

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**ESTANDARIZACIÓN DEL TEST DE INMERSIÓN DE LARVAS MODIFICADO  
COMO HERRAMIENTA DE DIAGNÓSTICO DEL PERFIL DE SENSIBILIDAD  
PARA *RHIPICEPHALUS MICROPLUS* FRENTE A IVERMECTINA**

**por**

**Br. Lucía VIDAL REGINA**

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

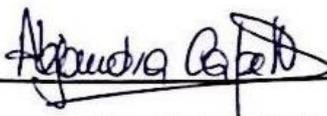
**MODALIDAD: Trabajo Experimental**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY**

**2021**

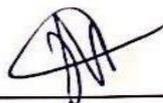
## PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:



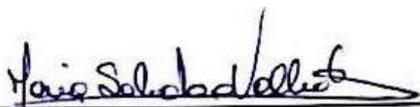
Dra. Alejandra Capelli

Segundo miembro:



Dr. Diego Robaina

Tercer miembro:



Dra. Soledad Valledor

Cuarto miembro:

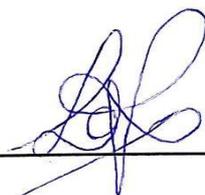


Dr. Gonzalo Suárez

Fecha:

14 de Diciembre de 2021

Autores:



Br. Lucía Vidal Regina

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia, principalmente a mis padres, mi hermano y mis abuelos que me acompañaron y apoyaron en el día a día durante los años de estudio.

A mi tía abuela, Dra. Ana Dorado, razón por la cual elegí esta carrera.

A mis amigos y mis compañeros de carrera, por siempre estar presentes y compartir este proceso conmigo.

A mi tutor, Dr. Diego Robaina, y al co-tutor, Dr. Gonzalo Suárez por guiarme en este proceso y contribuir en mi formación académica.

A los integrantes del Área de farmacología.

Al Departamento de Parasitología, DILAVE “Miguel C. Rubino” por brindarnos el reactivo biológico utilizado como objeto de estudio.

A la Facultad de Veterinaria.

A la Universidad de la República.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>PAGINA DE APROBACION .....</b>	<b>2</b>
<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>3</b>
<b>LISTA DE CUADROS Y FIGURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>6</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
Ciclo de vida de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> .....	9
Ciclo de Epidemiología de <i>R. microplus</i> en Uruguay .....	10
Campaña sanitaria .....	11
Métodos de control contra <i>R. microplus</i> .....	13
Otras alternativas de control no-químico .....	14
Selección de hospederos resistentes .....	14
Control físico.....	15
Control biológico.....	15
Lactonas macrocíclicas en el control de <i>R. microplus</i> .....	16
Mecanismo de acción de las Lactonas macrocíclicas .....	17
Métodos para determinar la eficacia de compuestos químicos sobre <i>R. microplus</i> .....	19
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO.....</b>	<b>21</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
Actividades específicas.....	22
Reactivo biológico .....	22
Técnica de inmersión (test de inmersión en jeringas) .....	22
Ensayos de estandarización de la técnica .....	23
Análisis estadístico.....	24
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>25</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>31</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....</b>	<b>32</b>

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Representación del ciclo parasitario de <i>R. microplus</i> .....	10
<b>Figura 2.</b> Esquema generacional de <i>R. microplus</i> .....	11
<b>Figura 3.</b> Delimitación geográfica entre zonas de control y zonas libres de <i>R. microplus</i> .....	12
<b>Figura 4.</b> Distribución geográfica de los puestos sanitarios.....	13
<b>Figura 5.</b> Esquema Tratamiento Generacional de la Garrapata .....	14
<b>Figura 6.</b> representación esquemática de la división de las lactonas macrocíclicas.....	16
<b>Figura 7.</b> Representación de la forma química de la ivermectina.....	17
<b>Figura 8.</b> Mecanismo de acción de las Lactonas Macrocíclicas .....	17
<b>Figura 9.</b> Mecanismo de acción de las Lactonas Macrocíclicas .....	18
<b>Figura 10.</b> Jeringas preparadas y cargadas con larvas luego de realizar la inmersión, previo a la incubación .....	14
<b>Figura 11.</b> Curva dosis-respuesta por triplicado para larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> frente a concentraciones crecientes de Ivermectina (0 - 25 ppm) empleando la Técnica de Inmersión en Jeringas .....	26
<b>Figura 12.</b> Curva dosis-respuesta para larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> frente a concentraciones crecientes de Ivermectina (0 - 25 ppm) empleando la Técnica de Inmersión en Jeringas .....	27
<b>Tabla 1.</b> Mortalidad de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> de la cepa Mozo tras 24 horas de incubación en jeringas para comprobar el efecto base de la técnica de Inmersión de Larvas en Jeringas (SIT, en inglés) .....	25
<b>Tabla 2.</b> Mortalidad de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> (cepa Mozo) empleando técnica de inmersión en jeringas, en diluyente en 3 y 5 minutos para determinar el tiempo de inmersión .....	25
<b>Tabla 3.</b> Ajuste del modelo log-logístico para la mortalidad de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> (cepa Mozo) frente a concentraciones crecientes de Ivermectina (0 - 25 ppm) empleando la técnica de Inmersión en Jeringas.....	27
<b>Tabla 4.</b> Ajuste del modelo log-logístico para la mortalidad de larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> frente a concentraciones crecientes de Ivermectina (0 - 18,4 ppm) empleando la Técnica de Inmersión en Jeringas .....	28

## RESUMEN

La siguiente tesis fundamenta la estandarización de una técnica de inmersión de larvas empleando jeringas como herramienta para el diagnóstico de la sensibilidad de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a ivermectina. Para llevarla a cabo se utilizaron larvas de garrapatas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* pertenecientes a la cepa Mozo suministrada por el DILAVE, y como principio activo a validar se utilizó a la Ivermectina perteneciente a la familia de Lactonas Macrocíclicas. Se implementaron ensayos los cuales pretendieron determinar el efecto de la técnica propiamente dicha. En primer término, se ajustó el tiempo de inmersión (5 minutos) y las concentraciones de ivermectina utilizadas (0,143 a 18,4 ppm). En segundo término, se realizaron repeticiones para la construcción de las curvas dosis-respuesta y ajuste del modelo (n=8, Modelo Lineal Generalizado). Del ajuste del modelo se determinó un ED<sub>50</sub> (2,30 - 2,90) y una pendiente (1,02 - 1,14). Por último, la ED<sub>99</sub> se estableció en un rango del 81,61 - 222,66 ppm. Se concluye que la técnica (SIT) presenta un ajuste adecuado, siendo un modelo de dosis-respuesta para evaluar la sensibilidad a Ivermectina de las garrapatas del género de *Rhipicephalus microplus* en condiciones las condiciones evaluadas.

## SUMMARY

The following study supports the standardization of the larval immersion test using syringes technique as a diagnostic tool for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sensitivity to Ivermectin. In order for this to be carried out, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae belonging to the Mozo strain provided by DILAVE were used as the biological reagent, and ivermectin, which belong to the Macrocyclic Lactones family was used as the active ingredient. Trials were implemented in order to determine the effect of the technique itself. In the first place, the immersion time (5 minutes) and the ivermectin concentrations (0,143 a 18,4 ppm), were adjusted. In the second place, further trials were conducted to plot the doses-response curve and adjust the graph (n=8, Generalized Lineal Model). From the results of the adjusted graph, an ED<sub>50</sub> (2,30 - 2,90) and a slope (1,02 - 1,14), were determined. Finally, the ED<sub>99</sub> was established, located between an average of 81.61 and 222.66ppm.

It is concluded that the technique (SIT) presents an adequate adjustment, being a dose-response model to evaluate the sensitivity of the ticks of the genus of *Rhipicephalus microplus* to Ivermectin under the evaluated conditions.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades parasitarias en vacunos son patologías de gran importancia, debido al efecto negativo directo que producen sobre la sanidad animal. Los parásitos como la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (*R. microplus*) presentan diferentes acciones patógenas sobre los hospedadores, tales como hematofagia, ruptura de vasos capilares y linfáticos, reacciones alérgicas y lesiones necróticas tisulares con infecciones secundarias, las cuales repercuten negativamente en la producción del animal afectado, también tienen un importante rol en la transmisión de hematozoarios. 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). Según estimaciones realizadas por la DGSG (Dirección General de Servicios Ganaderos), MGAP (Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca), en 2005, se calcula que el impacto de la garrapata *R. microplus* y las enfermedades asociadas, económicamente asciende a la suma de 45 millones de dólares americanos anuales, en el país.

*R. microplus* tiene una distribución mundial, abarcando las zonas tropicales y subtropicales principalmente. Es endémica en India, también se distribuye por otras partes de Asia tropical y subtropical, el noreste de Australia, el sudeste de África, México y varios países de América central. En Estados Unidos logró erradicarse. En América del sur se encuentra en países como Colombia, Brasil, Argentina y Uruguay (Center for Food Security and Public Health, 2007).

En Argentina se distribuye por todo el norte del territorio, donde se llevó a cabo una exitosa campaña de erradicación, liberando aproximadamente 29 millones de hectáreas. Pero esto se ve constantemente con un riesgo latente de reinfestación, debido a los factores climáticos y de manejo (Fiel y Nari, 2013).

Según Bentancur y Giraldo-Ríos (2018), las garrapatas afectan el 80% del ganado mundial. La garrapata descrita como la de mayor impacto económico es *R. microplus*, a consecuencia de su amplia distribución y facilidad de adaptación a diferentes ambientes, así como su potencial reproductivo y el hecho de ser vector de otras enfermedades parasitarias (hemoparásitos).

El impacto económico puede clasificarse como directo o indirecto. El impacto directo se relaciona principalmente con los síntomas asociados a la presencia del parásito, como fiebre, anemia, aborto, reacciones anafilácticas y la disminución en la producción láctea (pudiendo llegar a reducir hasta 90 litros por lactancia por vaca) o pérdidas reproductivas (disminución de índices de preñez) y de peso (se estima que por cada hembra ingurgitada el hospedero pierde 1,37g de peso vivo) (Bentancur y Giraldo-Ríos, 2018). Estos mismos autores estiman que las pérdidas indirectas están relacionadas a las enfermedades que son transmitidas por estos hemoparásitos como también, al costo de los tratamientos para erradicación y control. En el mundo las pérdidas anuales causadas por estas garrapatas están valuadas entre USD \$13,9 y 18,7 billones, según la

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura, FAO (2003), las pérdidas por animal por año se corresponden con USD \$7,3.

