



**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**  
**FACULTAD DE VETERINARIA**

**“CARACTERIZAR EL MODELO DE INFECCIÓN ARTIFICIAL DE  
RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS EN BOVINOS Y  
DETERMINACIÓN DE LA EFICACIA ECTOPARACITICIDA DE UNA  
FORMULACIÓN DE IVERMECTINA 3,15% Larga  
Acción”**

**“por”**

**VELÁZQUEZ TERRA, Romina**  
**OTEGUI RICCETTO, María Agustina**

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

## PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

---

M° Angélica Solari

Segundo miembro (Tutor):

---

Gonzalo Suárez

Tercer miembro:

---

Oscar Correa

Cuarto miembro (Cotutor):

---

Ulises Cuore

Autores:

---

Romina Velázquez

---

M° Agustina Otegui

Fecha: 15 de Diciembre, 2016

## **AGRADECIMIENTOS**

- A Facultad de Veterinaria – UDELAR por habernos permitido nuestra instrucción intelectual y formación como profesional.
- Al Dr. Gonzalo Suárez que ha sido nuestro tutor y guía en la realización de nuestro trabajo.
- Al Dr. Ulises Cuore nuestro co-tutor que nos brindó información y sugerencias para el mejor desarrollo de dicho trabajo.
- Al Departamento de Parasitología de la DILAVE (MGAP) que nos autorizó el acceso a las instalaciones utilizadas para la realización del ensayo.
- A Alfredo Trelles, Sergio Pires y Fabián Pedrozo del Dpto. Parasitología de la DILAVE-MGAP, por las colaboraciones brindadas durante el ensayo experimental.
- A Rosina Vilaró y Alejandra Machado (Biblioteca de la FVET) por la información brindada y tiempo dedicado a la bibliografía.
- A nuestros familiares y amigos que nos acompañaron y apoyaron durante toda nuestra trayectoria universitaria.

## TABLA DE CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS.....	3
TABLA DE CONTENIDO .....	4
RESUMEN.....	7
SUMMARY .....	8
INTRODUCCIÓN.....	9
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA .....	10
1. Biología de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	11
1.1. Modelo Epidemiológico Conceptual en Uruguay .....	16
2. Medidas de Control.....	18
2.1. Lactonas Macroclínicas .....	19
2.2. Evaluación de la eficacia terapéutica.....	22
OBJETIVO GENERAL .....	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	24
MATERIALES Y MÉTODOS.....	25
1. Lugar de trabajo, instalaciones y animales .....	25
2. Diseño experimental: .....	25
3. Obtención de muestras:.....	28
3.1. Muestras Parasitológicas .....	28
4. Análisis de Datos .....	29
4.1. Estudios Parasitológicos: .....	29
4.2. Estudios Estadísticos: .....	30
RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....	31
CONCLUSIONES .....	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39

## LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1: Oviposición de una hembra adulta ( <i>teleogina</i> ) de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	11
Figura 2: Larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> conglomeradas en pasturas, a la espera del hospedador. ....	13
Figura 3: Ciclo parasitario de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	13
Figura 4: Espolón quitinoso que poseen los machos de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> . ....	14
Figura 5: Partenogina de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	15
Figura 6: <i>Teleoginas</i> de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> caídas naturalmente de un bovino infectado artificialmente con larvas de cepa <i>Mozo</i> .....	15
Figura 7: Número y momento en el cual caen <i>Teleoginas</i> de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> de bovinos parasitados.....	16
Figura 8: Modelo epidemiológico conceptual de <i>Rhipicephallus (Boophilus) microplus</i> en Uruguay .....	17
Figura 9: Orígen y clasificación de las lactonas macrocíclicas: avermectinas y milbemicinas. ....	20
Figura 10: Instalaciones para alojar bovinos.....	25
Figura 11: Diseño experimental del ensayo .....	26
Figura 12: Administración subcutánea de Ivomec GOLD ®.....	27
Figura 13: Diseño de las canastas para la colecta de garrapatas, anexadas a los boxes .....	28
Figura 14: Secado, pesado de las <i>teleoginas</i> de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> colectadas diariamente y almacenamiento en estufa.....	28
Figura 15: <i>Xenoginas</i> y pesaje de huevos de las <i>teleoginas</i> de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> colectadas 14 días previos. ....	29
Figura 16: Evolución del recuento de garrapatas post dosificación Ivermectina en los grupos Tratado y Control.	
Figura 17: Evolución del recuento de garrapatas en los primeros 15 días post dosificación Ivermectina en el grupo Tratado.....	33
Figura 18: Evolución del peso de las <i>Teleoginas</i> incubadas caídas de bovinos asignados al grupo Control y Tratado.....	33

Figura 19: Evolución del Índice de Fertilidad de las *Teleoginas* incubadas caídas de bovinos, asignados al grupo Control y Tratado.....34

Tabla 1: Distintas concentraciones de Ivermectina con sus dosis correspondientes de uso, tratamientos para erradicarla, tiempos de espera en carne y leche .....21

Tabla 2: Peso de las *Teleoginas* incubadas, Peso huevos producidos y Porcentaje de Eclosión del grupo tratado con Ivermectina en los primeros tres días post tratamiento.....32

Tabla 3: Eficacia, Coeficiente de Variación e Índice de Reproducción de los grupos control y tratado con Ivermectina, según distintos estadios del ciclo biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. .....35

Tabla 4: Eficacia, Coeficiente de Variación e Índice de Reproducción de los grupos control y tratado con Ivermectina desde el día 1 al 63.....36

## RESUMEN

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es uno de los parásitos de mayor importancia para la ganadería debido a las grandes pérdidas que ocasiona. Para su control la estrategia más utilizada consiste en interrumpir el desarrollo del ciclo biológico, a través de la aplicación de productos químicos. El presente trabajo pretende convalidar un modelo de infección artificial de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y determinar la eficacia ectoparacitocida de una formulación de Ivermectina (IVM) 3,15% de larga acción. Mediante un estudio controlado en prueba de establo, donde se utilizaron 10 animales con un peso promedio de 168 kg  $\pm$  9,55 criados en condiciones de bioterio (sin contacto previo de garrapatas y sin productos químicos); los cuales fueron asignados al azar a un grupo control (n=4) y un grupo tratado (n=6). Los animales fueron infectados con una cepa sensible (cepa *Mozo*) dos veces por semana con 100mg de larvas durante 78 días. Al día 25 de comenzada la infestación fueron dosificados con IVM (630  $\mu$ g/kg; 3,15% larga acción, aplicación subcutánea). Las *teleoginas* que caían del animal se colectaron diariamente (desde el -D3 hasta el D63) con el fin de incubarlas para determinar peso de los huevos y porcentaje de eclosión. Los resultados arrojados demostraron que la cepa *Mozo* se comportó de manera esperada presentando picos modales de caída. En relación al comportamiento de la formulación de IVM 3,15% LA, la Eficacia Relativa y Absoluta no presentaron diferencias, alcanzando el 100% a partir del tercer día post tratamiento. Respecto al Poder o Eficacia Residual se obtuvo una residualidad entre 23 y 36 días. Los resultados obtenidos marcaron una dispersión de la eficacia residual en el comportamiento de una formulación de IVM 3,15% larga acción sobre una cepa sensible; sugiriendo el beneficio y la importancia de mayores estudios complementarios a nivel de campo.

## SUMMARY

Rhipicephalus (Boophilus) microplus is a tick which is one of the most important parasites in stockbreeding, mainly due to the massive losses it produces. The most popular strategy to manage it consists in interrupting the development of its biological cycle through application with chemical products. This study intends to characterize an artificial infection model of the Rhipicephalus (Boophilus) microplus cycle in bovines and also to determine the ectoparasiticide efficacy of a long-acting Ivermectin (IVM) 3,15% formulation. We conducted a controlled stall test study with 10 animals weighing on average  $168 \pm 9,55$  kg, reared in an animal facility, which were assigned randomly to both a control group (n=4) and treated group (n=6). The animals were infected with a sensitive strain (Mozo strain) twice a week with 100 mg of larvae during 78 days. 25 days after the infestation, they were treated with long-acting IVM 3,15% (630  $\mu$ g/kg; 3,15% long acting, delivered subcutaneously. We collected daily teleogines that fell from the animal (from -D3 to D63) in order to incubate them and determine the egg weight and hatching percentage. Results showed that Mozo strain acted as expected with modal peaks of detachment. Compared to the behavior of IVM 3.15% LA formulation, no differences were perceived regarding the relative and absolute efficacy, reaching 100% of efficacy three days post-treatment. In terms of power or residual efficacy, residuality was obtained between the 23th and 36th days. Results showed a dispersion of the residual efficacy in a long-acting IVM 3.15% formulation on a sensitive strain; therefore it is important that further studies be carried out on field.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias en vacunos, son patologías de gran importancia, debido al efecto directo negativo que producen sobre la sanidad animal. Los parásitos presentan diferentes acciones patógenas sobre los hospedadores, las cuales repercuten negativamente en la producción del animal afectado. Esto amerita llevar a cabo el control de estas enfermedades de manera de evitar los efectos adversos, la evolución a la cronicidad y las pérdidas económicas que suponen a nivel de las explotaciones (Ysamat, 2004). Las parasitosis las podemos clasificar en endoparasitosis (aquellas producidas por parásitos gastrointestinales, respiratorios y protozoarios) y ectoparasitosis (las producidas por garrapatas, sarna, moscas y piojos). Siendo la infestación por garrapata la ectoparasitosis más importante en bovinos, debido a la complejidad que conlleva su control y erradicación; y a la emergencia de cepas resistentes a los acaricidas disponibles en el mercado farmacéutico. Lo cual determina pérdidas directas e indirectas. Las pérdidas directas están relacionadas al daño de los cueros, por acción mecánica del parásito, lo cual además ofrece una puerta de entrada para bacterias y larvas de moscas (miasis); pérdida de sangre debido al hábito alimenticio durante su fase parasitaria, lo cual puede producir anemia en grandes infestaciones ya que cada ejemplar ingiere entre 1-2 ml (Fiel y Nari, 2013) y el efecto de sus toxinas que alteran el metabolismo lo cual incide negativamente sobre la ganancia de peso (debido a la inapetencia) y producción de leche de animales infestados (Holdsworth y col., 2006). Respecto a las pérdidas indirectas hablamos de las transmisiones de agentes patógenos: *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*, los cuales a su vez producen disminución en la producción, mortalidades y altos costos para su control (Solari y col., 1992). Otro tipo de pérdidas indirectas, no menos importantes son las restricciones comerciales por riesgo de contaminación en la carne, leche y medio ambiente, debido a la utilización de productos químicos para el combate de dicho ectoparásito (Cuore, 2006).

