

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



TESE

Perspectivas atuais e futuras do controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e dos agentes por eles transmitidos na bovinocultura.

Sergio Silva da Silva

Pelotas, 2014

SERGIO SILVA DA SILVA

**Perspectivas atuais e futuras do controle do carrapato *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus* e dos agentes por eles transmitidos na bovinocultura**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências (área do conhecimento: Sanidade Animal).

Orientador: Dr. Mário Carlos Araújo Meireles

Co-orientador: Dr. Leandro Quintana Nizoli

Pelotas, 2014

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586p Silva, Sergio Silva da

Perspectivas atuais e futuras do controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e dos agentes por eles transmitidos na bovinocultura. / Sergio Silva da Silva ; Mário Carlos Araújo Meireles, orientador ; Leandro Quintana Nizoli, coorientador. — Pelotas, 2014.

86 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Resistência aos carrapaticidas. 2. Quimioprofilaxia. 3. Resistência imune. 4. Controle biológico. I. Meireles, Mário Carlos Araújo, orient. II. Nizoli, Leandro Quintana, coorient. III. Título.

CDD : 636.089696

Banca examinadora:

Prof. Dr. Mário Carlos Araújo Meireles (Orientador)

Prof. Dr. Carlos Octávio Cordovés Cespedes

Prof. Dr. Leandro Quintana Nizoli

Prof. Dra. Renata Osório de Faria

Às amadas de todos os dias,
Rosa, Duda e Vó Ná (*in memorian*)
Meus símbolos da natureza feminina
Dedico esta Tese

Agradecimentos

Agradeço a Deus e a todas as “forças do Universo”.

À minha família Rosa e Eduarda (Duda), porque apostaram incondicionalmente comigo o tempo todo, respeitando a minha dedicação e preenchendo o real papel de meus grandes e doces amores.

À minha mãe Vó Ná e meu pai Vô Ni, carinhosamente *in memorian* pelo que construíram em cada filho, porque cumpriram além da paternidade e se superaram nesta vocação.

À Universidade Federal de Pelotas, por promover a formação docente e investir nas carreiras no magistério, qualificando seus quadros.

Ao meu orientador Professor Dr. Mário Carlos Araújo Meireles, por ser um dos grandes exemplos na minha proximidade como professor, pesquisador, homem de princípios, e grande construtor de carreiras, por ter me respeitado e ser este amigo que é hoje.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. Leandro Nizoli, que conseguiu de aluno, orientado e aposta pessoal, ter crescido e representar este grande parceiro de equipe, que constrói comigo, diariamente novas apostas profissionais.

Aos meus eternos professores e amigos Dr. Daniel Souza Soares Rassier, *in memorian*, Dr. Hiroaki Nishikawa, Dr. José Vasconcelos Arnoni, pelo legado de seguir as suas obras acadêmicas na Faculdade de Veterinária.

Ao Prof. Dr. Omar Oscar Barriga, *in memorian*, grande mestre na arte de estimular pessoas à carreira acadêmica e exemplo de paternidade científica.

Ao meu eterno orientador Prof. Dr. Luiz Shozo Ozaki, que começou comigo esta aposta de doutorado em Biologia Molecular no passado, lamentavelmente interrompida por um inevitável, mas revigorante e renovador acidente automobilístico. O compromisso renasceu a cada dia nas últimas três décadas de convívio e de confiança.

Ao meu amigo particular Dr. Carlos Otávio Céspedes Cordovés, que me ensinou muito nestas últimas décadas por sua capacidade técnica, colaboração e imensurável crítica para construção de estratégias fortes.

Em muito especial à minha equipe de Doutorandos, Mestrandos, Residentes, Estagiários, Bolsistas e amigos do LADOPAR, sem personaliza-los numa lista de mais de 60 nomes, porque todos são muito especiais, que ao assumirem seus postos com muita personalidade têm garantido os nossos crescimentos mútuos.