En todas estas zonas que abarca la garrapata se han detectado problemas de resistencia la cual ha aumentado ampliamente en las últimas décadas, presentando en todos estos territorios resistencia a al menos uno de estos principios activos, organofosforados, piretroides sintéticos o amitraz (Cardozo, 2007)

### Ciclo de vida de *R. microplus*

El ciclo biológico del *R. microplus* (figura 1) 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) la cual tiene una duración promedio de 21 días; siendo así un ciclo monofásico.

El ciclo de vida libre comienza cuando la Teleógina (hembra ingurgitada) se desprende del huésped y cae al suelo tomando el nombre de Kenógina. En condiciones óptimas (27°C y más de 80% de humedad relativa) las garrapatas realizan toda la postura en 14 días (Fiel y Nari, 2013). Las Teleóginas tienen un peso de 0.24grs., estas tienen la capacidad de ovipositar una masa de huevos de la mitad de su peso, es decir de 0,1grs., lo que equivale a 2000 larvas (Fiel y Nari, 2013).

Ootoquia es el periodo entre el inicio y el fin de la ovoposición y metatoquia, es el período de tiempo que transcurre entre el cese de la oviposición y la muerte de la Xenógina, es decir de la hembra ovígera que ya cumplió su función. Según Nuñez, Muñoz, y Moltedo (1987), este período transcurre aproximadamente entre 2 a 15 días.

Los huevos depositados en el ambiente, presentan un rango en el período de incubación de 15 días a 51 días (Nuñez et al., 1987). Posteriormente, y en condiciones ideales, el porcentaje de eclosión logrado habitualmente llega al 85% o incluso valores superiores. 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 (Cardozo, Nari, Franchi, López y Donatti, 1984), y, por esa razón, generalmente entre mayo y agosto, no encontramos garrapatas adultas en el ganado.

Este periodo extra parasitario, de hasta 10 meses, es el que le permite a la garrapata pasar el invierno.

Para describir el ciclo parasitario propiamente dicho, tomaremos como referencia lo descrito por Fiel y Nari (2013) para esto llamaremos día 0 a el momento en que las larvas que llegan viables a agosto suben a los animales y comienzan un nuevo ciclo, estas se fijan a la piel a través del hipóstoma, comenzando la hematofagia, durante este estadio son casi imperceptible a simple vista.

Seguido a esto ocurre la primera muda entre el día 3 y 4 del ciclo, tomando así la forma de metalarva, a los días muda nuevamente para adoptar el estadio de ninfa, donde se alimenta y crece siendo ahora visible.

A los 13 días de comenzado el ciclo parasitario es cuando muda a metaninfa.

Posteriormente a los 14 días, tiene lugar la etapa adulta donde se diferencian entre machos (Gonandro) y hembras, este es el único momento en que un macho podría ser capaz de cambiar de hospedero.

La hembra adulta (mayor 14 días) comienza denominándose neógina, la cual crece y pasa a llamarse partenógina, esta aumenta su tamaño en un 80%, y en esta etapa es donde puede ocurrir la cópula; en el caso que esto no suceda, la garrapata permanece en este estadio y muere; por el contrario si la cópula es efectuada se continúa el ciclo parasitario, pasando ahora a tomar el nombre de Teleógina, la cual se ingurgita completamente y a partir del día 20,5 hasta 42 (moda 23 días) del ciclo se desprende, para seguir con el ciclo extraparasitario. (Fiel y Nari, 2013)

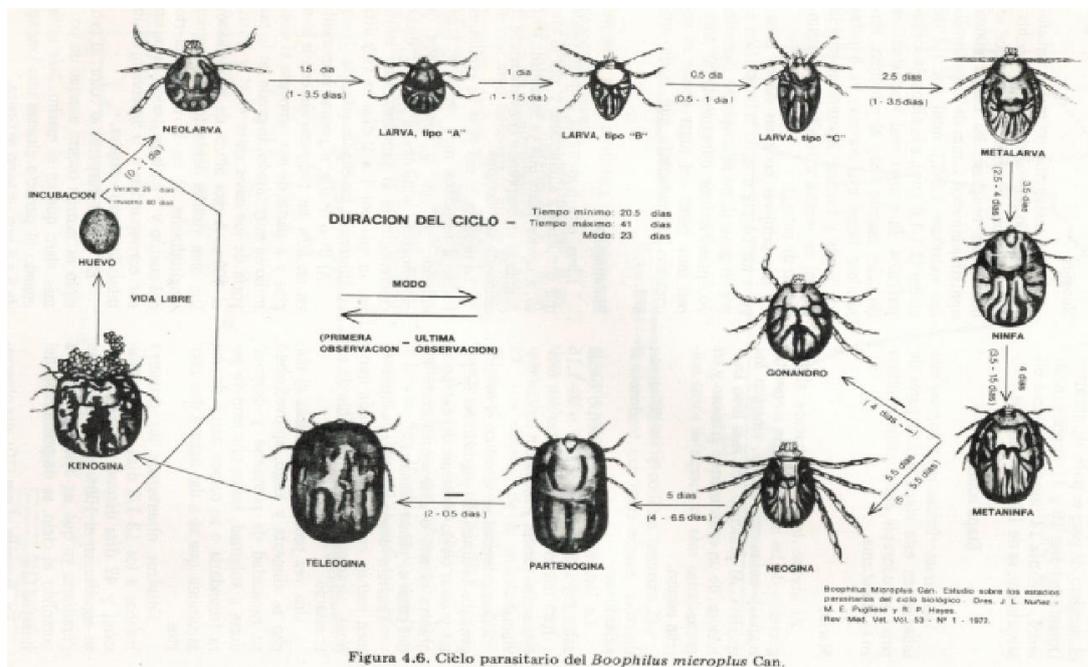


Figura 4.6. Ciclo parasitario del *Boophilus microplus* Can.

**Figura 1. Representación del ciclo parasitario de *R. microplus* (Nuñez et. al., 1987)**

### Ciclo de Epidemiología de *R. microplus* en Uruguay

Según lo que Fiel y Nari (2013) reportaron, en Uruguay, la garrapata presenta 3 generaciones al año en promedio (figura 2). Por definición una generación es el tiempo que transcurre desde que una larva parasita al bovino, se desprende y cae como adulto ingurgitado, deposita los huevos, estos eclosionan y las larvas suben nuevamente al hospedero, en condiciones ideales, esto puede darse en 2 meses. La primera generación ocurre entre agosto y noviembre, esta es generada por las garrapatas caídas en las generaciones previas. La segunda generación ocurre de noviembre a enero, se origina a partir de las garrapatas caídas de agosto a octubre y la tercera generación abarca los meses de febrero a mayo, teniendo su máxima expresión en los meses de otoño.

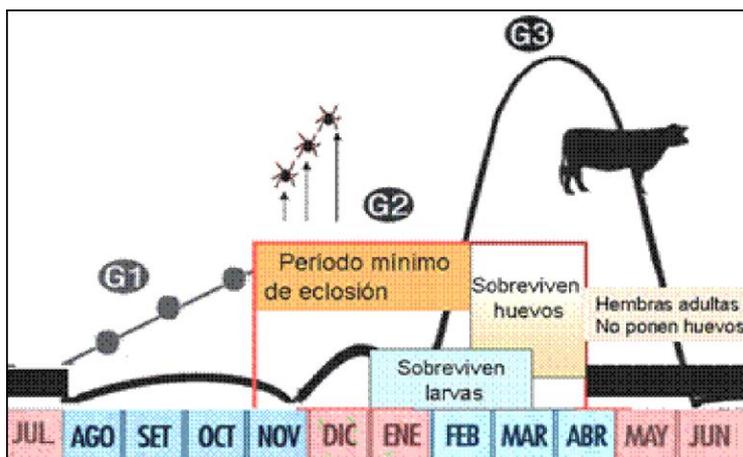


Figura 2. Esquema generacional de *R. microplus* (Fuente: Cuore, U., et. al., 2020)

### Campaña Sanitaria:

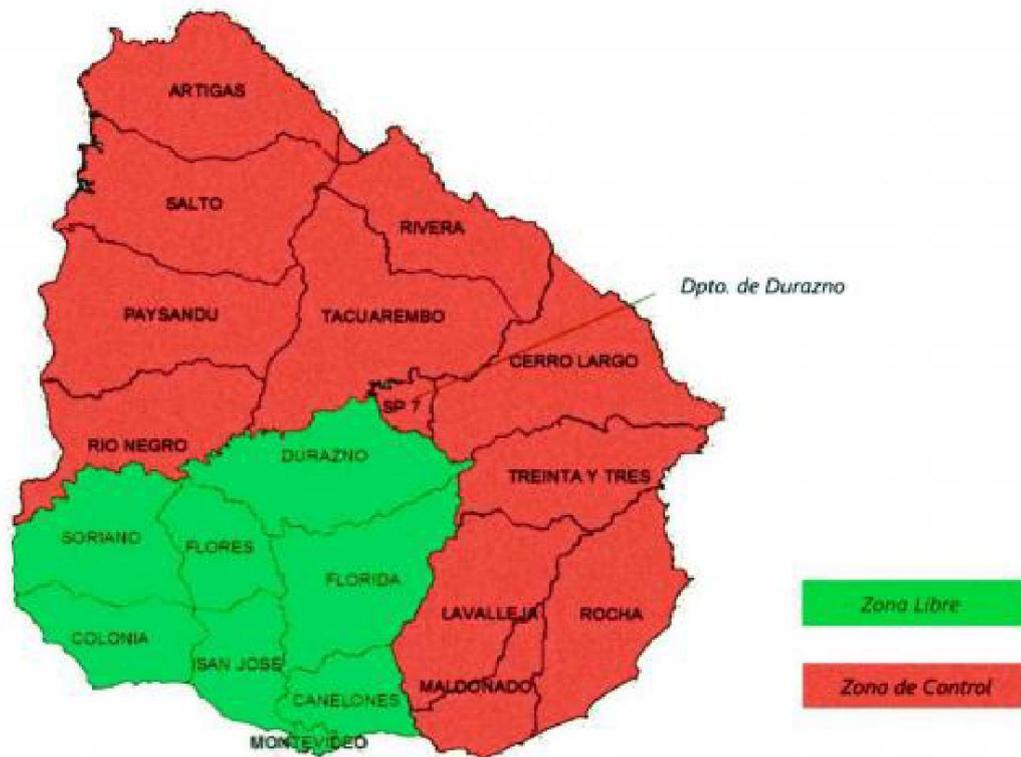
Esta enfermedad parasitaria está regulada según la ley 18.268 del 17 de abril de 2008, la cual se compone de 22 artículos.