Estimaciones realizadas por la Dirección General de Servicios Ganaderos (DGSG)- Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP), actualizadas al 2005 revelaron

que el impacto económico de la garrapata y las enfermedades asociadas en el país, asciende a 45 millones de dólares. El control y erradicación de esta ectoparasitosis está regulada desde el 13 de abril de 1910 por la Ley 3.606 donde se crea la Oficina de Policía Sanitaria, pilar de todas las reglamentaciones relacionadas con la Sanidad Animal. Posteriormente en 1956 se la declara plaga nacional mediante la Ley N° 12.293 y en el 2008 es derogada por la nueva Ley 18.268 donde se declara de interés nacional la lucha contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Errico y col., 2009).

En la actualidad existen diferentes alternativas de control utilizados contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Los métodos químicos son una de las estrategias más utilizadas para controlar la garrapata, las cuales se basan en la aplicación de productos ectoparaciticidas (garrapaticida); por tanto, el Decreto 160/997 del 21 de mayo de 1997, exige que todos los productos ectoparaciticidas deban cumplir con ciertos requisitos para su aprobación y posterior uso en la campaña de lucha contra la garrapata. El organismo responsable de comprobar la eficacia parasitológica de un producto veterinario es el Laboratorio Oficial (Departamento de Parasitología, DILAVE “Miguel C. Rubino”). Esto se realiza a través de la prueba de establo, la cual brinda información objetiva y comparable de la eficacia parasitaria y residualidad de un ectoparaciticida. En los últimos años en nuestro país se ha incrementado el registro de estos productos para ser utilizados en la campaña oficial contra la garrapata, en particular las formulaciones en base a Lactonas Macroclínicas (LM) - Ivermectina 3,15% (IVM) de larga acción (más de 30 registros). Estas formulaciones al momento de su registro presentaron una eficacia superior al 95% en la prueba de establo, porcentaje mínimo exigido para su aprobación y utilización en campaña oficial. Actualmente, se estableció mediante el Decreto 326/013 que la residualidad de las LM a concentración 3,15% deberá tener un valor no menor a 45 días (Cuore y col., 2015b).

La presente tesis pretende convalidar el modelo de infección artificial de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos en condiciones de estabulación y describir la actividad ectoparasiticida de la IVM, luego de la aplicación a dosis única por vía subcutánea vehiculizada mediante una formulación de larga acción (630 µg/kg, 3,15% LA).

## REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 1. Biología de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

*Rhipicephalus (Boophilus) microplus* es una de las principales garrapatas que parasita a los bovinos en el área tropical y subtropical (Nari, 2005). La importancia de esta ectoparasitosis, se debe a las pérdidas directas e indirectas que ocasiona. Por lo cual, es fundamental conocer su biología e interacciones con el huésped y ambiente. El ciclo biológico del *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se compone de dos etapas, una etapa de vida libre la cual transcurre en el ambiente; y otra etapa de vida parasitaria sobre el huésped (Fiel y Nari, 2013).

El ciclo de vida libre comienza cuando la *Teleogina* (hembra ingurgitada) se desprende del huésped y cae al suelo. El periodo comprendido entre el desprendimiento y el comienzo de la oviposición (Figura 1) se denomina *Protoquia*. Cardozo y col. (1984) registraron para Uruguay en los departamentos de Artigas, Cerro Largo y Tacuarembó, que los valores máximos de *protoquia* se determinaron en un rango de 25 a 51 días a partir de Agosto (temperaturas promedio de 16 a 19°C, bajo condiciones naturales). Disminuyendo a valores mínimos entre 2 a 3 días en las condiciones climáticas estivales. Estudios posteriores realizados entre 2003 y 2005, en una zona de basalto y otra bajo monte natural (Salto y Paysandú) determinaron que los tiempos máximos de *protoquia* oscilan entre 46 a 97 y 112 días respectivamente (Sanchis citado por Fiel y Nari, 2013).



Figura 1: Oviposición de una hembra adulta (*teleogina*) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fuente: Gutierrez, J. (2006).

El período comprendido entre el inicio y finalización de la ovipostura se le denomina *Ootoquia*. En condiciones óptimas las garrapatas realizan toda la postura en 14 días (Fiel y Nari, 2013). En términos generales se puede decir que la *ootoquia* tiene el doble de duración en invierno que en verano y en condiciones climáticas muy rigurosas su duración puede triplicar en el invierno las cifras estivales (Nuñez y col., 1987). Es importante considerar que tanto en la etapa de *ootoquia*, *eclosión*, como *teleogina*, cuando las condiciones ambientales son adversas, ocurre la “interrupción del ciclo no parasitario”.

*Metatoquia*, es el período de tiempo que transcurre entre el cese de la oviposición y la muerte de la *xenogina*, es decir de la hembra ovígera que ya cumplió su función. Según Nuñez y col. este período trascurre aproximadamente entre 2 a 15 días.

Los huevos depositados en el ambiente presentan forma elíptica, miden aproximadamente 550 por 400µm, son de color marrón oscuro y de superficie brillante, pegajosa, cubierta por una sustancia de aspecto albuminoide (Figura 1). Dentro del período de *incubación* encontramos valores mínimos de 15 días y máximos de 51 días (Nuñez y col., 1987). Posteriormente, y en condiciones ideales, el porcentaje de *eclosión* logrado habitualmente llega al 85% o incluso valores superiores; por el contrario en condiciones adversas (altas temperaturas y baja humedad [verano] o temperaturas muy bajas [invierno]), puede redundar en que eclosionen solo una mínima parte de la masa de huevo depositada o que emerjan larvas poco viables.

Una vez eclosionados los huevos emerge la *larva* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, la cual tiene aproximadamente 500µm de largo por 400µm de ancho, de forma ligeramente ovoide y tres pares de patas; es de color ámbar, claro al principio y luego se va oscureciendo, tomando finalmente un tono rojizo oscuro. Debido a que presenta un geotropismo negativo, suben por las pasturas formando conglomerados de larvas (Figura 2), lo que las protege de la desecación en espera de un huésped (tasa de encuentro). Transcurrido aproximadamente dos meses de la *eclosión*, la cantidad de larvas disponibles en las pasturas decrece significativamente, aunque en las condiciones de nuestro país pueden permanecer viables hasta seis meses. La muerte de las larvas se debe al agotamiento de sus reservas, al frío (heladas) y a la desecación. En Uruguay, se observó la mayor supervivencia de larvas nacidas

durante los meses de Abril a Mayo, provenientes de *teleoginas* expuestas en Febrero y Marzo (109 a 188 días), sobreviviendo los meses fríos de invierno hasta Noviembre (Cardozo y col., 1984).



Figura 2: Larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* conglomeradas en pasturas, a la espera del hospedador. Fuente: Junquera (2011).

Una vez que la larva logra contactar con un huésped (bovino), comienza la etapa del ciclo parasitario (Figura 3), la cual se caracteriza por presentar un rango de variación en días estrecho.

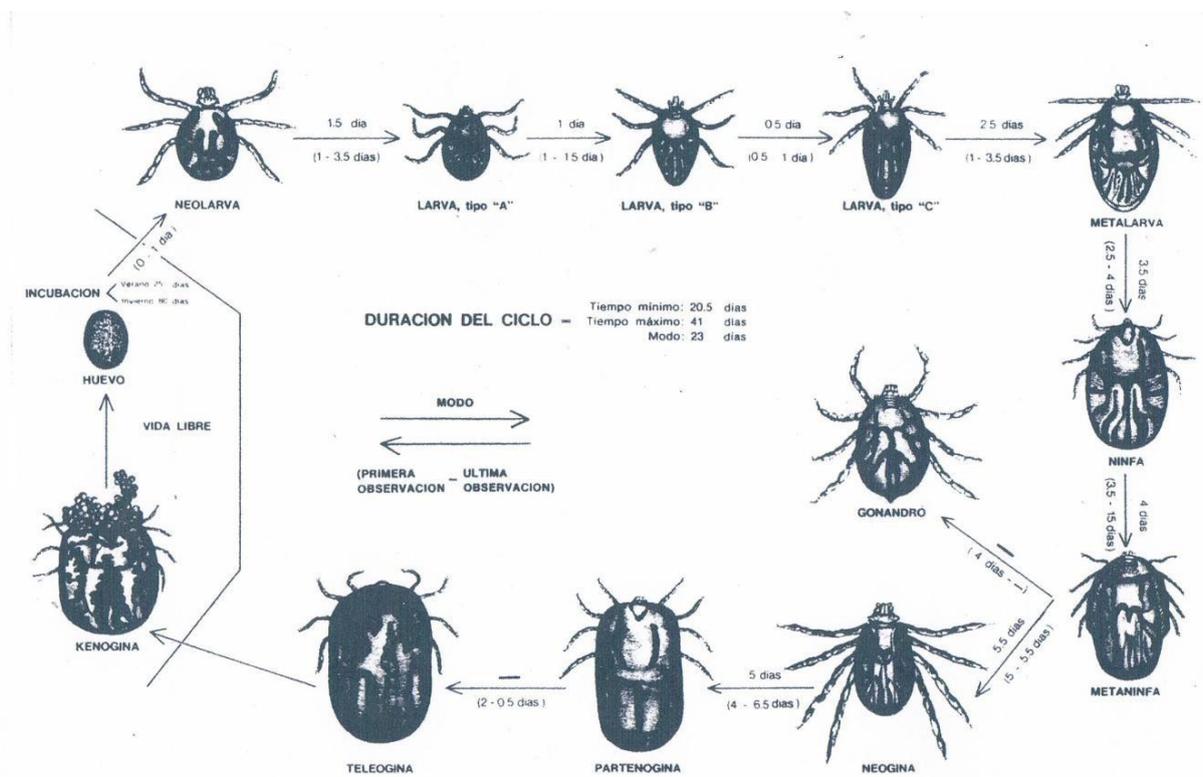


Figura 3: Ciclo parasitario de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fuente: Nuñez, 1987.