À Dra. Flavia Biasoli Araújo, pela dedicação e seu suporte nos cultivos fúngicos, juntamente com a Equipe qualificada do Laboratório de Micologia com a colaboração da Professora Dra. Renata Osório de Faria, Luiza Osório, Ângela Cabana e todos que nos bastidores construíram resultados dignos de comemoração, reforçando a abertura de uma alternativa de controle biológico para parasitoses animais na Faculdade de Veterinária.

Aos colegas, à coordenação, à secretária Daiane Amaral, e ao colegiado do Curso de Pós-Graduação em Veterinária da UFPel pelas suas dedicações, integridades e responsabilidades.

Aos colegas do Laboratório de Doenças Parasitárias Professora Dra. Tânia Regina Bettin dos Santos e Diego Moscarelli Pinto, técnicos Carlos Brião, Alegani Monteiro e aos demais colegas do Departamento de Veterinária Preventiva e Direção pelo aval na carreira.

Resumo

SILVA, Sergio Silva da. **Perspectivas atuais e futuras do controle do carrapato dos bovinos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e dos agentes por eles transmitidos**. 2015. 86 f. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

As infestações pelo carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e os agentes hematozoários transmitidos por ele, compõem o chamado complexo carrapato-tristeza parasitária, que representa um dos maiores entraves para o desenvolvimento da pecuária bovina nacional. O presente trabalho descreve um conjunto de experimentos relacionados às estratégias de controle do complexo como controle químico com um estudo prospectivo da distribuição da resistência química em populações de *R. B. microplus* no Rio Grande do Sul, controle quimioprolático com uso de drogas para controle da tristeza parasitária subclínica em bovinos na melhoria do ganho de peso, controle genético pela avaliação da resistência genética contra carrapatos e controle biológico de carrapatos utilizando fungos com efeito entomopatogênico. Foram coletadas amostras de carrapatos de 55 propriedades de 21 municípios do Rio Grande do Sul e submetidas ao teste de Drummond para demonstrar o perfil de sensibilidade aos princípios ativos de carrapaticidas usuais para tratamento de infestações; Foram submetidos lotes de bovinos da raça angus desmamados à aplicação de quimioprofilaxia contra a tristeza parasitária subclínica à base de diaceturato de diminazeno, oxitetraciclina e dipropionato de imidocarb, com controle hematológico e de ganho de peso; Foram infestados artificialmente dois lotes de 20 novilhas selecionadas geneticamente por controles fenotípicos e genotípicos de resistência aos carrapatos e mensuradas as características fisiológicas dos carrapatos como número e peso de carrapatos, massa de oviposição, índice de eficiência reprodutiva e índice de eficiência nutricional; Foram coletadas amostras de fungos autóctones, cultivados, caracterizados e utilizados para produzir infecção em carrapatos com mensuração dos efeitos entomopatogênico dos isolados sobre larvas de carrapatos. Foi demonstrada distribuição de mais de 70,0% de populações de carrapatos com resistência a no mínimo um princípio ativo e 41,8% com resistência múltipla com risco alto de dispersão entre propriedades; O uso de protocolos quimioproláticos promoveu aumento no ganho de peso dos bovinos de 146%. Os bovinos geneticamente resistentes e sensíveis produziram carrapatos com peso inicial de teleóginas de 0,204g e 0,202g; peso de postura de 0,097g e 0,109g; peso das quenógenas de 0,044 e 0,045g; Índice de Eficiência Reprodutiva de 47,7% e 52,5%; Índice de Eficiência Nutricional de 54,3% e 66,4%, respectivamente; As colônias fúngicas produziram infecção natural com mortalidade variada de larvas carrapatos infectadas. Conclusões: A resistência às drogas carrapaticidas apresenta ampla e crescente distribuição no Rio Grande do Sul, com alto grau de risco de dispersão entre propriedades pecuárias; A quimioprofilaxia para tristeza parasitária bovina, pode ser recomendada como importante ferramenta de manejo para aceleração de crescimento e acabamento de carcaças em bovinos super precoces