En el artículo número 1, se declara de interés nacional la lucha contra la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, (incluyendo a todas las enfermedades infecciosas que son transmitidas por esta, tales como la babesiosis y anaplasmosis), en todo el territorio del país y en las especies animales que naturalmente parasita.

Esta ley ordena que todo propietario o tenedor de animales, así como los veterinarios de libre ejercicio y funcionarios idóneos del MGAP, en caso de encontrar *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* están obligados a denunciarlo. Según lo establecido la DGSG es la autoridad competente para la dirección, operación, administración, control y fiscalización de esta lucha.

Para combatir la garrapata se plantea hacer una división del territorio en zonas o áreas: libres, de control o de erradicación, para lograr esta clasificación se toma en cuenta factores epidemiológicos, productivos, ecológicos, culturales, socioeconómicos y geográficos. En base a esto se clasifican los establecimientos según el riesgo epidemiológico que tengan, adjudicándoles un estatus sanitario. Las áreas o establecimientos de alto riesgo serán interdictos, y quedan obligados a realizar el saneamiento por medio de un veterinario de libre ejercicio acreditado.

También se propone que para la extracción de animales que se encuentren en zonas de control o en erradicación, deberá realizarse un control de saneamiento previo, a cargo de un veterinario de libre ejercicio acreditado, no permitiéndose el tránsito de animales con garrapata en todo el territorio cualquiera sea el estado del ectoparásito.



Fuente: DSA, Departamento de Programas Sanitarios

**Figura 3. Delimitación geográfica entre zonas de control y zonas libres de *R. microplus***

Por lo tanto, el ganado que concurra a exposiciones, remates o ferias ubicados en zonas de control o en erradicación, recibirá un tratamiento precaucional, previo al egreso de los locales mencionados. Exceptuando de todo esto a bovinos con destino a planta de faena.

Se establece que, para proteger las diferentes zonas, la autoridad sanitaria determinará los procedimientos, requisitos y condiciones para el control sanitario del ganado en tránsito desde las zonas de control o en erradicación incluyendo certificaciones de despacho de tropa o extracción de predio interdicto según corresponda, y controles fijos en puestos sanitarios de paso entre zonas, departamentos u otras medidas que minimicen el riesgo de difusión de la garrapata.

Los despachos de tropa son requeridos cuando movemos ganado de una zona de control hacia una zona libre o en erradicación, bovinos provenientes de zonas de control con destino a campo en zona de control, bovinos de zona en erradicación a cualquier otra zona, bovinos que habitan en campos forestales, o siempre que la autoridad sanitaria lo determine.

En caso de no cumplirse con las disposiciones de esta ley, los infractores serán sancionados, según lo establecido en el artículo 20 de la misma.



Fuente: DSA/Departamento de Programas Sanitarios

**Figura 4. Distribución geográfica de los puestos sanitarios**

#### Métodos de control contra *R. microplus*

En la actualidad existen diferentes alternativas de control utilizados contra *R. microplus*. Los métodos químicos son una de las estrategias más utilizadas para controlar la garrapata, estos tienen como función interrumpir el ciclo de vida del parásito (Rodríguez-Vivas et al., 2014), para ello se basan en la aplicación de productos ectoparasiticidas (garrapaticida). Los principios activos autorizados y sus respectivos mecanismos de acción se describen dentro de seis grupos: organofosforados (actúan inhibiendo la acetilcolinesterasa), piretroides sintéticos (modulan los canales de sodio), amidinas (inhiben la síntesis de PGE-2), benzoilfenilureas (bloquean la síntesis de quitina), fenilpirazoles (bloquean la unión de GABA al receptor) y lactonas macrocíclicas (aumentan la permeabilidad de membrana por los iones de cloro, causando una hiperpolarización, derivando en una parálisis flácida) (Rodríguez-Vivas et al., 2010), estas últimas son las de importancia para este ensayo y abordaremos posteriormente en mayor profundidad la descripción de su mecanismo de acción.

El uso indiscriminado de estos ha contribuido en el desarrollo de resistencia, por lo cual es de suma importancia conocer los mecanismos de acción de los mismos, evitando generar más resistencia.

La resistencia se define como la capacidad adquirida por individuos de una población parásita que les permite sobrevivir a dosis de químicos que generalmente son letales para una población normal (Woodham et. al., 1983; Nari y Hansen, 1999). Se ha convertido en algo imposible evitar que se genere resistencia por lo que se vuelve de gran importancia el manejo de está tratando

de retrasar la aparición de cepas resistentes, esto se logra disminuyendo la frecuencia de aplicaciones de estos fármacos y combinando o rotando el uso de los mismos.

Existen 2 tipos de resistencia, clasificadas como resistencia cruzada que es el mecanismo que utilizan especies de insectos resistentes para sobrevivir a la exposición de insecticidas relacionados químicamente, usando un patrón de detoxificación genérico, y resistencia múltiple (RM) la cual se define como la utilización de varios mecanismos frente a la acción de varias clases de principios activos que no tienen relación química (Metcalf, 1989).

Para no generar o intentar retrasar esta resistencia es importante conocer las diferentes generaciones y tratar cada una de ellas con un producto ectoparasiticida distinto.

Conocer la resistencia a los químicos es importante para lograr un control o erradicación, para esto se usa lo que se conoce como *tratamiento generacional*, el cual se basa en el modelo epidemiológico, y propone la rotación de principios activos, utilizando uno diferente en cada generación de garrapatas (Cuore, U., et. al., 2020).

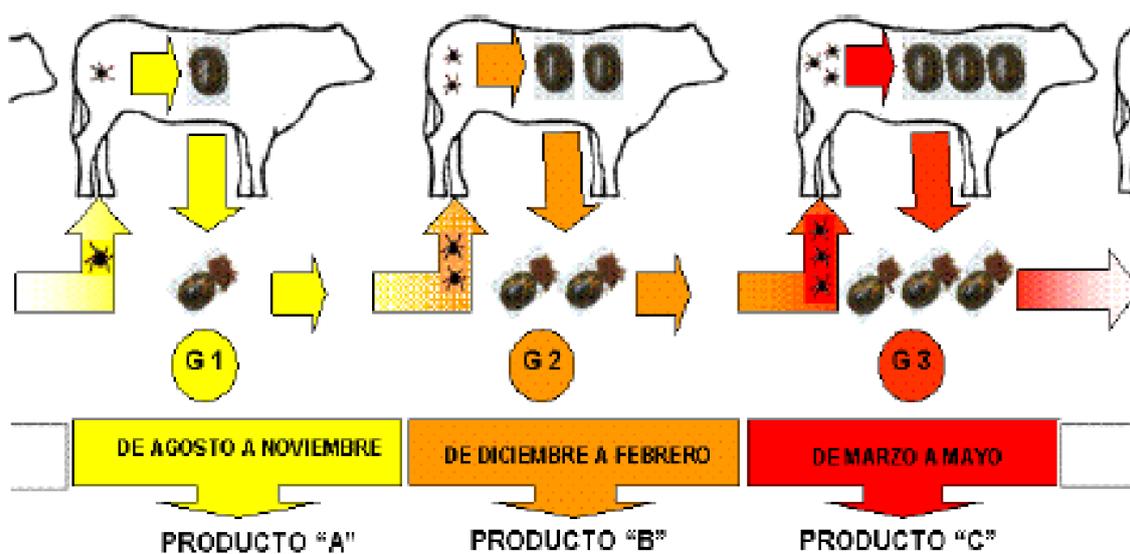


Figura 5. Esquema Tratamiento Generacional de la Garrapata (Fuente: Cuore, U, 2013)

Otras alternativas de control no-químico:

*Selección de hospederos resistentes:*

Las razas *Bos Indicus* son más resistentes que las *Bos Taurus*, para lograr un ganado más resistente se pueden realizar cruzamientos entre los animales que presenten menor número de garrapatas, o introducir sangre cebú (Rodríguez-Vivas et al., 2010).

### Control físico:

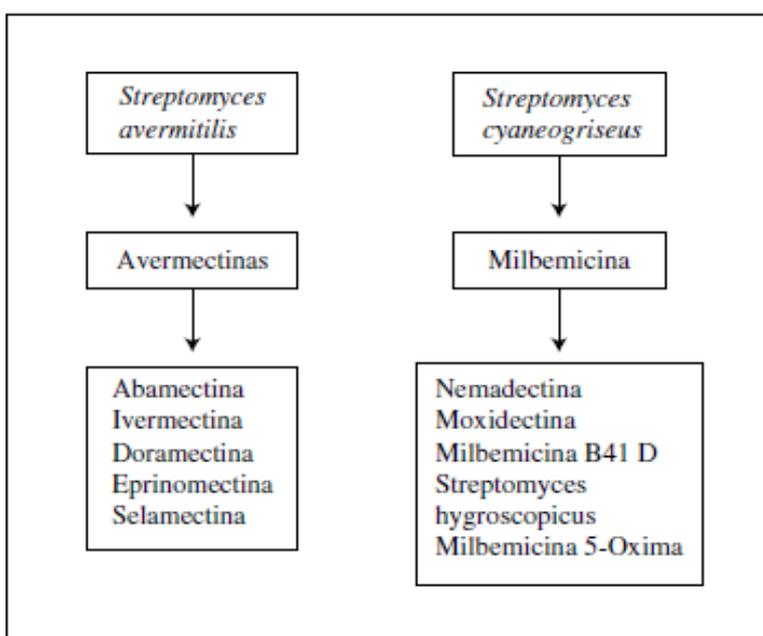
Se trata de rotación y descanso de las praderas, dejándolas libres de 45-60 días, para que en el momento de vida libre de la garrapata las larvas no puedan encontrar a su hospedero, llevándolas a una muerte por hambre y deshidratación (Rodríguez-Vivas et al., 2010). También existe otra forma en la cual, las praderas son quemadas, de esta manera se afecta directamente la garrapata (larvas, hembras adultas y huevos) por las altas temperaturas del fuego, y también indirectamente ya que el fuego destruye las pasturas que estas usaban para protegerse (Rodríguez-Vivas et al., 2010).