En líneas generales el ciclo parasitario puede dividirse en una etapa *larval*, una etapa *ninfal* y una tercera etapa denominada *adult*. Los períodos de duración de

cada una de las etapas se describen empleando la moda como medida de resumen. La etapa *larval* es la de mayor sensibilidad a los tratamientos ectoparasiticidas. *Metalarva* es la primera etapa de muda y comienza a aparecer entre los 3 y 4 días del ciclo; se observan con mayor facilidad ya que miden 1mm y son de color blanquecino. La doble cutícula le confiere resistencia mecánica a la penetración del ectoparasiticida en baños de inmersión. Una vez transcurrida la primera muda estamos frente a la etapa de *Ninfa*, la gran mayoría aparece a los 9 días del ciclo midiendo 1mm, presenta cuatro pares de patas y tres hileras de dientes a cada lado del hipostoma. Se inmoviliza y da comienzo a la segunda etapa de muda, *Metaninfa*. En ésta, adquiere un aspecto globuloso conferido por la doble envoltura de quitina. Mide de 2,5 a 4 mm, apareciendo a los 13 días del ciclo. Las garrapatas ingurgitadas entre los 9 y 14 días después del tratamiento estarían como *ninfas* o *metaninfas* al momento del tratamiento, esto tiene importancia epidemiológica ya que mecánicamente la doble cutícula impide la penetración del acaricida de inmersión o spray, y pueden aparentar presentar una resistencia genética al acaricida.

La etapa de *Adulto* comienza a los 13 a 14 días del ciclo, la garrapata presenta cuatro pares de patas y a diferencia de las *ninfas* cuatro pares de dientes a cada lado de la línea media del hipostoma. En esta etapa comienza la diferenciación sexual.

Los *Machos* (Figura 4) se observan a los 13,5 días del ciclo y pueden vivir por más de 40 días, son pequeños (2,5 x 1,3 mm), muy móviles y presentan apéndice caudal. A diferencia de las hembras, estos se prenden y desprenden varias veces para alimentarse y son capaces de desplazarse en el animal en busca de hembras para fecundar (Fiel y Nari, 2013).



**Figura 4: Espolón quitinoso que poseen los machos de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fuente: “Programa de Lucha contra la Garrapata”, MGAP (2006).**

Las *Neoginas* (hembras), se observan a los 14,5 días del ciclo, presentan patas largas en relación al cuerpo y miden 2 x 1,3 mm. Estas comienzan a crecer y en 3 o 4 días su peso se incrementa un 80%, esta etapa se le denomina *Partenogina* (Figura 5). Tienen una longitud de 3 a 4 hasta 6 mm. Entre los días 17 y 18 del ciclo comienzan a estar semi ingurgitadas y a la espera de la cópula. Si no son fecundadas permanecen en este estado hasta que mueren; por el contrario si son fecundadas continúan hasta completar el ciclo.



**Figura 5: Partenogina de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fuente: “Programa de Lucha contra la Garrapata”, MGAP (2006).**

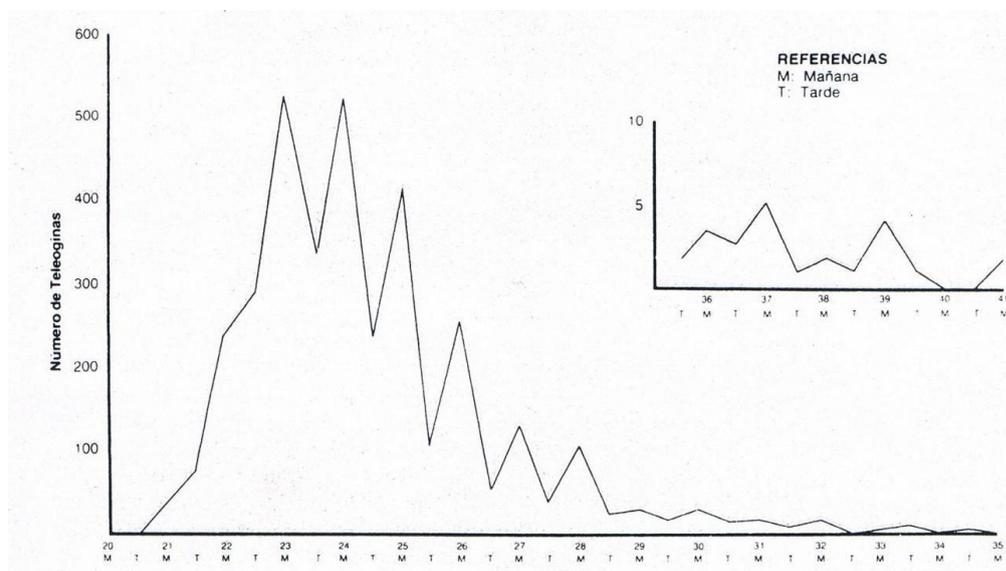
*Teleogina* (Figura 6), se le denomina a la hembra ya fecundada, ingurgitada y que cae al medio ambiente; su forma es ovoide, color verde grisáceo y mide de 8 a 13mm de largo por 4 a 8mm de ancho, tiene un peso promedio aproximado de 0,24 gramos. Generalmente ovipositan una masa de huevos que corresponde a la mitad de su peso, con un peso equivale de 0,1 gramos de huevos el cual se corresponde a unas 2000 larvas. Esto manifiesta el poder biótico del parásito (Fiel y Nari, 2013).



**Figura 6: *Teleoginas* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* caídas naturalmente de un bovino infectado artificialmente con larvas de cepa *Mozo***

Las primeras garrapatas ingurgitadas se observan a los 20,5 días del ciclo (entre 19 y 21 días). Antes de terminar el ciclo parasitario, la garrapata se ingurgita de sangre (1 a 2mL) en pocas horas. Luego se desprende en forma natural del bovino, lo que

sucede fundamentalmente en las primeras horas de la mañana (Figura 7) (Nuñez y col., 1987).



**Figura 7: Número y momento (Tarde [T] – Mañana [M]) en el cual caen *Teleoginas* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* de bovinos parasitados. Fuente: Nuñez y col. (1987).**

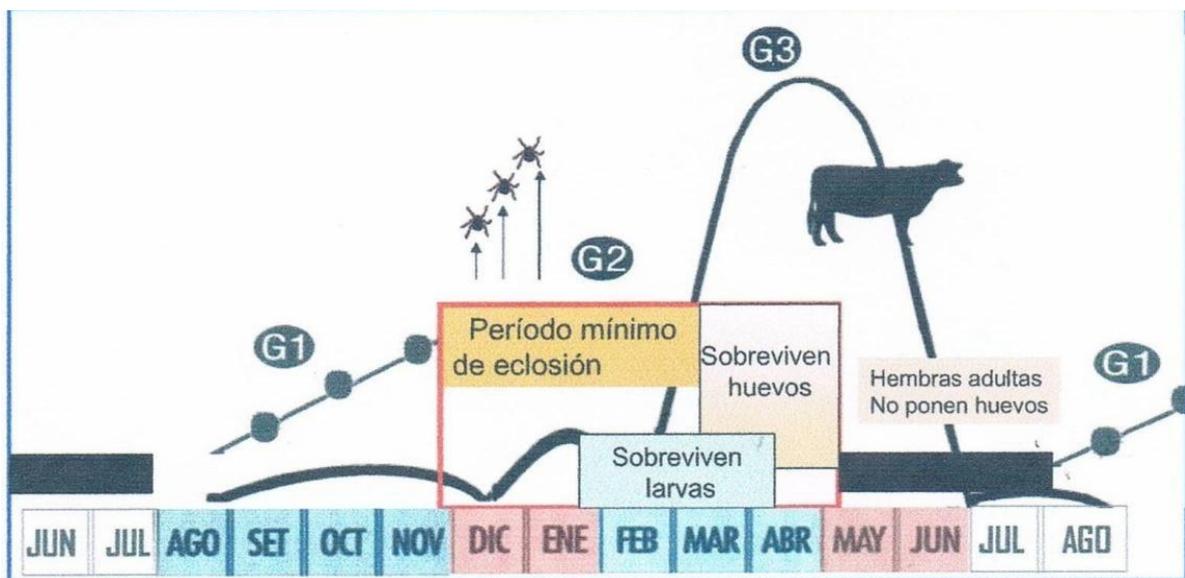
Los estudios de ecología llevados a cabo en el país determinaron que el ciclo de vida libre dura como máximo entre 8 y 10 meses y el ciclo de vida parasitario 23 días (moda) presentando un rango de 20,5 a 42 días de duración (Fiel y Nari, 2013).

### 1.1. Modelo Epidemiológico Conceptual en Uruguay

Entre los años 1975-1981, Nari y Cardozo realizaron estudios sobre la ecología del *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay, determinando un claro comportamiento de la garrapata, con tres generaciones al año y una interrupción del ciclo no parasitario en los meses de invierno. Este conocimiento permitió diseñar un “*Modelo Epidemiológico Conceptual*” (Figura 8), de importancia crucial para el control estratégico de la garrapata en nuestro País (Fiel y Nari, 2013).

Una generación de garrapatas se define como el período transcurrido desde que una larva parasita al bovino, cae como adulto ingurgitado, oviposita, eclosionan larvas y vuelven a parasitar un bovino. En condiciones ideales de temperatura y humedad (27°C y más 80% HR) una generación se puede desarrollar en dos meses.

La primer generación de garrapatas transcurre entre Agosto y Octubre; se genera a partir de las garrapatas caídas en el otoño. Sobre fines del invierno y principio de la primavera las condiciones climáticas son más favorables en relación al invierno, por lo que los ciclos se van acortando y la descendencia de las garrapatas que completan el ciclo parasitario es fértil y son las responsables de formar la segunda generación. Su desarrollo ocurre en Noviembre a Diciembre principalmente; las poblaciones de garrapatas parasitando al bovino son mayores en relación a la primera generación, con promedio de 25 garrapatas por animal (Fiel y Nari, 2013).



**Figura 8: Modelo epidemiológico conceptual de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. Fuente: Nari (1990).**

A partir de la segunda, sigue la tercer generación la que comienza a fines de verano y su máxima expresión se da durante los meses de otoño. Desde el punto de vista epidemiológico tiene suma importancia debida a que las garrapatas caídas, sus huevos, y las larvas superan las condiciones del invierno, y son las responsables de formar la primer generación de garrapatas de la siguiente temporada.

Según estudios de ecología del *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en tres áreas del Uruguay, se pudo constatar que se presentan tres generaciones de garrapata al año, en condiciones epidemiológicas de campo abierto (litoral Norte) y tres y media generaciones al año en condiciones de abrigo bajo monte (costas del Río Uruguay) (Fiel y Nari, 2013).

La compleja interacción entre factores abióticos (déficit hídrico, temperatura, suelos) y bióticos (pasturas, carga animal, biotipos) modulan la abundancia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en un área determinada, siendo conveniente evaluar continuamente esos parámetros para desarrollar modelos climáticos que determinen el aumento o el retroceso de las áreas favorables para el ciclo de la garrapata (Fiel y Nari, 2013).

