2:

1517

1518

Chemical (associations)	base	Number of repetitions demonstrating resistance/total number of repetitions	Percentage of repetitions demonstrating resistance relative to the total
Dichlorvos 45 g + cypermethrin 50 g		8/17	26.6
Cypermethrin 20 g + chlorpyrifos 50 g		4/18	13.3
Cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 25 g + Citronella 1 g		6/10	20.0
Cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 30 g + Fenthion 15 g		2/ 9	6.6
Cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 25 g +Citronella 1 g + piperonyl butoxide 15g		0/20	0.0
Ethion 60 g + cypermethrin 8 g		5/7	16.6
Cypermethrin 5 g + dichlorvos (DDPV) 45 g		5/7	16.6
TOTAL RESISTANT		30	100.0

1519

1520

1521 Table 3:

1522

LOCATION	Alpha-cypermethrin 15 g	Cypermethrin 15 g	Deltamethrin 25 g	DDVP 60 g + chlorfenvinphos 20 g + ...	DDVP 60 g + chlorpyrifos 20 g	Amitraz 25 g	Formamidine 12,5 g
Campo Grande (MS)	0	44.44	14.91	21.85	22.26	-	45.18
Campo Grande (MS)	0	67.67	12.93	100	69.40	-	81.48
Pacajus (CE)	54.68	77.89	82.98	100	97.89	-	57.08
Iguatemi (MS)	21.81	77.72	48.69	100	91.82	77.66	-
Jaboticabal (SP)	54.36	-	91.52	100	-	89.48	-
Campo Grande (MS)	10.72	82.28	71.57	100	97.20	50.83	-
Campo Grande (MS)	16.24	-	-	100	-	84.60	-
Jaraguari (MS)	96.10	-	75.66	100	-	100	-
Nioaque (MS)	91.89	96.03	86.87	100	-	87.42	-
Jaraguari (MS)	44.28	81.52	-	100	88.05	-	66.6
Brasília (DF)	72.70	99.69	94.30	100	100	90.73	-
Nova Mutum (MT)	68.70	-	47.84	100	100	-	-
Ponta Porã (MS)	0	50.26	-92.26	100	100	23.99	-
Terenos (MS)	92.54	100	95.15	100	100	100	96.52
Campo Grande (MS)	26.87	94.80	-	100	76.97	17.76	70.71
Paranaíba (MS)	22.70	100	44.35	100	95.17	99.52	95.77

1523 Column 5 Product: DDVP (dichlorvos 60 g) + chlorfenvinphos 20 g + *calcium alkylaryl sulfonate* 20 g + xylol

1524 Table 4:

LOCATION	Alpha-cypermethrin 15 g	Cypermethrin 15 g	DDVP 60 g + chlorfenvinphos 20 g + ...	DDVP 60 g + chlorpyrifos 20 g	Formamidin e 12,5 g
Anastácio (MS)	42.55	90.88	-	96.3	-
Estrela do Sul (MG)	0	-	-	100	-
Nova Alvorada do Sul (MS)	79.73	-	40.41	80.85	73.47
Nova Mutum (MT)	-	2.59	-	100	-
Dois Irmãos do Buriti (MS)	-	44.74	-	2.02	21.94
Nova Alvorada do Sul (MS)	-	82.9	-	100	65.53
Terenos (MS)	-	-	-	100	100
Terenos (MS)	-	-	-	98.7	11.6
Vicentina (MS)	-	-	-	100	68.57
Bela Vista (MS)	-	-	-	100	0
Aparecida do Taboado (MS)	-	-	-	98.82	91.67
Dourados (MS)	-	-	-	99.75	45.62