destinados ao abate; A resistência genética de bovinos é um importante fator para a redução das infestações por carrapatos e pode ser utilizada como um dos critérios de seleção de reprodutores destinados para a produção pecuária em regiões endêmicas de infestações por carrapatos; Os fungos autóctones com efeito entomopatogênico representam importantes controladores de infestações por carrapatos e devem ser melhor estudados para contribuição nas estratégias de controle integrado. Conclusões Gerais: A integração de medidas de controle biológico com microorganismos entomopatogênicos com o controle genético visando a adequação de perfis imunológicos dos reprodutores associados ao controle químico vigiado e monitorado deverá ser reforçada com estratégia.

Palavras-Chave: resistência aos carrapaticidas, quimioprofilaxia, resistência imune, controle biológico.

Abstract

SILVA, Sergio Silva da. **Current and future prospects for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and tick borne agents to the cattle**. 2015. 86 f. Thesis (Doctor Degree in Science) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestations in cattle, and tick borne agents, comprise the complex called tick and tick borne diseases, which represents one of the biggest obstacles to the development of domestic cattle. This paper describes a set of experiments related to the complex control strategies such as chemical control with a prospective study of the distribution of chemical resistance in populations of *R.B. microplus* in Rio Grande do Sul, chemoprophylactic control with using drugs to control subclinical tick fever in cattle improving the weight gain, the evaluation genetic control of genetic resistance against tick infestation and tick control using entomopathogenic fungi. Samples of ticks from 55 properties of 21 municipalities in Rio Grande do Sul and submitted to the Drummond test were collected to demonstrate the sensitivity of the acaricides drugs; Cattle angus breed weaned were treated with chemoprophylaxis protocols against subclinical TBD based on diacetate of diminazene, oxytetracycline and dipropionate imidocarb submitted to hematological and weight gain analysis. Were genetically selected two batches of heifers resistant and susceptible to tick and infested under field conditions Tick physiological parameters were measured; Samples of native fungi isolates grown, characterized and used to infect tick larvae and entomopathogenic effect were measured. Distribution of more than 70.0% of tick populations with resistance to at least one active ingredient and 41.8% with multiple resistance at high risk of spreading risk among properties was demonstrated; The use of chemoprophylactic protocols promoted an increase in weight gain of 146%. The cattle genetically resistant and susceptible cattle ticks produced statistical differences between tick parameters; The fungal isolates produced naturally infected with varied larvae mortality of infected ticks. Conclusions: Drug acaricide resistance presents large and growing distribution in Rio Grande do Sul, with a high degree of risk dispersion between farms; A chemoprophylaxis, can be recommended as an important management tool to accelerate growth and finishing of castings in super early cattle for slaughter; The genetic resistance of cattle is an important factor for reducing infestation by ticks and can be used as a criterion for selection of bulls destined for livestock production in endemic areas of infestation by ticks; Indigenous fungi with entomopathogenic effects represent important drivers of infestation by ticks and should be better studied to contribute in integrated control strategies. General Conclusions: The integration of biological control strategy using pathogenic microorganisms with the genetic control aimed at adapting the immunological profiles of the players associated with chemical control should be watched and monitored with enhanced strategy.

Keywords: resistance to acaricides; chemoprophylaxis, bovine genetic resistance; biological control.