### Control Biológico:

Se trata de hongos entomopatógenos (*Metarhizium* sp; *Beauveria* sp), bacterias (*Cedecea lapagei*, *Escherichia coli* y *Enterobacter agglomerans*), nematodos entomopatógenos (Heterorhabditidae y Steinernematidae) y hormigas reguladoras (*Solenopsis germinata*, *S. saevissima*, *Camponotus rengira* y *Ectatomma quadridens*) que afectan la vida libre de la garrapata, pueden aplicarse sobre el animal o en las pasturas (Rodríguez-Vivas y et al., 2010)

### Lactonas Macrocíclicas en el control de *R. microplus*

Las lactonas macrocíclicas (LM) son el resultado de la fermentación de actinomicetos (Rivier y Papich, 2018). Se dividen en 2 grupos, las milbemicinas que provienen de la fermentación del *Streptomyces cyaneogriseus* y las avermectinas, que derivan de la fermentación se *Streptomyces avermitilis* (Rodríguez-Vivas et al., 2010). Este último es el de importancia para esta Tesis ya que es al que pertenece la ivermectina (IVM), la cual es la utilizada como principio activo en este ensayo.



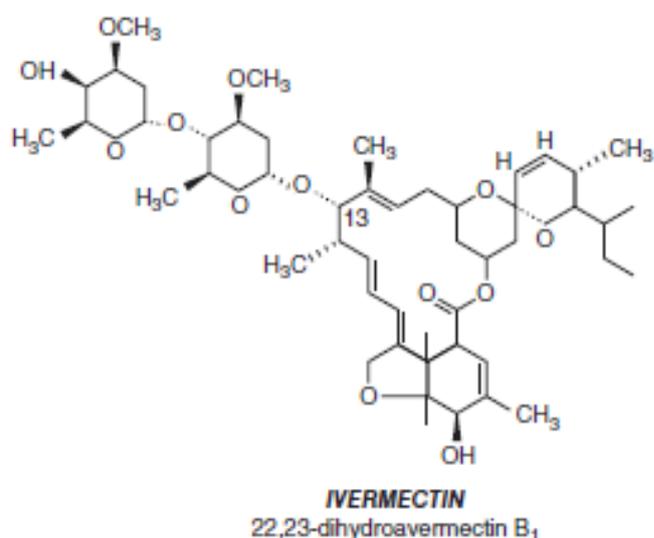
**Figura 6.**  
**Representación**  
**esquemática de la**  
**división de las**  
**lactonas**  
**macrocíclicas**  
**(Rodríguez-Vivas et**  
**al., 2010)**

Estas son eficaces a bajas dosis (Rodríguez-Vivas et al., 2010), esta eficacia está estrechamente relacionada con el tiempo de exposición del parásito a la droga activa (Rivier y Papich, 2018). Las garrapatas se exponen a las LM durante su alimentación, por esto la frecuencia y duración de la succión tiene un marcado impacto sobre la eficiencia de la droga (Rodríguez-Vivas et al., 2010).

Se caracterizan por ser altamente liposolubles, lo que les permite absorberse por todas las vías, también tienen una gran distribución en los tejidos como la luz intestinal, grasa y piel (Rodríguez-Vivas et al., 2010), gracias a esto son capaces de mantener concentraciones deseables en los tejidos por un periodo de tiempo prolongado (Botana, 2002).

La IVM, surge de una mezcla química de 2 avermectinas (Rivier y Papich, 2018). Es la LM de mayor difusión y utilización mundialmente en las distintas especies animales (Rodríguez-Vivas et al., 2010).

Se caracteriza por poseer un alto peso molecular y una gran lipofilia pero ser poco hidrosoluble, gracias a estas características tiene un importante volumen de distribución, depositándose en la grasa corporal lo que prolonga sus concentraciones en el organismo (Rodríguez-Vivas et al., 2010).



**Figura 7. Representación de la forma química de la Ivermectina (Rivier y Papich, 2018)**

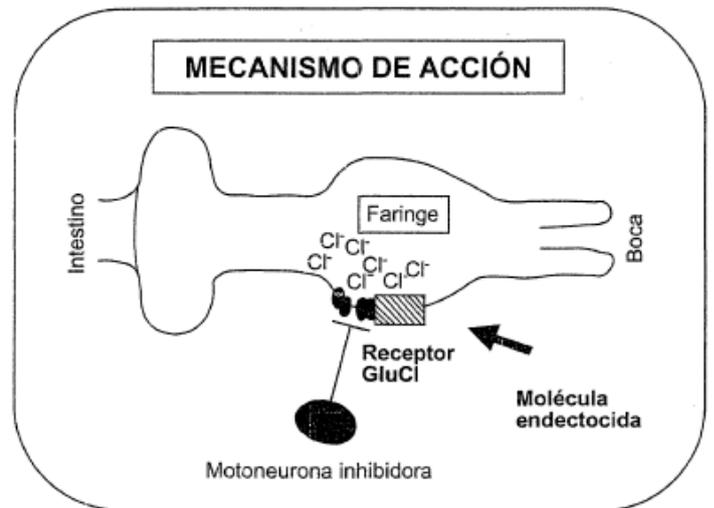
Existen diferentes formulaciones, puede presentarse al 1%, formulada por 60% de propilenglicol y 40% de glicerol, puede administrarse de forma inyectable subcutánea (0,2 mg/kg en bovinos) o vía tópica (pour on) (0,5 mg/kg en bovinos), en esta formulación muestra una eficacia en el control de garrapatas hasta 7 días post administración (Rivier y Papich, 2018).

También se desarrollaron formulaciones inyectables de larga acción, son preparaciones tixotrópicas de IVM al 3,15%, esta se caracteriza por tener un proceso de absorción lento desde el tejido subcutáneo, posee una gran persistencia en el torrente sanguíneo y otros tejidos, su eficiencia en el control de las garrapatas se extiende hasta 75 días post administración (Rivier y Papich, 2018).

### Mecanismo de acción de Lactonas Macroclínicas

Las LM inducen una reducción de la actividad motora y parálisis, este último está mediado por GABA y/o los receptores iónicos de glutamato y canales de cloro, pero se sabe que para que se produzca dicho efecto sobre el GABA deben usarse altas concentraciones de las drogas (Rivier y Papich, 2018).

La IVM, llega por vía oral o transcuticular a la placa neuromuscular (Rubio y Boggio, 2009) donde se une a los receptores de glutamato con alta afinidad, lo que provoca un incremento en la permeabilidad de los iones de cloro (Rodríguez-Vivas et al., 2010), causando un aumento lento e irreversible de la conducción de la membrana clorhídrica, generando una hiperpolarización de membrana y parálisis flácida en los músculos somáticos de los invertebrados, esto provoca que el parásito se vea limitado en su capacidad para mantenerse en el huésped, son capaces de interferir en la reproducción, disminuyendo el potencial biótico y también causan una parálisis en la faringe lo que le impide su correcta ingestión de nutrientes, llevándolo a la muerte. Estas son eficaces en el control parasitario tanto de adultos como de formas inmaduras (Rivier y Papich, 2018).



Botana, 2002 (capítulo 41)

**Figura 8. Mecanismo de acción de las Lactonas Macroclínicas**

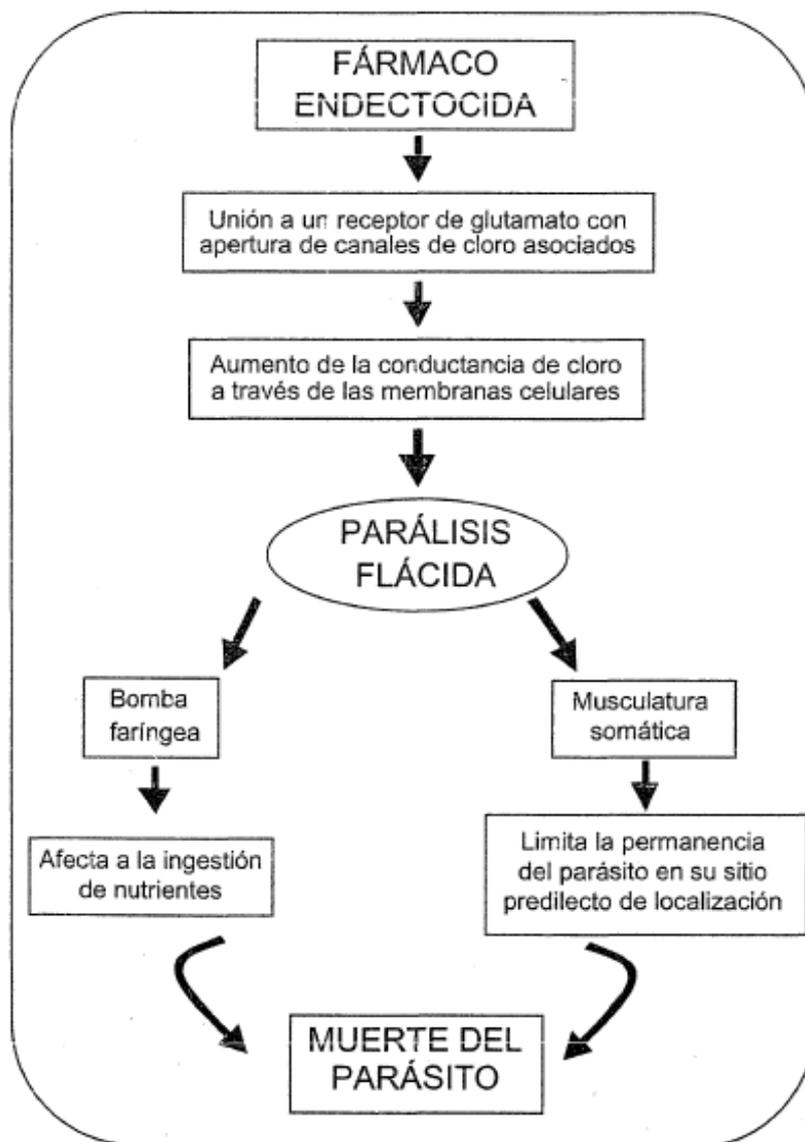


Figura 9. Mecanismo de acción de las Lactonas Macroclínicas (Botana, 2002)

**Métodos para determinar la eficacia de compuestos químicos sobre *Rhipicephalus microplus***

El Laboratorio Oficial DILAVE “Miguel C. Rubino” (Departamento de Parasitología), es el organismo responsable de comprobar la eficacia parasitológica de un producto veterinario. Actualmente existen 2 métodos para realizar el diagnóstico de sensibilidad de las garrapatas a los acaricidas.