## 2. Medidas de Control

Las actuales estrategias de control contra la “garrapata común del ganado” se basan en el uso de productos químicos, sin embargo, la resistencia del parásito se está convirtiendo en un problema global. Entendemos como resistencia, la habilidad de una población de parásitos para tolerar dosis de tóxicos que serían letales para la mayoría de los individuos de una población normal (susceptibles) de la misma especie. Una de las principales preocupaciones en el uso de estos productos es la contaminación ambiental y la presencia de residuos en los alimentos de origen animal. Debido a estos problemas, se han desarrollado alternativas o tratamientos no químicos para el control de esta parasitosis, como lo es la Resistencia según la especie; *Bos indicus* (ganado cebú, característico de climas tropicales) es más resistente a infestaciones graves de garrapatas que la especie *Bos taurus* (originarios de Europa, característicos de climas templados) (Cardozo y col., 1984).

El Control biológico puede ser otra de estas alternativas, se conoce la existencia de vacunas (recombinantes, macerados de larvas), hongos entomopatógenos, aceites esenciales que afectan a distintas etapas del ciclo de la garrapata. En los últimos años se ha demostrado que el control biológico podría ser una alternativa y es muy discutido como parte del control integrado de parásitos. El Manejo, es otra de las estrategias y no menor, se basa fundamentalmente en modificar el hábitat natural de la garrapata para afectar el desarrollo y viabilidad en su fase no parasitaria. El descanso de pasturas para el control de las garrapatas es un método que funciona y está basado en el período de vida que tiene el estado no parasitario (FAO, 2003). La rotación entre especies también ha demostrado una disminución importante en la carga parasitaria de las pasturas (bovino-ovino) (Fiel y Nari, 2013).

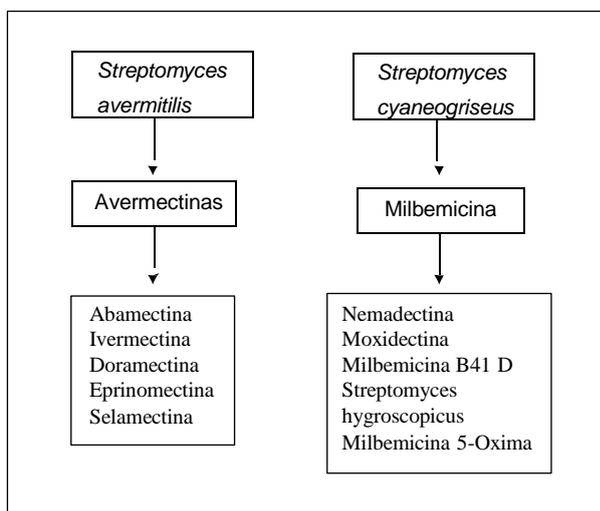
En la actualidad son los tratamientos químicos casi el único recurso disponible con el que cuentan los productores para el control de este parásito (Fiel y Nari, 2013). Durante décadas estas poblaciones de garrapatas se controlaron mediante baños de inmersión con acaricidas arsenicales, hacia el 1950 debido a la resistencia generada fueron sustituidos por acaricidas clorados, luego comenzaron a emplearse los organofosforados pero en el 1978 se registró resistencia y fueron reemplazados por acaricidas en base a piretroides sintéticos (tipo I: alletrina, tetrametrina, permetrina y los tipo II: cipermetrina, fenvalerato, cialotrina) (Picco, E., 2009), siendo el primer diagnóstico de resistencia en Uruguay en 1994 (Cardozo 1995, citado por Fiel y Nari, 2013). Posteriormente en el 2006 se diagnosticó oficialmente resistencia a la molécula Fipronil (Fenilpirazoles) (Cuore y col., 2007), en 2009 al Amitraz (Amidinas) (Cuore y col., 2012) y en 2010 a Ivermectina y Moxidectin (Lactonas Macroclínicas) (Cuore y col., 2015a). De los principios activos aprobados para su uso en la campaña de lucha contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sólo frente al Fluazurón (Benzoilurea) no se ha diagnosticado resistencia (Cuore y col., 2012).

Cuore y col. en 2008 mencionan que la mayoría de los tratamientos químicos registrados se presentan en base a productos de aplicación parenteral de forma inyectable (administración subcutánea) o derrame dorsal (*Pour-on*). Permitiendo inferir que no solo los principios activos tienen relevancia frente al control ectoparacítico, sino las diferencias farmacotécnicas en las presentaciones farmacéuticas que se encuentran disponibles para un mismo principio activo. Tomando como base a las Lactonas Macroclínicas (como grupo químico) se desarrollaron formulaciones de liberación prolongada o de larga acción (LA), éstas se definen como preparaciones que una vez depositadas en el sitio de administración, mantienen de forma prolongada una cantidad diaria de suministro del fármaco, con el objetivo de mantener una concentración sanguínea constante (Collins y Garnett 2000).

## 2.1. Lactonas Macroclínicas (LM)

Las LM pertenecen a dos grandes familias según sea el actinomiceto de cuya fermentación provienen: avermectinas y milbemicinas (Figura 9). Presentan una

compleja estructura química correspondiente a una LM de 16 miembros similar a la de los antibióticos macrólidos (pero sin efecto bacteriano), unida a un grupo benzofurano (C2 a C8) y a un anillo espiroquetal (C17 a C25). Son moléculas de gran tamaño con peso molecular entre 600 kDa (milbemicinas) y 800 kDa (avermectinas) (Lifschitz y col., 2002).



**Figura 9: Origen y clasificación de las lactonas macrocíclicas: avermectinas y milbemicinas. Fuente: Lifschitz y col., 2002.**

La Ivermectina (IVM) es el principal endectocida utilizado para el control de endoparásitos y ectoparásitos en los animales domésticos. Se obtiene por primera vez en el año 1979, como resultado de la fermentación bacteriana del *Streptomyces avermitilis* (Lifschitz y col., 2002). Su efecto antiparasitario se vincula a un incremento en la permeabilidad de la membrana celular por los iones de cloro (Cl<sup>-</sup>) con la consecuente hiperpolarización y parálisis de la musculatura faríngea y somática de los parásitos (Rodríguez y col., 2010).

Las propiedades fisicoquímicas de la IVM incluyen un alto peso molecular y una elevada lipofilicidad, las que le confieren características farmacocinéticas de un alto volumen de distribución, con una gran afinidad por la grasa corporal y prolongada persistencia de sus concentraciones en el organismo (Sumano y Ocampo, 2006). Estas características le otorgan la posibilidad de ser aplicadas por varias vías de administración, siendo las más recomendadas la subcutánea (SC), intramuscular (IM) y tópica (*pour-on*). El vehículo en el que se formulan estos compuestos puede

influir en su farmacocinética, principalmente en el proceso de absorción y eliminación, con sus consecuentes repercusiones en el perfil de concentraciones resultantes en el organismo y en los tejidos diana de localización del parásito.

Después de la introducción de la primer formulación aprobada de IVM en base acuosa (propilenglicol / glicerol formol 60:40), diferentes modificaciones farmacéuticas se han analizado con el fin de ampliar su actividad endectocida. Nuevas formulaciones de IVM al 1%, llamadas de larga acción y esencialmente formuladas en base a aceite, permitieron que el proceso de absorción sea más lento en el espacio SC e incrementar la persistencia de las concentraciones de IVM en los diferentes tejidos en comparación con la preparación original (acuosa). Posteriormente, en un intento de ampliar aún más el período de persistencia antiparasitaria con un único tratamiento de IVM de larga acción (LA), se formularon preparaciones farmacéuticas altamente concentrada (3,15%), las cuales se administran en bovinos a la dosis de 630 µg/kg de peso vivo (Lifschitz y col., 2007).

Dentro de estas formulaciones de IVM según el Departamento de Control de Productos Veterinarios – DILAVE (05/08/2016), encontramos distintas concentraciones para planes de erradicación, tiempos de espera en carne y tiempos de espera en leche (Tabla 1).

**Tabla 1: Distintas concentraciones de Ivermectina (IVM) con sus dosis correspondientes de uso, tratamientos para erradicarla (TTO erradicación), tiempos de espera (T. espera) en carne y leche. Fuente: MGAP.**

<b>PRINCIPIO ACTIVO</b>	<b>DOSIS</b>	<b>TTO ERRADICACIÓN</b>	<b>T.ESPERA CARNE</b>	<b>T. ESPERA LECHE</b>
<b>IVM 1%</b>	1ml/50 kg	21 días	35-48 días (*)	No lactación
<b>IVM 1,1%</b>	1ml/50 kg	21 días	35-42 días (*)	No lactación
<b>IVM 3,15%</b>	1ml/50 kg	45 días	122 días	No lactación

(\*) Rango en el que oscilan los distintos productos comerciales de IVM al 1% y 1,1% del listado del DILAVE.

## 2.2. Evaluación de la eficacia terapéutica

En nuestro país la DILAVE (Departamento de Parasitología) es el organismo responsable de comprobar la eficacia parasitológica que se brinda en el dossier al momento de registro de un producto veterinario, rigiéndose por el Decreto 160/997 del 21 de Mayo de 1997, el cual exige que todos los productos ectoparaciticidas deban cumplir con ciertos requisitos para su aprobación y posterior uso en la campaña de lucha contra *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Esto último se realiza, a través de la prueba de establo la cuál brinda información objetiva y comparable de la eficacia y poder residual de un ectoparasiticida (Cuore y col., 2008).

Dentro de las formulaciones acaricidas aprobadas y utilizadas en la campaña oficial de lucha contra la garrapata, distintas formulaciones 3,15% LA de Ivermectina cumplen con las exigencias de presentar un porcentaje mínimo de eficacia en la prueba de establo del 95% en el ciclo parasitario y una exigencia en la eficacia residual absoluta (Cuore, 2013). Entendiendo como residualidad al período transcurrido entre la administración de una dosis terapéutica y el momento en el cual se re-establece una infección parasitaria posterior (Lifschitz y col., 2007). Su cálculo se debe hacer cuando las garrapatas están plenamente ingurgitadas; a los días transcurridos del tratamiento se le debe restar 21 días correspondientes al ciclo parasitario.

En relación a la eficacia es importante destacar dos conceptos. Se entiende por Eficacia Relativa del tratamiento, a la cantidad de días que se tarda en alcanzar el rango de 99-100% de eficacia parasitológica, referido al grupo testigo en los primeros días post tratamiento en la cual se evalúa la eficacia garrapaticida en el estadio adulto. El índice de reproducción (IR) en el período anteriormente descrito se caracteriza por ser bajo, lo cual indica la presencia de algunas garrapatas viables con baja postura de huevos y/o bajo porcentaje de eclosión, existiendo por lo tanto un mínimo riesgo de diseminar parásitos con el movimientos de animales. A diferencia del concepto Eficacia Absoluta del tratamiento, el cual se refiere a la cantidad de días en alcanzar 100% de eficacia parasitológica, criterio de “Riesgo Epidemiológico Cero” en encontrar garrapatas viables en los primeros días post tratamiento. Este período se caracteriza a diferencia del anterior, por presentar un

índice de reproducción de cero al no haber garrapatas, o porque estas no ovipositan o no eclosionan los huevos depositados (Cuore, 2008). El concepto residualidad o persistencia antiparasitaria adquirió una gran importancia clínica después del descubrimiento y del desarrollo comercial de las avermectinas y milbemicinas (Lifschitz y col., 2007).