1525 Column 4 Product: DDVP (dichlorvos 60 g) + chlorfenvinphos 20 g + *calcium alkylaryl sulfonate* 20 g + xylol

1526 Table 5:

LOCATION	Dichlorvos 45 g + cypermethrin 50 g	Cypermethrin 20 g + chlorpyrifos 50 g	Cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 25 g + citronella 1 g	Cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 25 g + citronella 1 g + piperonyl butoxide 15 g	Ethion 60 g + cypermethrin 8 g
Campo Grande (MS)	80.21	20.35	10.68	94.90	47.17
Campo Grande (MS)	89.55	-	32.55	100	36.65
Pacajús (CE)	89.25	78.92	95.03	100	79.47
Iguatemi (MS)	79.91	96.17	76.05	100	90.35
Jaboticabal (SP)	100	-	-	100	100
Campo Grande (MS)	100	30.54	64.53	100	21.80
Campo Grande (MS)	-	-	-	100	-
Jaraguari (MS)	100	-	-	100	88.60
Nioaque (MS)	88.34	94.22	97.23	-	-
Jaraguari (MS)	76.97	-	55.91	-	-
Brasília (DF)	100	99.16	99.67	-	-
Nova Mutum (MT)	-	99.72	-	-	-
Ponta Porã	90.32	86.56	89.90	-	-
Terenos (MS)	100	100	-	-	-
Campo Grande (MS)	70.75	100	-	100	-
Paranaíba (MS)	99.59	100	98.40	100	-

1527

1528 Table 6:

LOCATION	Dichlorvos 45 g + cypermethrin 50 g	Cypermethrin 20 g + chlorpyrifos 50 g	Cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 30 g + Fenthion 15 g	Cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 25 g + citronella 1 g + piperonyl butoxide 15 g	Cypermethrin 5 g + chlorpyrifos 7 g + piperonyl butoxide 1 mL	Cypermethrin 5 g + dichlorvos (DDVP) 45 g
Anastácio (MS)	100	100	91.98	100	-	-
Estrela do Sul (MG)	-	100	-	100	-	-
Nova Alvorada do Sul (MS)	97.97	100	-	100	-	-
Nova Mutum (MS)	15.08	97.53	78.51	100	100	-
Dois Irmãos do Buriti (MS)	-	-	-	100	100	-
Nova Alvorada do Sul (MS)	-	100	100	100	100	45.93
Terenos (MS)	-	-	100	100	-	100
Terenos (MS)	-	-	100	100	-	82.32
Vicentina (MS)	-	-	32.5	100	-	56.02
Bela Vista (MS)	-	-	100	100	-	81.49
Aparecida do Taboado (MS)	-	-	100	100	-	92.85
Dourados (MS)	-	-	100	100	-	42.77

1529

1530 Table 7:

LOCATION	Cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 30 g + Fenthion 15 g	Cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 25 g + citronella 1 g + piperonyl butoxide 15 g	Formamidine 12,5 g	Cypermethrin 5 g + DDVP 45 g	Cypermethrin 15 g	DDVP 60 g + chlorpyrifos 20 g
Brasnorte (MT)	100	99.46	92.64	99.64	-	100
Monte Carmelo (MG)	78.38	91.25	61.17	92.97	-	93.81
Campo Grande (MS)	99.57	100	25.86	100	-	100
Rochedo (MS)	100	100	60.02	100	-	99.78
Montanha (ES)	93.62	98.80	13.82	97.12	-	68.49
Iguatemi (MS)	94.64	98.09	20.59	94.03	-	88.93
Aparecida do Taboado (MS)	70.77	7.13	95.84	42.53	-	55.70
Dourados (MS)	100	100	91.75	93.85	-	99.75
Dourados (MS)	98.76	98.51	89.71	55.17	78.04	88.54

1531

1532 Table 8:

LOCATION	Applied Test	Cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 30 g + Fenthion 15 g	Cypermethrin 15 g + chlorpyrifos 25 g + citronella 1 g + piperonyl butoxide 15 g	Formamidine 12,5 g	Cypermethrin 5 g + DDVP 45 g	DDVP 60 g + chlorpyrifos 20 g
Aparecida do Taboado (MS)	LPT	70.77	7.13	95.84	42.53	55.7
	AIT	100	100	91.67	92.85	98.82
Dourados (MS)	LPT	100	100	91.75	93.85	99.75
	AIT	100	100	45.62	42.77	99.75

1533