El método *in vivo*, que se basa en la prueba del establo (Wharton, Roulston, Utech y Kerr 1970), esta es una metodología definitiva y no de carácter orientativo. Para llevarla a cabo en Uruguay, se utiliza la cepa de referencia Mozo, ya que esta es sensible a todos los principios activos disponibles. Esta técnica se basa en que las garrapatas que están sobre el bovino difieren temporalmente de su descendencia, la cual forma la siguiente generación, por

lo tanto, si uso el mismo principio activo repetidamente, aparecen genes de resistencia, para que esto no ocurra hay que limitar el uso de los principios activos al tiempo que lleva la evolución de una generación en condiciones de campo. Las principales desventajas hacen referencia a que es una técnica la cual utiliza ganado bovino como reactivo biológico, por lo tanto, para realizarla es necesario contar con instalaciones, las cuales son muy costosas. Como ventajas, podemos destacar que esta técnica tiene la capacidad de brindar información objetiva y comparable de la eficacia parasitaria y residualidad de los distintos ectoparasiticidas.

Existen también técnicas *in vitro*, estas tienen ventajas sobre la anterior en cuanto a la celeridad que presentan, también son de carácter orientativo para tomar decisiones de tratamiento. Tienen su base en bioensayos, los cuales puede realizarse en parásitos adultos (técnica de Dummond et.al., 1973) como en larvas (técnica de Stone y Haydock, 1962); en ambos casos las técnicas utilizadas se encuentran validadas por la FAO (2003), y tienen la capacidad de realizar un diagnóstico orientativo del perfil de resistencia desarrollado a campo (Cuore, 2013). Dentro de estas técnicas *in vitro* recomendadas por la FAO, podemos destacar: *adult immersion test* (AIT, Test de Inmersión de Adultos), *larval package test* (LPT, Test de Paquete Larvario) y *larval immersion test* (LIT, Test de Inmersión de Larvas). La existencia de diferentes pruebas para el diagnóstico de resistencia a los acaricida en garrapatas, indica que ninguna es efectiva para todas las circunstancias (FAO, 2005).

La técnica de AIT, es muy rápida, por lo que es recomendada como una prueba de *screening*, pero no está determinado que tan sensible y específica es dicha técnica para determinar resistencia a los acaricida. Varios protocolos fueron planteados por diferentes autores, con el fin de estandarizar esta técnica, para poder realizarla a nivel de campo con el objetivo de diferenciar entre poblaciones sensibles y poblaciones resistentes, logrando determinar dosis discriminantes para lactonas macrocíclicas (Jonsson et al., 2007). El principal obstáculo de AIT radica en el bajo número de individuos que son testeados por nivel de concentración. En cambio, las técnicas de larvas utilizan un número mayor de individuos por punto analizado, lo cual minimiza el error estadístico. Según la comparación entre AIT y LPT planteada por Shyma et. al., 2015, para preparaciones comerciales de deltametrina, flumetrina y fipronil, se concluyó que la LPT, permite partir de un mayor número de individuos adultos, aunque tarda más tiempo en permitir visualizar los resultados. Esta ventaja de LPT sobre AIT permitiría emplearla en situaciones con baja carga parasitaria.

La técnica recomendada por la FAO como prueba diagnóstica de resistencia para *R. microplus*, es la técnica de Paquete Larvario (LPT). Esta presenta un mayor grado de sensibilidad (Jonsson et al., 2007), no obstante, la preparación del material puede generar errores que repercutan en el resultado final, el cual se visualiza hasta 6 semanas luego de la realización de la técnica. El hecho de que la espera para visualizar los resultados sea tan larga, es el gran inconveniente que tiene esta técnica, ya que no aporta la rapidez necesaria para la toma de decisiones a nivel de campo.

Shaw (1966) fue quien describió el Test de Inmersión de Larvas (LIT) como herramienta para la determinación del grado de resistencia de *R. microplus* frente a organofosforados. La validez estadística de esta técnica radica en el uso de un mayor número de individuos en comparación con las pruebas realizadas sobre adultos. Klafke et al. (2006) realizó un trabajo comparativo entre las pruebas que utilizaban larvas como reactivo biológico (LPT y LIT), para esto diseñó un ensayo que determinara la capacidad de estas pruebas en la detección de cepas resistentes de *R. microplus* en Sao Paulo, Brasil. Como conclusión determinó que la LIT tiene la capacidad de diferenciar poblaciones en relación a su respuesta frente a Ivermectina, y permite diferenciar entre cepas resistentes y susceptibles (Klafke et al., 2006)

A partir de la LIT, surge una modificación planteada por Sindhu, Jonsson y Iqbal (2012), donde se utilizaban jeringas con el objetivo de facilitar el trabajo que implica la técnica original, esta modificación se denominó como Test de Inmersión en Jeringas (SIT por su sigla en inglés). Farias et. al., (2016), comparó esta técnica frente a la LIT original, y concluyó que SIT propuesto por Sindhu et al. (2012) presentó ventajas del tipo: a) reducción del tiempo de preparación de las jeringas; b) reducción del espacio físico necesario para almacenar las larvas durante la prueba; c) disminuye el riesgo de contaminación ambiental y del operador con las soluciones empleadas (debido a menor volumen y mejora en el proceso de secado); y d) reducción de volumen de solución empleada.

## **Hipótesis**

La técnica de inmersión en jeringas para larvas de garrapata del género *Rhipicephalus microplus* discrimina perfiles de sensibilidad dosis creciente frente a Ivermectina en condiciones de laboratorio.

## **Objetivo General**

Estandarizar el Test de inmersión modificado para jeringas como herramienta diagnóstica del perfil de sensibilidad acaricida de la Ivermectina en poblaciones de cepa Mozo de garrapata del género *Rhipicephalus microplus*.

## **Objetivo Específico**

- Puesta a punto de la Técnica de Inmersión de Larvas (Test de inmersión en Jeringas) de garrapatas del género *Rhipicephalus microplus* en condiciones de laboratorio. Modelo in-vitro
- Validar el modelo mediante curvas de dosis-respuesta de Ivermectina en larvas del género *Rhipicephalus microplus* (cepa Mozo) en condiciones in vitro.

## **Materiales y Métodos**

### **Actividades específicas**

Los estudios *in vitro* y la validación de la técnica de inmersión se llevaron a cabo en el Laboratorio de Farmacología de la unidad de Farmacología y terapéutica, Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria, UDELAR, Uruguay.

### **Reactivo Biológico**

#### *Obtención de garrapatas Adultas del género Rhipicephalus Microplus*

Se emplearon garrapatas *Rhipicephalus microplus* (cepa de referencia Mozo, sensible a todos los principios activos disponibles en el mercado para control del ectoparásito). Las garrapatas adultas provinieron del Laboratorio de Parasitología (DILAVE) en colaboración con el desarrollo académico en nuestra institución.

#### *Obtención de larvas de garrapatas del género Rhipicephalus Microplus (reactivo biológico)*

Brevemente se describen las técnicas utilizadas en el Laboratorio de Parasitología del Dilave. Las larvas fueron obtenidas tras la incubación de garrapatas Teleóginas de acuerdo a las especificaciones indicadas por Drummond et. al., 1973; FAO, 2004 (incubación en estufa con condiciones de temperatura y humedad controladas de 27 °C y 90 %). Una vez ocurrida la eclosión se esperó de 14 a 16 días para iniciar las pruebas con las larvas. Este punto permitió comparar en distintos días diferentes poblaciones de larvas sincronizadas en un mismo momento de desarrollo en términos de vitalidad y tiempo de sobrevivencia.

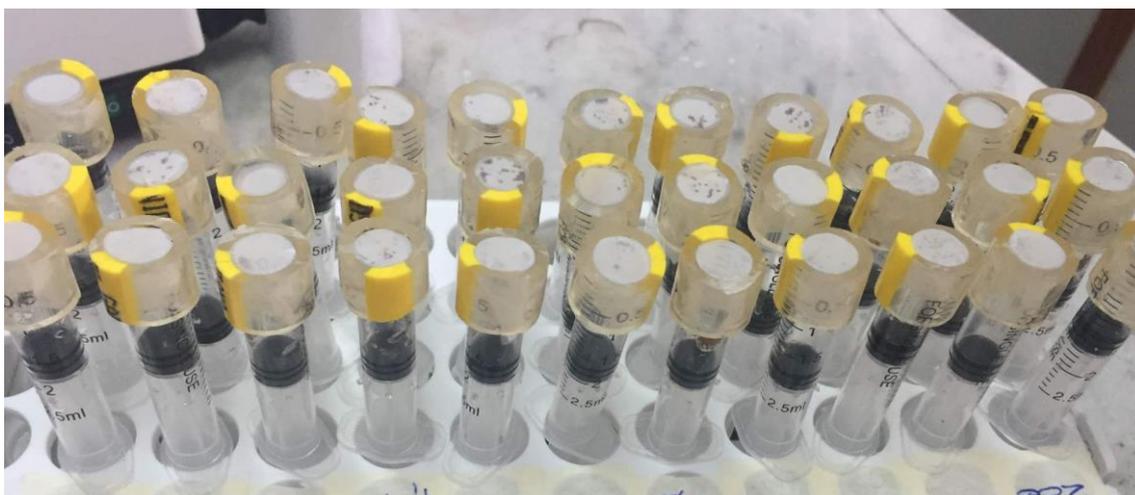
### **Técnica de inmersión (Test de inmersión en Jeringa)**

Las soluciones madres de ivermectina y las correspondientes diluciones se prepararán acorde a la metodología publicada por la FAO (2004). Las diluciones utilizadas en este caso se ajustaron posteriormente a diversas pruebas a un rango de valores que comprende: 200ppm; 100ppm; 50ppm; 25ppm; 12,5ppm; 6,25ppm; 3,125ppm; 1,36ppm; 0,78ppm y 0.38ppm. El diluyente para las distintas soluciones evaluadas y la que actuó de solución control se formuló a partir de acetona al 1% y Triton-X al 0,02% en agua destilada.

#### *Armado de jeringas y cargado de larvas para inmersión*

Utilizando jeringas descartables de 2.5 mL previo recorte del pivote y ajuste a una malla filtro de 120 µm, con previa realización de 6 orificios que permitan la entrada de aire al momento de la inmersión (adaptado de la técnica descrita por Souza et. al., 2008 (Figura 10). Las jeringas son conectadas a la bomba de vacío

con la cual se capturan únicamente las larvas viables (demuestran movimiento). Las jeringas cargadas con larvas fueron inmersas en las diferentes soluciones de ivermectina. Pasado el tiempo de inmersión (punto a evaluar), se secan en papel de secado y campana de flujo durante 1 hora previo a la incubación (tiempo de incubación a evaluar). Las condiciones de incubado fueron similares a las establecidas para garrapatas adultas (27°C / 90 % humedad relativa). Cada una de las disoluciones estudiadas (diluyente control y concentraciones crecientes de principio activo) se estudiaron por triplicado.