Para el diagnóstico de sensibilidad de las garrapatas a los acaricidas tenemos métodos *in vitro* y métodos *in vivo*. En la actualidad las técnicas disponibles *in vitro* se basan en bioensayos y se realizan tanto en parásitos adultos (técnica de Dummond, 1973) como en larvas (técnica de Stone y Haydock, 1962); ambas técnicas validadas por la FAO (2003); permiten hacer un diagnóstico orientativo del perfil de resistencia desarrollada a campo (Cuore, 2013).

No obstante, en nuestro país y en la región la prueba de establo es considerada como la prueba oficial a utilizar en el registro y/o evaluación de los productos comerciales endectocidas (Australia, Argentina, México, Brasil y EE.UU) (Cuore y col., 2008). En dicha prueba se utiliza una cepa de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, "Mozo", originaria del Departamento de Cerro Largo, la cual desde el año 1973 es mantenida y cultivada en el laboratorio, sin ser presionada por exposición a los acaricidas y libres de hemoparásitos; y se caracteriza por ser sensible a los acaricidas registrados actualmente.

El método *in vivo*; la prueba de establo (Wharton y col., 1970) se la considera una metodología definitoria y no de carácter orientativo. Como contrapartida, es una técnica muy costosa por las instalaciones requeridas y el mantenimiento de los animales como reactivo biológico. Según el principio activo y la vía de aplicación empleada la técnica tendrá una evaluación distinta. En baños de inmersión tiene una duración mínima cercana a los 50 días la permanencia de bovinos en los boxes de prueba; (test *in vivo*) y 45 días más en el laboratorio para efectuar el estudio reproductivo de las garrapatas recolectadas (test *in vitro*), lo que insume un tiempo total cercano a 95 días para obtener el resultado definitivo (Cuore, 2013). En el caso de la evaluación de las formulaciones de lactonas macrocíclicas de larga acción (inyectables), el período del estudio se prolonga aproximadamente a los 4 meses de evaluación (Decreto N°326/013).

## **OBJETIVO GENERAL**

Convalidar el modelo de infestación artificial de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y determinar la eficacia garrapaticida de una formulación de Ivermectina de larga acción (IVM 3,15%), tras su administración subcutánea en bovinos parasitados artificialmente con la cepa de referencia (Cepa *Mozo*).

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

Convalidar el modelo de infestación en bovinos parasitados artificialmente con una cepa de referencia (Cepa *Mozo*) del género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sensible a Ivermectina.

Comprobar la eficacia garrapaticida de una formulación de larga acción (LA) de Ivermectina (630 µg/kg; 3,15% LA; subcutánea) en el ciclo biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, en bovinos parasitados artificialmente con la cepa de referencia (Cepa *Mozo*).

Determinar la eficacia residual de una formulación de larga acción (LA) de Ivermectina (630 µg/kg; 3,15% LA; subcutánea) en bovinos parasitados artificialmente con la cepa de referencia (Cepa *Mozo*) del género *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Lugar de trabajo, instalaciones y animales:

La fase de campo y laboratorio se realizaron en el campo experimental de la DILAVE “Miguel C. Rubino”, 34.8°Lat. Sur; 56° Long. Oeste, Departamento de Montevideo. El mismo contaba con instalaciones adecuadas para el manejo de los animales, disponiendo para tal fin de boxes individuales techados (Figura 10).



Figura 10: Instalaciones para alojar bovinos en condiciones controladas para evaluación de garrapaticidas de la DILAVE “Miguel C. Rubino”

Se utilizaron 10 bovinos (*Bos taurus*), raza Hereford sin exposición previa a una infección por garrapata. Los animales fueron criados en el campo de cría de la DILAVE (Dpto. de Tacuarembó, península Cardozo) en condición de libres de garrapata y sin contacto previo a tratamientos con acaricidas. Quince días previos a ingresar a los boxes individuales definitivos, los animales permanecieron en una etapa de adaptación, en donde recibieron una sanidad básica (desparasitación con Ricobendazole e inmunización para prevenir las Clostridiosis) y un cambio progresivo en su alimentación (la cual se mantuvo durante todo el ensayo en base a ración, alfalfa pelleteada y agua *ad libitum*).

### 2. Diseño experimental:

#### *Animales*

Los animales experimentales fueron ubicados al azar en boxes individuales (box 1 al 10), asignando del box 1 al 4 los animales controles (grupo control, sin tratamiento

farmacológico, n=4) y del box 5 al 10 los animales tratados (grupo tratado, con tratamiento farmacológico, n=6). Al momento del tratamiento, se determinó en forma individual el peso vivo ( $168 \pm 9,5$  kg) y la Condición Corporal de los animales mediante un sistema que clasifica subjetivamente (en escala de 1 a 5) según la apreciación visual y palpación manual de su nivel de reservas corporales (Bavera y Peñafort, 2005).

### Infestación

El acto de infestación consistió en depositar en el dorso del animal 100 mg de larvas de cepa *Mozo* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Peso equivalente aproximadamente a 2000 larvas con cuatro semanas de edad.

El proceso de infestación se inició en todos los animales 25 días previos al tratamiento (-D25), con una frecuencia de dos veces por semana, la cual se continuó hasta el día 53 post-tratamiento (total de infección 78 días), para asegurar un buen grado de infestación y que al momento del tratamiento farmacológico (D0) estuvieran presente los tres estadios parasitarios (larva, ninfa y adulto) (Figura 11). La metodología empleada fue la descrita en el protocolo del Departamento de Parasitología de la DILAVE “Miguel C. Rubino” (Cuore, 2013).

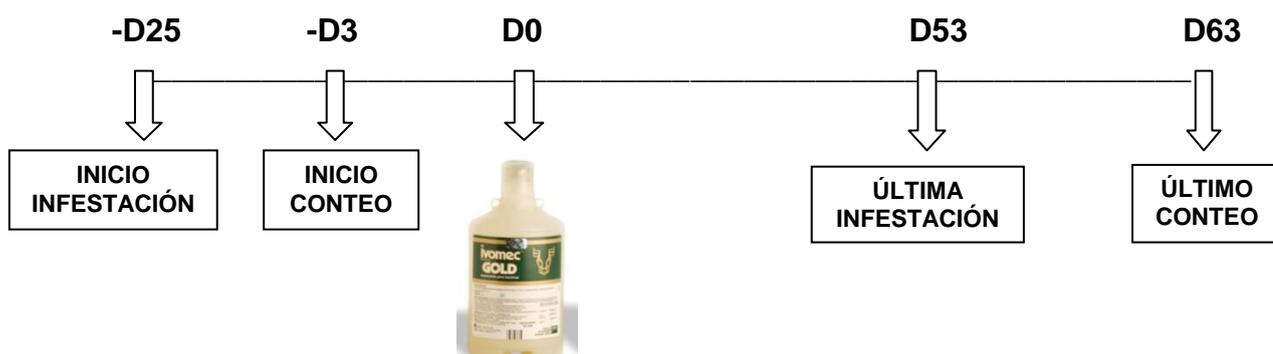


Figura 11: Diseño experimental del ensayo: el proceso de infestación comenzó 25 días previos al tratamiento (D0), y continuó hasta el día 53. Con una frecuencia de dos veces por semana, aplicando en el dorso del animal 100 mg de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (cepa *Mozo*). Tratamiento D0: Ivermectina 630  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 3,15% de larga acción, aplicación subcutánea. El conteo de garrapatas fue diario, comenzando 3 días previos al tratamiento hasta el día 63.

## Tratamiento

El día 24/02/2015 (D0) (Figura 12) se dosificó por vía subcutánea con IVM en dosis única al grupo tratado (n=6) con una formulación comercial de IVM (630 µg/kg; 3,15% LA; Ivomec GOLD®; Laboratorio Merial-Brasil). El producto utilizado es considerado el de referencia (primer registro de una formulación LA, 1999) y que en la actualidad se encuentra comercialmente aprobado para su utilización en la campaña contra la garrapata.



**Figura 12: Administración subcutánea de Ivomec GOLD® (630 µg/kg; 3,15% larga acción [Laboratorio MERAIL-Brasil]) en bovinos.**

De acuerdo a los protocolos establecidos en la DILAVE, la concentración del producto utilizado en el presente estudio fue verificado por el Departamento de Control de Productos Veterinarios y la Sección de Evaluación Química, dando como resultado que cumplía con la concentración de principio activo declarada en el registro.

### 3. Obtención de muestras:

#### 3.1. Muestras Parasitológicas

Diariamente (-D3 a D63) se realizó la limpieza de cada box individual y por arrastre se colectaron las garrapatas caídas e ingurgitadas por box en canastas individuales provistas con un fondo de rejilla de menor diámetro que la hembra adulta (Figura 13).



Figura 13: Diseño de las canastas para la colecta de garrapatas, anexas a los boxes

El total de garrapatas presentes en cada box se las acondicionó (lavado con agua y secado) y se registró la cantidad presente y peso total de las mismas. Del total de garrapatas colectadas por box, se tomó una alícuota al azar de 20 *teleoginas* (o el número disponible si la cantidad era inferior) y se acondicionó en cajas de Petri individuales por box y día de colecta, en estufa a temperatura de 27°C y más de 80% de humedad (previo a incubarlas se registró cantidad y peso de las garrapatas) (Figura 14).



Figura 14: Secado, pesado de las *teleoginas* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* colectadas diariamente y almacenamiento en estufa.

A los 14 días de iniciada la incubación se retiró las *xenoginas* (Figura 15), se registró el peso de las masas de huevos depositados y se incubó durante 25 días más para determinar el porcentaje de eclosión de la masa de huevos.



Figura 15: *Xenoginas* y pesaje de huevos de las *teleoginas* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* colectadas 14 días previos.

#### 4. Análisis de Datos

##### 4.1. Estudios Parasitológicos:

Para el cálculo del Índice de fertilidad (IF), Índice de Reproducción (IR) y Porcentaje de Control (C%) se aplicaron las formulas propuestas por Dummont en 1967 (citado por Cuore y col., 2008). Los datos fueron considerados primero de forma individual, para luego promediarlos por grupo.