**Figura 10. Jeringas preparadas y cargadas con larvas luego de realizar la inmersión, previo a la incubación (Foto personal).**

### **Ensayos de estandarización de la técnica**

Ensayo N°1: Evaluación de los efectos de la técnica sobre el reactivo biológico

Larvas cargadas en jeringas en cantidad indefinida, y sin comprobar viabilidad previa fueron incubadas durante 24 horas (27 ° C / 80-90% HR) y luego se realizó el recuento de larvas vivas y muertas individualmente para cada jeringa en particular, determinando el porcentaje de mortalidad ( $\% = \text{Vivas} / \text{Muertas} \times 100$ ). Larva viva se consideró todas aquellas que mostraran movimiento,

Ensayo N°2: Estandarización del tiempo de inmersión

Jeringas cargadas con un número indeterminado de larvas, fueron sumergidas en agua o diluyente a diferentes tiempos (3 y 5 minutos).

Una vez transcurridos los diferentes tiempos de inmersión, las jeringas se secaron durante una hora en la campana de flujo, para posteriormente a las 24 horas ser evaluados en iguales condiciones que el ensayo 1.

### Ensayo N°3: Ajustes preliminares de la técnica

Para la realización de la técnica, nos basamos en las condiciones del ensayo 2 con algunas modificaciones. En esta oportunidad adicionamos diluciones de ivermectina en un rango de al 25 ppm y 0,097 ppm, por triplicado (tres curvas de dosis-respuesta) y establecimos que las jeringas fueran cargadas con aproximadamente 80 larvas viables y sumergidas por 5 minutos. La posterior evaluación se realizó de acuerdo a lo descrito en el ensayo 1.

### Ensayo N°4: Robustez y validación de la técnica final

Se repitió el procedimiento del ensayo 3 en ocho oportunidades independientes con la modificación final de cargar las jeringas con aproximadamente 20 larvas que demostraban movimiento (vivas), siendo sumergidas durante 5 minutos en diluciones de ivermectina comprendidas entre 18,400 ppm y 0.143 ppm y también en diluyente. Se realizaron 3 repeticiones por cada dilución. La posterior evaluación se realizó de acuerdo a lo descrito en el ensayo 1.

### **Análisis estadístico**

Los datos cuantitativos fueron analizados de acuerdo a técnicas estadísticas descriptivas y estudios de distribución. Se estimaron las medias, desviaciones estándares y coeficientes de variación, para cada parámetro evaluado.

El modelo dosis-respuesta se ajustó de acuerdo a los criterios de selección de modelos (Modelos Log-logistic / Log-normal / Probit) (Ritz, Baty, Streibig y Gerhard, 2015). Los datos se presentan mediante el gráfico de curvas de dosis-respuesta y la determinación de los principales parámetros farmacodinámicos ( $ED_{50}$ ,  $ED_{99}$ ). Para verificar diferencias entre los valores dinámicos se aplicaron modelos lineales generalizados mixtos, con un nivel de confianza del 95%. Los datos se analizaron utilizando el programa R (R DevelopmentCoreTeam, 2015).

## Resultados y Discusión

### Ensayo N°1: Evaluación de los efectos de la técnica sobre el reactivo biológico

El primer ensayo fue realizado con el objetivo de probar la técnica descrita de SIT propuesta por Sindhu et al. (2012) y analizar los efectos de ésta sobre el reactivo biológico. Los resultados del ensayo 1 se muestran en la Tabla 1.

Repeticiones (n)	Larvas Vivas (n)	Larvas Muertas (n)	Mortalidad (%)
1	19	0	0
2	17	3	15
3	32	0	0

**Tabla 1. Mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* de la cepa Mozo tras 24 horas de incubación en jeringas para comprobar el efecto base de la técnica de Inmersión de Larvas en Jeringas (SIT, en inglés).**

La mortalidad del grupo testigo osciló entre 0 y 15 %, dando como promedio 5% de mortalidad. Lo que nos permite determinar que la técnica propiamente dicha no genera mortalidades por encima del rango aceptable ya que si la mortalidad del grupo control es superior a 10% se considera defectuosa la técnica, su uso muestra que la mortalidad es cercana a cero normalmente (FAO, 2004).

En vista que la técnica de inmersión en jeringas no repercute en una elevada mortalidad para larvas de *R. microplus*, decidimos continuar con el siguiente ensayo.

En el ensayo 2 los resultados comprobaron los efectos del diluyente en el reactivo biológico. Los resultados del ensayo 2 se muestran en la Tabla 2.

### Ensayo N°2: Estandarización de tiempo de inmersión

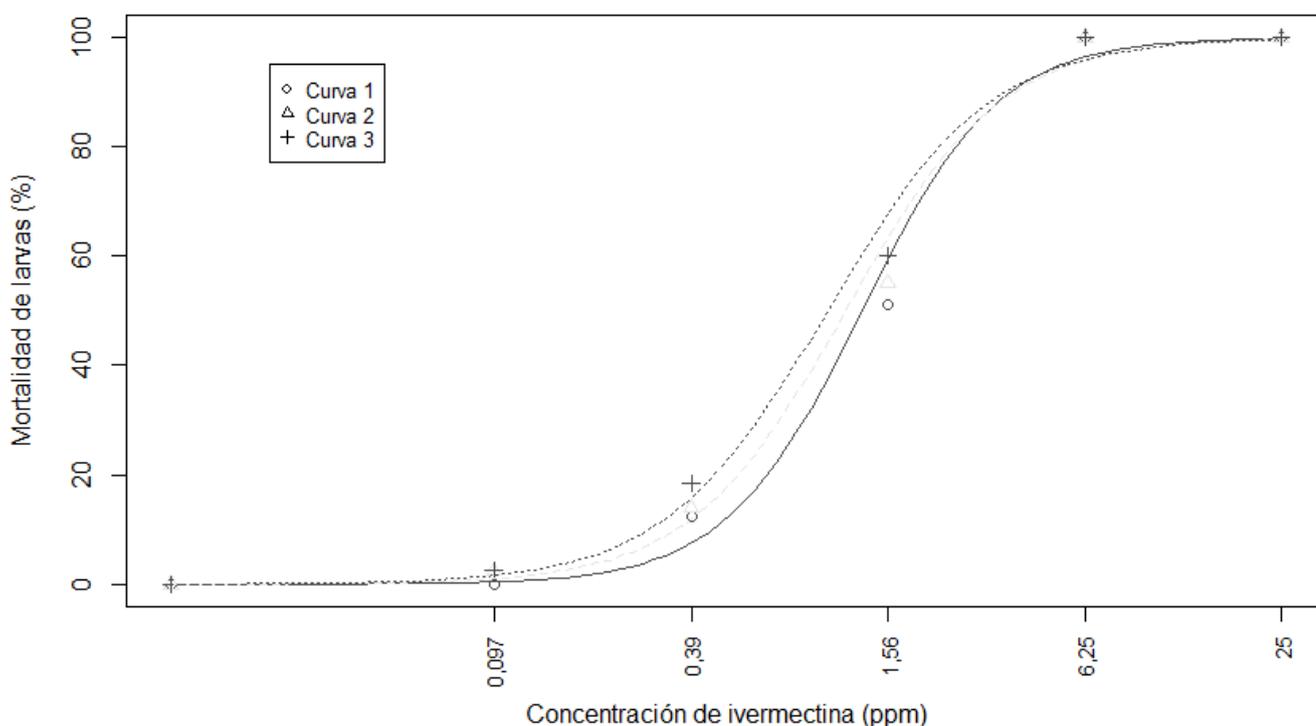
Tiempo de inmersión (min)	Cantidad de repeticiones por tiempo de inmersión (n)	Mortalidad (%)
5	21	4
3	5	13

**Tabla 2. Mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* (cepa Mozo) empleando técnica de inmersión en jeringas, en diluyente en 3 y 5 minutos para determinar el tiempo de inmersión.**

La mortalidad en larvas fue de 4% y 13 % (5 y 3 minutos de inmersión, respectivamente), diferencia que puede provenir de la técnica y por la diferencia en la población de garrapatas que fueron utilizadas. El tiempo de inmersión de 3 minutos responde a la necesidad de brindarle mayor celeridad a la técnica para poder aumentar el número de pruebas realizadas por día. Los resultados obtenidos fueron comparados con distintos artículos de diferentes autores, Shindu et al. 2012 realizaron el ensayo empleando una solución diluyente constituida por 0,2% de Tritón X-100, manteniendo la inmersión de larvas por 30 segundos y establecieron que la mortalidad en el diluyente no podía superar el 5%; Webster et al., (2018), lo hicieron en 5 minutos haciendo la inmersión en diluyente (1 ml de solución de Tritón X-100) y obtuvieron una mortalidad de 12,6%, valor que fue tomado como aceptable. Siendo que la mortalidad de larvas frente al diluyente utilizando 5 minutos de inmersión fue de 4 % (promedio, en 21 réplicas) decidimos proceder a la estandarización de la técnica utilizando dicho tiempo de inmersión.

### Ensayos Nº 3 y 4: Construcción de curvas dosis-respuesta para larvas de *Rhipicephalus microplus* frente a Ivermectina

En la figura 11, se presentan los resultados del ensayo 3. La tabla 3 se presenta el ajuste del modelo log-logístico del cual se obtuvo la curva dosis-respuesta que se muestra en la figura 1. Podemos visualizar que en el ensayo 3 el rango de la pendiente de las 3 curvas se ubicó entre 1,75 y 2,09, la ED<sub>50</sub> se encuentra entre 1,017 y 1,298 ppm, por último, el promedio de la ED<sub>99</sub> se ubica entre 11,700 y 14,055 ppm.

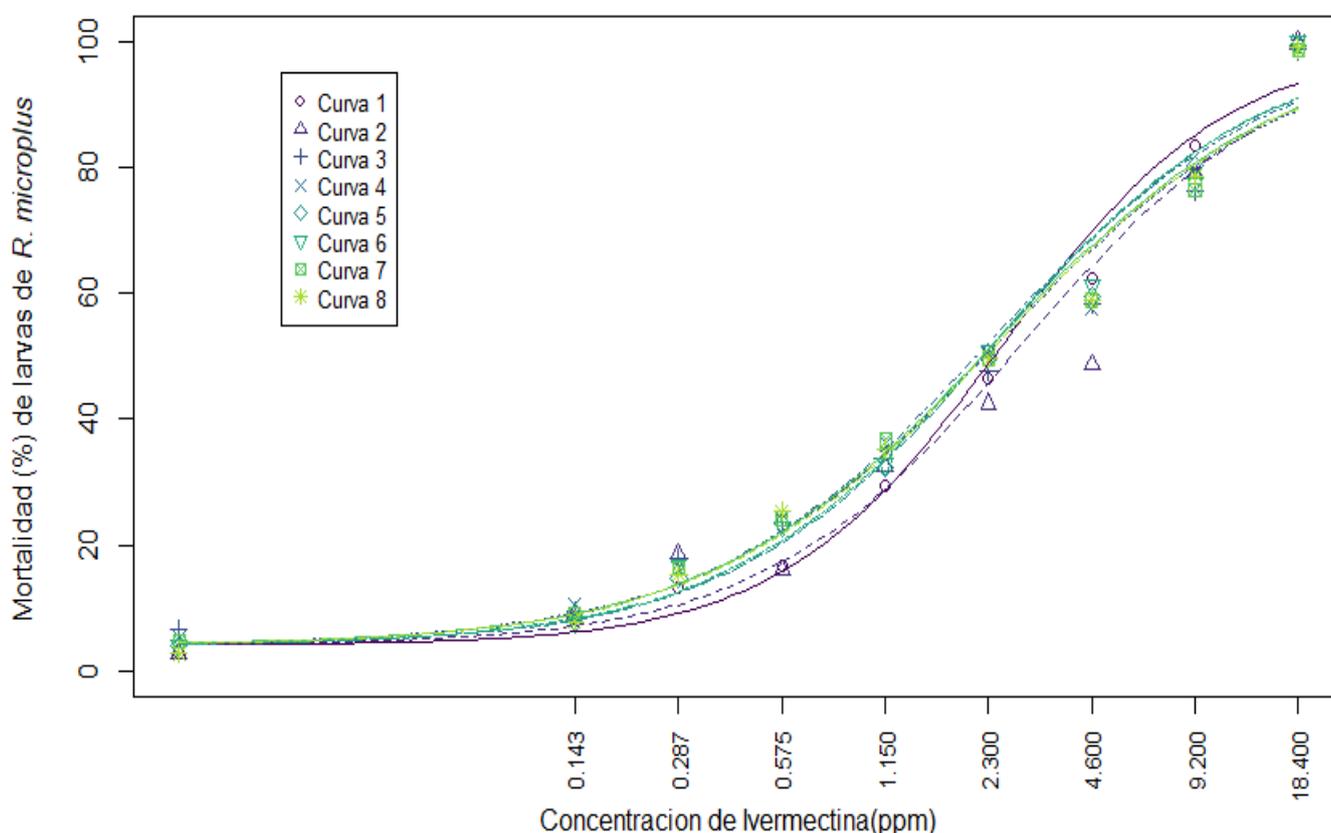


**Figura 11. Curva dosis-respuesta por triplicado para larvas de *Rhipicephalus microplus* frente a concentraciones crecientes de Ivermectina (0 - 25 ppm) empleando la Técnica de Inmersión en Jeringas**

Curva	Pendiente	ED <sub>50</sub> (ppm)	ED <sub>99</sub> (ppm)
1	2,09	1,298 ± 0,12	11,700 ± 2,93
2	1.84	1,157 ± 0,11	13,988 ± 3,78
3	1,75	1,017± 0,1	14,055 ± 3,92

**Tabla 3. Ajuste del modelo log-logístico para la mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* (cepa Mozo) frente a concentraciones crecientes de Ivermectina (0 - 25 ppm) empleando la técnica de Inmersión en Jeringas.**

En el ensayo 4 se ajustaron las concentraciones de ivermectina utilizadas en base a los resultados obtenidos en el ensayo 3. El resultado promedio de la pendiente se encuentra entre 1,02 - 1,14, el de la ED<sub>50</sub> oscila entre 2,30 - 2,90 ppm, por último, el promedio de la ED<sub>99</sub> se ubicó entre 81,61 y 222,66 ppm. La figura 12 y la tabla 4 presentan los resultados mencionados.



**Figura 12. Curva dosis-respuesta para larvas de *Rhipicephalus microplus* frente a concentraciones crecientes de Ivermectina (0 - 25 ppm) empleando la Técnica de Inmersión en Jeringas**

Curva	Pendiente	ED <sub>50</sub> (ppm)	ED <sub>99</sub> (ppm)
1	1,33 ± 0,09	2,55 ± 0,18	81,61 ± 19,4
2	1,14 ± 0,08	2,90 ± 0,22	164,89 ± 47,25
3	1,02 ± 0,07	2,44 ± 0,19	222,66 ± 66,62
4	1,05 ± 0,07	2,30 ± 0,17	180,57 ± 51,03
5	1,11 ± 0,07	2,40 ± 0,17	149,82 ± 40,28
6	1,10 ± 0,07	2,37 ± 0,17	151,96 ± 40,39
7	1,03 ± 0,06	2,39 ± 0,18	207,69 ± 59,64
8	1,03 ± 0,07	2,45 ± 0,19	210,51 ± 63,69

**Tabla 4: Ajuste del modelo log-logístico para la mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* frente a concentraciones crecientes de Ivermectina (0 - 18,4 ppm) empleando la Técnica de Inmersión en Jeringas**

Ambos ensayos fueron comparados con los resultados obtenidos en el ensayo realizado por Villar, Puerta, López y Chaparro, (2015) en el cual se realizó el test de inmersión de larvas utilizando una solución control de etanol al 1% y Tritón X-100 al 0,02% diluidos en agua destilada, como principio activo se utilizó ivermectina al 1%, y el tiempo de inmersión utilizado fue de 10 minutos. Se realizaron 10 preparación en un rango de 10 a 300 ppm, y se cargaron entre 300 y 400 larvas por jeringa, estas provenían de 3 campos (Yarumal, San Jerónimo y Tarso) que contaban con problemas en el control de la garrapata. En total se realizaron 2 test por campo. En dicho ensayo los resultados de la pendiente promedio fue de 1,992 y 1,888 para el campo de Yarumal, este obtuvo una ED<sub>50</sub> en el rango de 34,1-58,8 ppm y 39,4-54,9 ppm, y una ED<sub>99</sub> que oscila entre 400,8-1580,0 ppm y 559,1-1297,8 ppm. Para el campo de San Jerónimo las pendientes resultantes fueron 2,185 y 2,341, la ED<sub>50</sub> promedio se ubicó entre 27,2 - 41,7 ppm y 27,8 - 45,2 ppm, y los promedios de la ED<sub>99</sub> estaba entre 257,2 - 771,9 ppm y 233,2 - 681,7 ppm. En el último campo (Tarso) las pendientes promedio fueron de 1,501 y 1,768, las ED<sub>50</sub> promedio se encontraban entre 15,8 - 40,0 ppm y 24,1 - 41,3 ppm; los promedios de las ED<sub>99</sub> oscilaron entre 418,7 - 6172,5 ppm y 380,6 - 1742,7 ppm.

En base a estos resultados podemos afirmar que los estimados de la pendiente obtenidos en el ensayo 3, comparados con el ensayo realizado por Villar et al., (2015), son comparables, en cuanto, sin embargo, los resultados de la ED<sub>50</sub> y la ED<sub>99</sub>, se ubicaron entre 15 y 46 y entre 21 y 440 veces por encima de lo obtenidos en esta tesis respectivamente. En el ensayo 4, el resultado promedio de la pendiente se ubicó entre 1 y 2 veces por debajo de los resultados obtenidos en el ensayo de Villar et al., (2015), por lo que concluimos que no se encuentran diferencias significativas. Con respecto a la ED<sub>50</sub> es posible decir que, en el ensayo realizado por Villar et al., (2015), se ubicó entre 7 y 20 veces por encima de los resultados obtenidos en esta tesis, y la ED<sub>99</sub> perteneciente a el ensayo llevado a cabo por Villar et al., (2015), oscilo entre 2,8 y 27 veces por encima de la obtenida en esta tesis, siendo que el rango para este parámetro en el ensayo de Villar et al., (2015), es muy grande podemos decir que existen puntos en los cuales la diferencia no es de gran importancia.

Las diferencias con los resultados obtenidos en esta tesis pueden atribuirse a la diferencia de cepas utilizadas, ya que el ensayo de Villar et al., (2015) fue realizado con poblaciones de campo, las cuales, a diferencia de la cepa Mozo, utilizada en esta tesis, pueden presentar resistencia.

También pueden existir diferencias debido a las variantes existentes entre LIT, y la técnica realizada en esta tesis (SIT), el tiempo de inmersión y la diferencia en la solución control utilizada. Debido a estas diferencias se procedió a comparar los resultados con los obtenidos por Castro et al., (2012) donde se realizó la técnica LIT en larvas de la cepa Mozo utilizando ivermectina, la solución control estaba compuesta por Tritón X-100 al 0,02% en agua destilada. Se hicieron 60 repeticiones dando como resultado una pendiente promedio de  $32,9 \pm 0,60$ , ED<sub>50</sub> que osciló entre 7,7-8,6 ppm y de ED<sub>99</sub> que se ubica entre 39,8-130,02 ppm. Para la pendiente los valores obtenidos con la técnica de inmersión en jeringas en el ensayo 3 se ubicaron 17 veces por debajo de los obtenidos por Castro et al., (2012), los de la ED<sub>50</sub> oscilaron entre 6,6 y 7,6 veces por debajo de los resultados registrados en el ensayo de Castro et al., (2012), por último, comparamos los resultados de la ED<sub>99</sub>, donde los presentados por Castro et al., (2012) se encuentran entre 3 y 9 veces por encima de los obtenidos en esta tesis.

En cuanto al ensayo 4, los resultados promedios de la pendiente obtenidos en esta tesis se encuentran por debajo de los obtenidos en el ensayo de Castro et al., (2012), entre 29 y 31 veces. Comparando los resultados obtenidos para la ED<sub>50</sub>, se apreció que la de esta tesis se ubica entre 2,9 y 3,3 veces por debajo de la publicada por Castro et al., (2012), sin embargo, la ED<sub>99</sub> de la presente tesis se encuentra entre 1,7 y 41,8 veces por encima de la resultante en el ensayo de Castro et al., (2012).