- Índice de Fertilidad (IF)

$$IF = \frac{\text{peso de los huevos depositados (g)}}{\text{peso de las hembras incubadas (g)}}$$

- Índice de Reproducción (IR)

$$IR = \frac{N^{\circ} \text{ de teleoginas caídas}(n) \times \text{gramos de huevo}(g)}{N^{\circ} \text{ de teleoginas incubadas}(n)} \times \% \text{ de eclosión}$$

- Porcentaje de Control (%C)

$$\%C = \frac{\sum IR \text{ de testigos} - \sum IR \text{ de tratados}}{\sum IR \text{ de testigos}} \times 100$$

Para determinar la eficacia del tratamiento en el ciclo parasitario, se consideraron agrupados los primeros 7 días posteriores al tratamiento para evaluar la eficacia del acaricida sobre las formas parasitarias adultas, entre los días 8 al 14 se evaluó el efecto sobre ninfas y entre los días 15 al 22 la acción sobre las larvas parasitarias.

Para determinar la persistencia del tratamiento (días), la infestación se continuó hasta que se registró el día en que la primer *teleogina* fue recolectada. Considerando el día de caída, al cual se le descontó los 21 días del ciclo parasitario para obtener el tiempo de residualidad absoluta del producto sobre las larvas infectantes. Período considerado para determinar la frecuencia de tratamientos en predios sujetos a control o erradicación.

#### 4.2. Estudios Estadísticos:

Los datos cuantitativos fueron analizados de acuerdo a técnicas estadísticas descriptivas. Los parámetros parasitológicos en los grupos experimentales se promediaron y expresaron como media  $\pm$  desvío estándar (DS) o coeficiente de variación (DS/media x 100). Para verificar diferencias entre los valores se realizó un análisis no paramétricos (Wilcoxon) considerando un nivel de confianza del 5% (P<0.05). Para el ajuste estadístico de los datos se utilizó el software GraphPad Prism (Versión 6.01, 2012).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la Figura 16, se observa la evolución en el recuento de garrapatas caídas por día en los grupos control y tratado. La caída de garrapatas y su comportamiento reproductivo en el grupo control, presentaron valores de acuerdo al comportamiento habitual de la cepa *Mozo*, según datos históricos en la DILAVE, lo cual avala la metodología de infestación utilizada en el presente estudio.

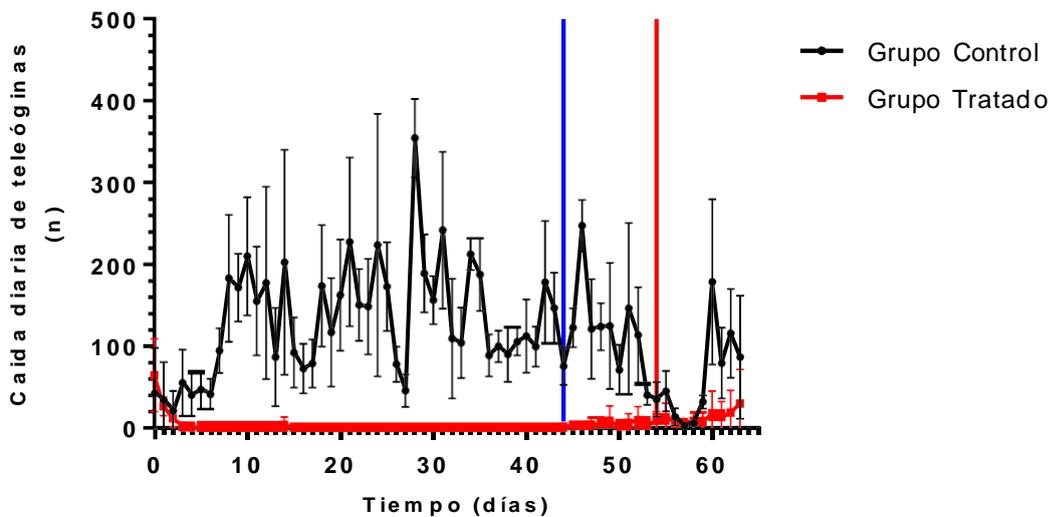


Figura16: Evolución del recuento de garrapatas post dosificación Ivermectina (630  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 3,15% larga acción, aplicación subcutánea) en los grupos Tratado y Control. La línea azul indica el inicio en la caída de *teleoginas* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el día 44 post tratamiento. El período comprendido entre la línea azul y roja indica período cuando la eficacia garrapaticida es menor al 100%. Mientras que la línea punteada en rojo indica cuando la eficacia garrapaticida es inferior al 95%.

Las líneas punteadas en la figura 16 hacen referencia sobre el Poder Residual. La línea punteada en azul nos marca el momento en el cual la eficacia deja de ser del 100%, debido al comienzo en la caída de algunas *teleoginas* (D44). Progresivamente va aumentando la caída de *teleoginas* mientras que el poder residual va disminuyendo, como indica la línea punteada en rojo donde la eficacia es menor al 95%.

En relación a la Eficacia Parasitológica durante el tratamiento podemos decir que el período determinado para la Eficacia Relativa y la Absoluta coinciden, ya que en el tercer día de iniciado el tratamiento se logra el 99,9% de eficacia, llegando al 100% el cuarto día (como indica la tabla N°2).

La eficacia relativa, es decir la cantidad de días que se demoró en alcanzar el 99-100% de eficacia (referido al grupo testigo en los primeros días post tratamiento en el cual se evaluó la eficacia garrapaticida en el estadio adulto) fue alcanzada el día tres. Durante este período a pesar de los días con caída de garrapatas luego del tratamiento el Índice de Reproducción fue bajo (presencia de garrapatas viables, pero que presentaron una baja postura de huevos y/o porcentaje de eclosión), existiendo por lo tanto un riesgo mínimo de diseminar parásitos con el movimiento de animales. Mientras que la eficacia absoluta (cantidad de días en alcanzar valores del 100%) fue lograda a partir del cuarto día; donde el riesgo epidemiológico fue cero, no se encontraron garrapatas viables (ver tabla N°2).

**Tabla 2: N° de *Teleoginas*, Peso de las Hembras incubadas (g), Peso huevos producidos (g), Porcentaje de Eclosión (%), Eficacia (%) y Coeficiente de Variación (CV%) de las garrapatas caídas de bovinos asignados al grupo Tratado con Ivermectina (630 µg/kg, 3,15% larga acción, aplicación subcutánea) en los primeros cuatro días post tratamiento.**

DÍAS	N° DE TELEOGINAS	PESO DE HEMBRAS INCUBADAS (g)	GRAMOS DE HUEVOS (g)	PORCENTAJE DE ECLOSIÓN (%)	EFICACIA (%)	CV (%)
1	170	17,0	3,07	60	85,1	(8,20)
2	61	8,96	0,86	54	96,7	(4,00)
3	19	0,71	0,06	10	99,9	(0,005)
4	3	0	0	0	100	(0)

La figura 17 representa el comportamiento en la caída de las garrapatas en los primeros quince días post tratamiento en el grupo tratado, al cuarto día de administrada la IVM 3,15% LA se observó un marcado descenso en la caída de garrapatas (línea verde) (exceptuando el box 6). Esto coincide con otros ensayos (Cuore y col., 2008) donde la interrupción de la caída de *teleoginas* post tratamiento es de tres a seis días.

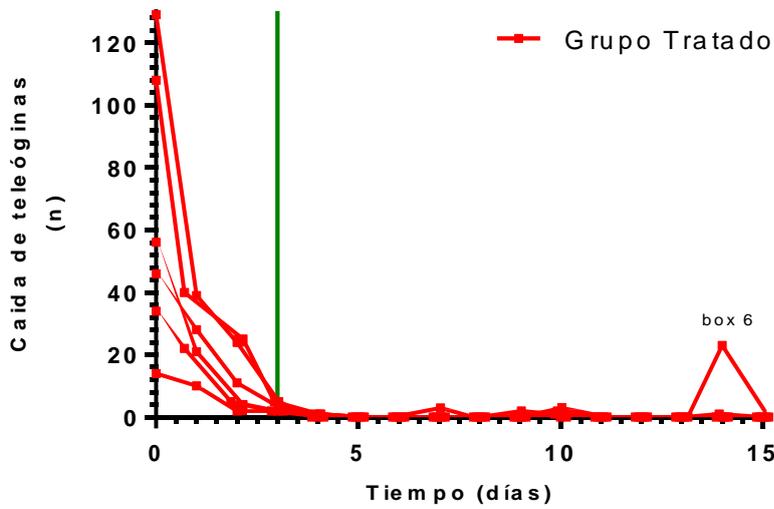


Figura 17: Evolución del recuento de garrapatas en los primeros 15 días post dosificación Ivermectina (630  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 3,15% larga acción, aplicación subcutánea) en el grupo Tratado. La línea verde indica el fin de la caída de *teleoginas* de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en 5/6 boxes. La caída en el box 6 hasta el día 14 se indica en la gráfica.

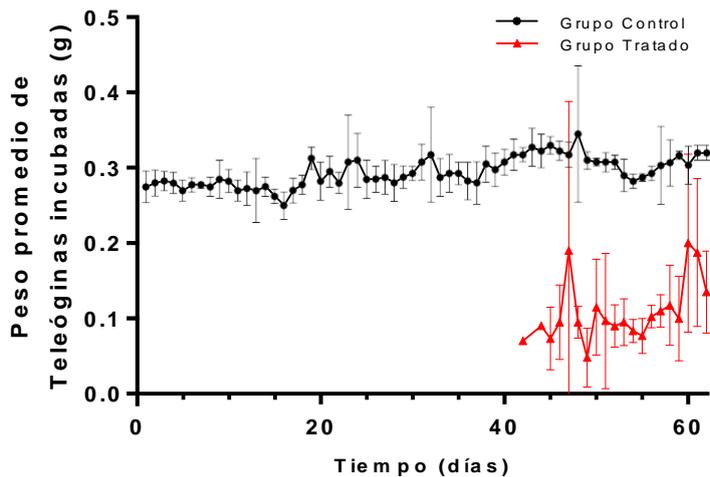


Figura 18: Evolución del peso de las *Teleoginas* incubadas caídas de bovinos asignados al grupo Control (sin tratamiento farmacológico) y Tratado (Ivermectina, 630  $\mu\text{g}/\text{kg}$ , 3,15% larga acción, aplicación subcutánea).