En base a estos resultados se da a entender que la diferencia se puede deber puramente a la técnica en sí y no a la sensibilidad de la cepa.

Si bien los resultados obtenidos mediante la técnica de inmersión en jeringas para la pendiente no se ajustan con los resultados publicados por Castro et al., (2012), si podemos decir que son bastante similares con los obtenidos por Villar et al., (2015). En cuanto a la ED<sub>50</sub>, se puede apreciar que siempre se encontró por debajo de la obtenida en los ensayos de Castro et al., (2012) y Villar et al.,

(2015) por lo que se puede decir que nuestros valores se ajustan correctamente ya que las técnicas y los reactivos biológicos utilizados no son los mismos. Con respecto a la ED<sub>99</sub> es de importancia destacar que esta oscila en rangos muy amplios, si bien se encontró por debajo comparado con el estudio de Villar et al., (2015), mientras que al ser comparada con el de Castro et al., (2012), esta se encontraba por encima, aunque cabe destacar que muchos de los valores eran similares, teniendo así varios puntos de coincidencia y ajustando de esta manera los valores. Por lo que la técnica puede validarse usando como referencia los valores pertenecientes al ensayo de Castro et al., (2012) y de Villar et al., (2015), atribuyendo las mínimas variaciones halladas, a la diferencia entre las poblaciones de garrapatas utilizadas en cada ensayo y también las diferencia que existen entre la técnica utilizada en el ensayo antes mencionado (LIT) y la empleada en esta tesis (SIT).

## **Conclusiones**

Se logró la puesta a punto de la técnica de inmersión en jeringas para ser empleada en larvas de *R. microplus* en la construcción de curvas dosis-respuesta.

La cepa Mozo de *R. microplus* presenta mortalidad concentración-dependiente para Ivermectina en el rango de 0,143 a 18,4 ppm.

La puesta a punto de la técnica de inmersión en jeringas permite disponibilizar una herramienta metodológica para comprobar la sensibilidad de larvas de *R. microplus* en condiciones de laboratorio.

## Referencias bibliográficas

- Botana, L.M., Landoni, M.F., y Martin-Jiménez, T. (2002). Fármacos endectocidas: avermectinas y milbemicinas. En *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*, 41, 545-551. Madrid: McGraw-Hill.
- Betancur Hurtado, O., y Giraldo-Ríos, C. (2018). *Economic and Health Impact of the Ticks in Production Animals*. Recuperado de <https://www.intechopen.com/chapters/63777>
- Cardozo, N. (2007). *Resistencia de la garrapata (B. microplus) a los acaricidas*. Recuperado de [https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/parasitarias/Bovinos\\_garrapatas\\_tristeza/104-resistencia.pdf](https://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/Bovinos_garrapatas_tristeza/104-resistencia.pdf)
- Cardozo, H., Nari, A., Franchi, M., López, A., y Donatti, N. (1984). Estudio sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas enzoóticas del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 20, 4-10.
- Castro Jener, E., Sato Schumaker, T., Marcondes Klafke, G., Rifran, L., Gonzalez, P.; Niell, C., ...Miller, R.J. (2012). *Garrapata: resistencia a fipronil e ivermectina en rodeos vacunos de Uruguay y Brasil. Proyecto FPTA 243: Adecuación de bioensayos para la determinación de resistencia de Boophilus microplus a fipronil e ivermectina, y verificación de resistencia cruzada entre ambas drogas*. Montevideo: INIA Recuperado de <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2830/1/18429230712114518.pdf>
- Center for Food Security and Public Health (2007). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus. Garrapata del ganado del sur, garrapata del ganado bovino*. Recuperado de [http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/boophilus\\_annulatus-es.pdf](http://www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/boophilus_annulatus-es.pdf)
- Cuore, U. (2013). *Estado de resistencia a los garrapaticidas en Uruguay*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura->

[pesca/files/documentos/publicaciones/estado\\_resistencia\\_garrapaticidas\\_uruguay.pdf](http://pesca/files/documentos/publicaciones/estado_resistencia_garrapaticidas_uruguay.pdf)

Cuore, U. (2013). *Determinación de eficacia de productos garrapaticidas. Prueba de Establo*. Recuperado de [http://www.mgap.gub.uy/gxpfiles/mgap/content/audio/source000000014/AUD\\_0000070000002747.pdf](http://www.mgap.gub.uy/gxpfiles/mgap/content/audio/source000000014/AUD_0000070000002747.pdf)

Cuore, U., Solari, M.A., Cicero, L., Gayo, V., Nari, A., Trelles, A. (2020). *Tratamiento generacional de la garrapata*. Departamento de Parasitología – DILAVE “Miguel C. Rubino”. Recuperado de [https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/tratamiento\\_generacional\\_de\\_la\\_garrapata.pdf](https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/tratamiento_generacional_de_la_garrapata.pdf)

Drummond, R., Ernest, S., Trevino, J., Gladney, W., y Graham, O. (1973). *Boophilus annulatus and Boophilus microplus: Laboratory test of insecticides*. *Journal of Economic Entomology*, 66, 130-133.

Farias, J.A., Gúlias Gomes, C.C., Minho, A.P., Domingues, R., Macke Franck, B., Leitzke Granada, R., y Pereira de Souza, A. (2016). Comparison of three Larval Immersion Tests in Syringe to evaluate acaricidal activity of chemical solutions. *Ciências Agrárias (Londrina)*, 37(5), 3205-3208.

Fiel, C., y Nari, A. (2013). *Enfermedades Parasitarias de Importancia Clínica y Productiva en Rumiantes*. Buenos Aires: Hemisferio Sur.

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

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

microplus (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 142(3-4), 386–390.

Metcalf R L. 1989. *Insect resistance to insecticides*. *Pesticide Sci* 26, 333-358. Recuperado de <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ps.2780260403>.

Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (2005). *La garrapata común del ganado. Una problemática cada vez más difícil de solucionar*. Recuperado de <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/sites/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/files/documentos/publicaciones/garrapataenelganado.opci25c325b3nveterinarias.pdf>

Nari A, H J Hansen. 1999. Resistencia de los ecto y endoparásitos: soluciones actuales y futuras. 67ª sesión general. *Organización Internacional de Epizootias*. París, Francia.

Nuñez, J., Muñoz, M., y Moltedo, H. (1987). *Boophilus microplus. La garrapata común del ganado vacuno*. Buenos Aires: Hemisferio Sur.

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2003). *Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-y4813s.pdf>

Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (2004). *Module 1. Ticks: acaricide resistance: diagnosis, management and prevention*. Recuperado de <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/010/ag014e/ag014e05.pdf>

RStudio Team (2015). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.

- Ritz, C., Baty, F., Streibig, J.C., y Gerhard D. (2015). Dose-Response Analysis Using R. *PloS One*, 10, e0146021. doi: 10.1371/journal.pone.0146021.
- Riviere, J., y Papich, M. (2018). Macrocyclic Lactones: Endectocide Compounds. En *Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (10<sup>a</sup> ed., pp. 1102-1105). Hoboken: Wiley.
- Rodríguez-Vivas, R., Arieta-Román, R., Pérez-Cogollo, L., Rosado-Aguilar, J., Ramírez-Cruz, G., y Basto-Estrella, G. (2010). Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42, 115-123. Recuperado de [https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2010000300002&script=sci\\_arttext&tlng=e](https://scielo.conicyt.cl/scielo.php?pid=S0301-732X2010000300002&script=sci_arttext&tlng=e)
- Rodríguez-Vivas, R.I., Rosado-Aguilar, J.A., Ojeda-Chi, M.M., Pérez-Cogollo, L.C., Trinidad-Martínez, I., y Bolio-González, M.E. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(3), 295-308.
- Rubio, M.; Boggio, J., 2009. Farmacología Veterinaria. 2a ed., Córdoba, Universidad Católica de Córdoba, pp 641-658.
- Ruiz Malaver, A., y Blanco Niño, R. (2009). *Grado de resistencia del Rhipicephalus Boophilus microplus a productos ixodicidas, y su residualidad en leche en 20 predios del edios del sistema doble propósito del piedemonte llanero* (Trabajo de grado). Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de la Salle, Bogotá.
- Shaw, R. D. (1966). Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. *Bulletin of Entomological Research*, 56, 389-405.
- Shyma, K.P., Gupta, J.P., Singh, V., y Patel, K.K. (2015). In Vitro Detection of Acaricidal Resistance Status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* against Commercial Preparation of Deltamethrin, Flumethrin, and

Fipronil from North Gujarat, India. *Journal of Parasitology Research*, 2015, 506586.

Sindhu, Z.U., Jonsson, N.N., y Iqbal, Z. (2012). Syringe test (modified larval immersion test): a new bioassay for testing acaricidal activity of plant extracts against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 188(3-4), 362-7.

Souza, A.P., Veiga, L.P.H.N., Bellato, V., Sartor, A.A., Cardoso, C.P., y Nunes, A.P.O. (2008). Proposta para teste carrapaticida por imersão de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: avaliação em cipermetrina e amitraz. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 17(4), 242-245.

Stone, B., y Haydock, K. (1962). A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can). *Bulletin of Entomological Research*, 53, (Part. 3), 563-578.

Villar, D., Puerta, J., Lopez, A., y Chaparro, J.J. (2015). Resistencia de tres poblaciones de *Rhipicephalus microplus* a la ivermectina por el ensayo de inmersión de larvas. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, 29(1), 51-57.

Webster, A., Araújo Souza, U., Martins, J.R., Klafke, G., Reck, J., y Schrank, A. (2018). Comparative study between Larval Packet Test and Larval Immersion Test to assess the effect of *Metarhizium anisopliae* on *Rhipicephalus microplus* tick larvae. *Springer International Publishing AG, part of Springer Nature 2018*. <https://doi.org/10.1007/s10493-018-0235-1>

Woodham C B, O A González, L A López, M R Guereña. 1983. *Progresos en la erradicación de las garrapatas Boophilus en México 1960-1980*. *Rev Mund Zoot* 48, 18-24.

Ysamat, J. (2004). *Tratamientos de las Parasitosis en Vacunos de Carne*. Recuperado de [http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad\\_intoxicaciones\\_metabolicos/parasitarias/paras](http://www.produccion-animal.com.ar/sanidad_intoxicaciones_metabolicos/parasitarias/paras)

itarias\_bovinos/36-tratamientos\_parasitosis.pdf. Fecha de consulta:  
27/09/2016