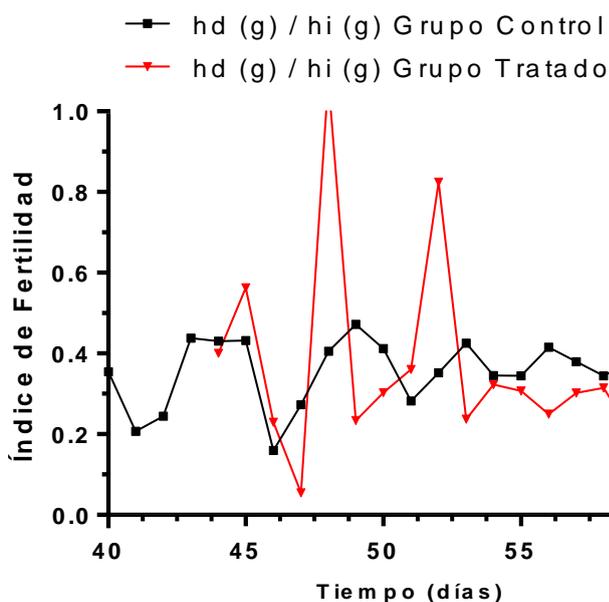


Figura 19: Evolución del Índice de Fertilidad (peso Huevos depositados [hd (g)] / peso Hembras incubadas [hi (g)]) de las *Teleoginas* incubadas caídas de bovinos, asignados al grupo Control (sin tratamiento farmacológico) y Tratado (Ivermectina, 630 µg/kg, 3,15% larga acción, aplicación subcutánea).

En la Figura 18, se observa la evolución del peso de las *teleoginas* incubadas del grupo control y tratado. Vemos como las del grupo control se mantuvieron en el rango de 0,25 a 0,33g durante todo el ensayo; y las del grupo tratado tuvieron un peso significativamente inferior ( $p < 0,01$ ) a las del grupo control, entre 0,08 a 0,2g, desde el día cuarenta y cuatro (en el que comenzaron a caer nuevamente las *teleoginas*) hasta el último día de conteo (Día 63). No obstante como se observa en la Figura 19, el Índice de Fertilidad (el cual fue resultado del cociente del peso de los huevos depositados sobre el peso de las hembras incubadas) se mantuvo incambiado a pesar de las diferencias de peso entre las *teleoginas* del grupo control y tratado. Si bien la IVM afectó el peso (gramos) de las *teleoginas*, no afectó su capacidad reproductiva, ovipositaron huevos de menor peso (en relación a los del grupo control), pero con un porcentaje de eclosión viable, capaz de reproducir nuevas generaciones de garrapatas (Tabla 3).

En la Tabla 3, se observa Índice de Reproducción (IR) en los grupos control y tratado, porcentaje de Eficacia (E%) y porcentaje del Coeficiente de Variación (CV%) en el grupo tratado; según las distintas etapas del ciclo parasitario de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; etapa Adulta desde el día 1 al 7, etapa Ninfal desde el día 8 al 14, etapa Larval desde el día 15 al 22 y total del ciclo, día 1 al 22.

**Tabla 3: Porcentaje de Eficacia (E%), Coeficiente de Variación (CV%) e Índice de Reproducción (IR) de los grupos Control (sin tratamiento farmacológico) y Tratado (Ivermectina, 630 µg/kg, 3,15% larga acción, aplicación subcutánea) según distintos estadios del ciclo biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos.**

Tiempo (días)	Grupos Experimentales			
	Control	Tratamiento		
	IR	E (%)	CV (%)	IR
Estadio Adulto (1-7)	[63592]	98,7	(0,64)	[782]
Estadio Ninfal (8-14)	[186690]	99,9	(0,04)	[6,00]
Estadio Larval (15-22)	[94916]	99,9	(0,04)	[0,17]
Ciclo completo 1-22	[345199]	99,7	(0,12)	[788]

De los tres estadios evolutivos de la garrapata en el ciclo parasitario, el de adulto es el que presentó menor sensibilidad a la IVM. A su vez la eficacia endectocida fue menor en esta etapa que en la etapa larval o ninfal, las cuales al estar más días en contacto con la droga tuvieron mayor posibilidad de ser expuestas a concentraciones letales. Experiencias similares fueron descritas por Nolan (1982) citado por Davey, 2002; el cual reporto una significativa sobrevida de hembras de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* los primeros dos días post tratamiento con IVM, sugiriendo una menor susceptibilidad del adulto y/o una fase de demora (latencia) donde el químico no es ingerido por la garrapata.

En la tabla 4, se documenta el Índice de Reproducción (IR) en los grupos control y tratado, porcentaje de Eficacia (E%) y porcentaje del Coeficiente de Variación (CV%) en grupo tratado, de cada día del tratamiento (Días 1 al 63).

**Tabla 4: Porcentaje de Eficacia (E%), Coeficiente de Variación (CV%) e Índice de Reproducción (IR) de los grupos Control (sin tratamiento farmacológico) y Tratado (Ivermectina, 630 µg/kg, 3,15% larga acción, subcutánea) desde el día 1 al 63 de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos.**

Grupos Experimentales				
Tiempo	Control	Tratamiento		
	IR	E (%)	CV (%)	IR
1	[4459]	85	(8)	[666]
2	[3570]	96,7	(4)	[117]
3	[10399]	99,9	(0,005)	[0]
4	[7864]	100	(0)	[0]
5	[7690]	100	(0)	[0]
6	[7973]	100	(0)	[0]
7	[21637]	100	(0)	[0]
8	[41779]	100	(0)	[0]
9	[37352]	100	(0)	[0]
10	[35532]	100	(0)	[1]
11	[19384]	100	(0)	[0]
12	[17384]	100	(0)	[0]
13	[9479]	100	(0)	[0]
14	[25781]	100	(0)	[5]
15	[14581]	100	(0)	[0]
16	[5382]	100	(0)	[0]
17	[7931]	100	(0)	[0]
18	[10322]	100	(0)	[0]
19	[10649]	100	(0)	[0]
20	[12777]	100	(0)	[0]
21	[33274]	100	(0)	[0]
22	[19755]	100	(0)	[0]
23	[22847]	100	(0)	[0]
24	[36916]	100	(0)	[0]
25	[26033]	100	(0)	[0]
26	[10468]	100	(0)	[0]
27	[4541]	100	(0)	[0]
28	[46011]	100	(0)	[0]
29	[14765]	100	(0)	[0]
30	[4363]	100	(0)	[0]
31	[13827]	100	(0)	[0]
32	[9363]	100	(0)	[0]
33	[7163]	100	(0)	[0]
34	[6549]	100	(0)	[0]
35	[4809]	100	(0)	[0]
36	[5858]	100	(0)	[0]
37	[7884]	100	(0)	[0]
38	[12915]	100	(0)	[0]
39	[11020]	100	(0)	[0]
40	[19661]	100	(0)	[0]
41	[7917]	100	(0)	[0]
42	[17647]	100	(0)	[0]
43	[26763]	100	(0)	[0]
44	[14927]	100	(0)	[2]
45	[23337]	100	(0)	[14]
46	[11277]	100	(0)	[0]
47	[7145]	100	(0)	[16]
48	[11241]	100	(1)	[41]
49	[14188]	99	(2)	[125]
50	[9895]	100	(0)	[3]
51	[9876]	100	(1)	[55]
52	[7190]	98	(4)	[145]
53	[3745]	100	(0)	[1]
54	[903]	92	(12)	[69]
55	[1551]	90	(17)	[154]
56	[485]	94	(15)	[31]
57	[13]	100	(0)	[14]
58	[115]	89	(25)	[131]
59	[4837]	98	(5)	[87]
60	[9877]	97	(6)	[307]
61	[4443]	92	(16)	[349]
62	[4873]	87	(33)	[647]
63	[15237]	90	(22)	[1522]

En el presente estudio la duración del Poder Residual presentó cierta dispersión. Estos valores oscilaron entre el día 44 hasta el día 57 post tratamiento en 5 de los 6 animales tratados, por lo que la Residualidad Absoluta, descontando los 21 días del ciclo parasitario estuvo comprendida entre 23 y 36 días. Lo cual no concuerda plenamente con el Decreto 326/013, donde la residualidad para las LM a concentración 3,15% debe tener un valor no menor a los 45 días.

Estos resultados de residualidad son inferiores a los obtenidos en las pruebas de registro oficial, en el año 1999 para Ivomec GOLD®, la cual demostró 62 días de residualidad. En el 2015, en un estudio sobre el comportamiento de dos formulaciones comerciales de IVM 3,15%, siendo una de ellas Ivomec GOLD®, la residualidad osciló entre 35 y 63 días. A nivel internacional distintas pruebas con esta misma formulación, único fabricante Merial Brasil, empleando una metodología similar pusieron en manifiesto resultados con variabilidad en la eficacia residual. En EE.UU (USDA- Edinburg, Texas) los valores de residualidad fueron de 14 días, en Argentina (Servicio Nacional de Sanidad Animal de Argentina) 23 días y en México (Centro Nacional de Parasitología Animal de México) 75 días. Debido a esta variación existe una necesidad real de estudiar en forma más detallada el efecto garrapaticida de las formulaciones comerciales en cuanto a su residualidad (Cuore y col., 2015b).

El animal del box 6 tuvo un comportamiento diferente al resto de los animales tratados (Figura 18). Hasta el día 14 post tratamiento se colectaron *teleoginas* viables, las cuales tuvieron un Índice de Reproducción considerable en la etapa Ninfal y Larval. Esta marcada diferencia en el comportamiento de la IVM LA podría tener una explicación en el hecho de que al ser una molécula lipofílica, las lactonas macrocíclicas se depositan en el tejido adiposo del bovino y esto puede contribuir en aumentar el tiempo de permanencia del principio activo (Lifschitz y col., 1999, 2000). Por lo tanto en un animal con un buen estado corporal, como lo era el animal del box 6, con una condición corporal de 3.5, grado de engrazamiento de 1 (datos no presentados), se debería esperar un perfil de distribución diferente. Lo que hace suponer que el perfil plasmático de IVM, presentó diferencias en su perfil farmacocinético (alargamiento en el proceso de absorción, distribución y eliminación). Manifestando el animal una no caída de *teleogina*, el cual se tradujo en un poder residual del 100% hasta el último día del ensayo (D63).

## CONCLUSIONES

La metodología empleada nos permitió reproducir el modelo de infestación artificial en bovinos, con una cepa de referencia (cepa *Mozo*) de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*; basándonos en el modelo de Roulston & Wilson (1964), donde los resultados pueden ser comparables en el tiempo y entre formulaciones de principios activos.

Se comprobó la eficacia Relativa y Absoluta de la Ivermectina en el tercer y cuarto día respectivamente, afectando el desarrollo parasitario en 5 de los 6 animales tratados, afectando el desarrollo de las garrapatas en todo un ciclo parasitario; comenzando a perder la eficacia residual al transcurrir los días, pero afectando las garrapatas con un menor peso, y por lo tanto una menor eficacia reproductiva y un menor porcentaje de eclosión en comparación con el grupo control, sin modificar la relación de huevos por hembra en base al índice peso de los huevos/peso de las hembras.

En cuanto al poder residual los valores obtenidos fueron menores a los establecidos en el Decreto.

*CONSIDERACIONES*, en los tratamientos garrapaticidas de campo, el bovino representa un reactivo biológico, el cual presenta variabilidad en el peso, condición corporal, sexo, raza y estado fisiológico.

La presente tesis, pone en manifiesto la necesidad de contar con mayores elementos o estudios integrados de corte fármaco-parasitológico, que nos permitan evaluar y predecir el comportamiento individual de los diferentes productos garrapaticidas en diferentes situaciones reales de uso práctico.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Bavera, G.; Peñafort, C. (2005). Cursos de Producción Bovina de Carne, FAV UNRC. Disponible en: [http://www.produccionbovina.com/informacion\\_tecnica/cria\\_condicion\\_corporal/52-condicion\\_corporal\\_cc.pdf](http://www.produccionbovina.com/informacion_tecnica/cria_condicion_corporal/52-condicion_corporal_cc.pdf). Fecha de consulta: 29/09/2016.
2. Cardozo, H.; Nari, A.; Franchi, M.; López, A.; Donatti, N. (1984). Estudio sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas enzoóticas del Uruguay. Veterinaria (Montevideo); 20:4-10.
3. Collins, R.; Garnett, W. (2000). Formulaciones de Liberación Prolongada de Medicamentos Anticonvulsivantes – Ventajas Farmacocinéticas Clínicas y Terapéuticas. Disponible en: <http://www.bago.com/bago/bagoarg/biblio/farma87web.htm>. Fecha de consulta: 07/10/2016.
4. Cuore, U. (2006). Resistencia a los acaricidas, manejo y perspectivas. Jornadas Uruguayas de Buiatría. 34, Paysandú, Uruguay, pp. 30-35.
5. Cuore, U. (2013). Determinación de eficacia de productos garrapaticidas. Prueba de Establo. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/gxpfiles/mgap/content/audio/source0000000014/AUD0000070000002747.pdf>. Fecha de consulta: 29/09/2016.
6. Cuore, U.; Acosta, W.; Bermúdez, F.; Da Silva, O.; García, I.; Pérez Rama, R.; Luengo, L.; Trelles, A.; Solari, M. (2015a). Tratamiento generacional de la garrapata. Aplicación de una metodología en un manejo poblacional para la erradicación de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistentes a Lactonas Macroclínicas. Disponible en: <http://www.revistasmvu.com.uy/component/content/article/80-revista-numero-198/307-tratamiento-generacional-de-la-garrapata-aplicacion-de-una-metodologia-en-un-manejo-poblacional-para-la-erradicacion-de-rhipicephalus-boophilus-microplus-resistentes-a-lactonas-macroclincas.html>. Fecha de consulta: 20/10/2016.
7. Cuore, U.; Altuna, M.; Cicero, L.; Fernández, F.; Luengo, L.; Mendoza, R.; Nari, A.; Pérez Rama, R.; Solar, M.; Trelles, A. (2012). Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población

- multiresistente de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. Veterinaria (Montevideo); 48:5-13.
8. Cuore, U.; Cardozo, H.; Trelles, A.; Nari, A.; Solari, M. (2008). Características de los garrapaticidas utilizados en Uruguay. Eficacia y poder residual. Veterinaria (Montevideo); 43:13-24.
  9. Cuore, U.; Solari, MA.; Piaggio, J.; Chelle, B.; Di Rienzo, D.; Machado, N.; Politi, P; Trelles, A; Rampoldi, O. (2015b). Comportamiento biológico y farmacocinético de dos formulaciones comerciales de ivermectina 3,15% en bovino. Veterinaria (Montevideo); 52:13-22.
  10. Davey, R.; Miller, J.; George, J. (2002). Efficacy of Macrocytic Lactone Endectocides Against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Infested Cattle Using Different Pour - On Application Treatment Regimes. Disponible en: [https://www.researchgate.net/publication/11106212\\_Efficacy\\_of\\_Macrocytic\\_Lactone\\_Endectocides\\_Against\\_Boophilus\\_microplus\\_Acari\\_Ixodidae\\_Infested\\_Cattle\\_Using\\_Different\\_Pour-On\\_Application\\_Treatment\\_Regimes](https://www.researchgate.net/publication/11106212_Efficacy_of_Macrocytic_Lactone_Endectocides_Against_Boophilus_microplus_Acari_Ixodidae_Infested_Cattle_Using_Different_Pour-On_Application_Treatment_Regimes). Fecha de consulta: 15/11/2016.
  11. Davey, R.; Pound, J.; Miller, J.; Klavons, J. (2010). Therapeutic and persistent efficacy of a long-acting (LA) formulation of ivermectin against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and sera concentration through time in treated cattle. Vet Parasitol; 169:149-156.
  12. Drummond, R.; Ernest, S.; Trevino, J.; Gladney, W.; Graham, O. (1973). *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory test of insecticides. J Econ Entomol; 66:130-133.
  13. Errico, F.; Nari, A.; Cuore, U.; Mendoza, R.; Suárez, H.; Mesa, P.; Fernández, S.; Sosa, E.; Salada, D.; Saporiti, D. (2009). Grupo técnico Garrapata (MGAP/DIGESEGA); Rev Plan Agrop; 131:42-47.
  14. FAO (2003). Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-y4813s.pdf>. Fecha de consulta: 28/09/2016.
  15. Fiel, C.; Nari, A. (2013). Enfermedades Parasitarias de Importancia Clínica y Productiva en Rumiantes. Buenos Aires, Hemisferio Sur, 752p.

16. Holdsworth, P.; Kemp, D.; Green, P.; Peter, R.; De Bruin, C.; Jonsson, N.; Letonja, T.; Rehbein, S.; Vercruyse, J. (2006). World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. *Vet Parasitol*; 136:29-43.
17. Lifschitz, A.; Virkel, G.; Ballent, M.; Sallovitz, J.; Imperiale, F.; Pis, A.; Lanusse, C. (2007). Ivermectin (3,15%) long-acting formulations in cattle: absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Vet Parasitol*; 147:303-310.
18. Lifschitz A.; Virkel, G.; Imperiale, F.; Pis, A.; Lanusse, C. (2002). Fármacos endectocidas: avermectinas y milbemicinas. En: Botana, L.; Landoni, F.; Matín-Jiménez, T. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Madrid, McGraw-Hill-Interamericana, pp. 545-558.
19. Lifschitz, A.; Virkel, G.; Pis, A.; Imperial, F.; Sanchez, S.; Alvarez, L.; Kujanek, R.; Lanusse, C. (1999). Ivermectin disposition kinetics after subcutaneous and intramuscular administration of an oil-based formulation to cattle. *Vet Parasitol*; 86:203-215.
20. Lifschitz, A.; Virkel, G.; Sallovitz, J.; Sutra, J.; Galtier, P.; Alvinerie, M.; Lanusse, C. (2000). Comparative distribution of ivermectin and doramectin to parasite location tissues in cattle. *Vet Parasitol*; 87:327-338.
21. Nari, A. (2005). Estado actual de la resistencia de *Boophilus microplus* en América Latina y el Caribe. *Perspectivas de aplicación del control integrado*. Roma, FAO, 15p.
22. Nuñez, J.; Muñoz, M.; Moltedo, H. (1987). *Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno, Buenos Aires, Hemisferio Sur, 184p.
23. Pico, E. (2009). Ectoparasitocidas. En: Rubio, M.; Boggio, J. *Farmacología Veterinaria*. 2a ed., Córdoba, Universidad Católica de Córdoba, pp 641-658.
24. Rodríguez, R.; Arieta, R.; Pérez, L.; Rosado, J.; Ramírez, G.; Basto, G. (2010). Uso de lactonas macrocíclicas para el control de garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. Disponible en: [http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0301-732X2010000300002](http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0301-732X2010000300002). Fecha de consulta: 27/09/2016.
25. Roulston, W.; Wilson, J. (1964). Chemical control of the cattle *B. microplus* (can). *Bull Entol*; 55:617-635.

26. Solari, M.; Nari, A.; Cardozo, H. (1992). Impact of Babesia Bovis and Babesia Bigemina on the production of beef cattle in Uruguay. Disponible en: [http://www.scielo.br/pdf/mioc/v87s3/vol87\(fsup3\)\\_147-153.pdf](http://www.scielo.br/pdf/mioc/v87s3/vol87(fsup3)_147-153.pdf). Fecha de consulta: 20/10/2016.
27. Stone, B.; Haydock, K. (1962). A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can). Bull Entomol Res; 53, Part (3):563-578.
28. Sumano, L.; Ocampo, C. (2006). Farmacología Veterinaria. 3a ed., México, MacGraw- Hill Interamericana, 1082p.
29. Uruguay. Decreto N° 160/997 de 3 de Junio de 1997. Aprobación del Marco Regulatorio sobre Productos Veterinarios en el MERCOSUR. Disponible en: <http://www.impo.com.uy/bases/decretos/160-1997/4>. Fecha de consulta: 28/10/2016.
30. Uruguay. Decreto N° 326/013 de 14 de Octubre de 2013. Adecuación de los Registros de Productos Garrapaticidas que contengan Lactonas macrociclicas. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/decretos/326-2013/2>. Fecha de consulta: 28/10/2016.
31. Uruguay. Ley N° 3606 de 26 de Abril de 1910. Ley de Policía Sanitaria Animal. Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/leyes/3606-1910>. Fecha de consulta: 28/10/2016.
32. Uruguay. Ley N° 18268 de 25 de Abril de 2008. Lucha contra la Garrapata *Boophilus microplus* (garrapata común del bovino). Disponible en: <https://www.impo.com.uy/bases/leyes/18268-2008/20>. Fecha de consulta: 28/10/2016.
33. Warthon, R.; Roulston, W.; Utech, K.; Kerr, J. (1970). Assessment of the efficiency of acaricides and their mode of application against the cattle tick *Boophilus microplus*. Aust J Agr Res; 21:985-1006.
34. Ysamat, J. (2004). Tratamientos de las Parasitosis en Vacunos de Carne. Sitio Argentino de Producción Animal. Disponible en: [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/parasitarias/parasitarias\\_bovinos/36-tratamientos\\_parasitosis.pdf](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/parasitarias_bovinos/36-tratamientos_parasitosis.pdf). Fecha de consulta: 27/09/2016.