Lista de Figuras

Figura 1	Faturamento do setor de insumos para a saúde animal nos últimos 6 anos no Brasil. (Fonte: SINDAN).....	15
Figura 2	Distribuição de faturamento do setor de insumos para a saúde animal nos últimos 6 anos no Brasil caracterizado por classes terapêuticas. (Fonte: SINDAN).....	16
Figura 3	Distribuição de faturamento do setor de insumos para a saúde animal nos últimos 6 anos no Brasil caracterizado por espécies animais. (Fonte: SINDAN).....	16
Artigo 3	Bovine genetic tick resistance effects on biological traits of <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	
Figura 1	Mean (\pm SE bars) tick count according to infestation and genetic tick-resistance group. Asterisks indicate difference between resistant (R) and susceptible (S) heifers ($P < 0.0001$).....	64
Figura 2	Effect of bovine genetic resistance on posture weight least square mean (\pm SE) of ticks registered in genetically tick-resistant (R) and tick-susceptible (S) Braford heifers over four artificial infestations. Different small letters indicate difference ($P < 0.05$) within the same tick resistance group between artificial infestations. Asterisks indicate difference between R and S ($*P < 0.05$).....	65

Figura 3	Effect of bovine genetic resistance on reproductive efficiency index least square mean (\pm SE) of ticks registered in genetically tick-resistant (R) and tick-susceptible (S) Braford heifers over four artificial infestations. Different small letters indicate difference ($P < 0.05$) within the same tick resistance group between artificial infestations. Asterisks indicate difference between R and S ($***P < 0.0001$).....	66
Figura 4	Effect of bovine genetic resistance on nutritional efficiency index least square mean (\pm SE) of ticks registered in genetically tick-resistant (R) and tick-susceptible (S) Braford heifers over four artificial infestations. Different small letters indicate difference ($P < 0.05$) within the same tick resistance group between artificial infestations. Asterisks indicate difference between R and S ($***P < 0.0001$).....	67
Figura 5	Posture weight as a function of the initial weight of ticks engorged in genetically tick-susceptible (S) and tick-resistant (R) Braford heifers..	68
Artigo 4	Avaliação in vitro do efeito entomopatogênico de isolados fúngicos sobre larvas de carrapatos <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	
Figura 1	Análise da comparação da mortalidade de larvas de <i>R. B. microplus</i> entre os grupos desafiados com diferentes isolados fúngicos e controle com água destilada estéril por diferentes períodos de incubação in vitro.....	83

Lista de Tabelas

Artigo 1 Controle Químico de Carrapatos: Estudo prospectivo da distribuição da resistência química em populações de Rhipicephalus (Boophilus) microplus no Rio Grande do Sul

Tabela 1	Relação de grupos químicos, princípios ativos e nomes comerciais de carrapaticidas utilizados nos testes de diagnóstico de sensibilidade amostras de carrapatos pela Técnica de Drummond et al.(1973).....	24
Tabela 2	Total de populações de carrapatos testados pelo Teste de Drummond et al.(1973) por município e a frequência das populações resistentes a pelo menos um grupo químico, de 2012 a 2014.....	25
Tabela 3	Relação das populações de carrapatos testados pelo Teste de Drummond et al.(1973) por município e a frequência das populações resistentes para cada grupo químico, de 2012 a 2014....	26
Tabela 4	Total de populações de carrapatos testados pelo Teste de Drummond et al.(1973) por município e a frequência das populações resistentes com resistência múltipla no RS, de 2012 a 2014.....	27

Artigo 2 Assessing different chemoprophylactic protocols against bovine tick-borne diseases and their influence on the weight gain calves

Tabela 1	Mean (\pm Standard Deviation) ADG observed on days zero, 15, and 34, of calves treated with different chemoprophylactic protocols against bovine TBDs in the municipality of Capão do Leão-RS.....	38
Tabela 2	Mean ADG for the entire experimental period, of calves treated with different chemoprophylactic protocols against bovine TBDs in the municipality of Capão do Leão-RS.....	39

Tabela 3	Mean (\pm Standard Deviation) PCV observed on days zero, 15, and 34, of calves treated with different chemoprophylactic protocols against bovine TBDs in the municipality of Capão do Leão-RS.....	40
Artigo 3	Bovine genetic tick resistance effects on biological traits of <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	
Tabela 1	Least square (LS) means and 95% confidence interval (CI) of engorged tick biological traits in genetically tick-resistant and tick-susceptible artificially infested Braford heifers.....	62
Tabela 2	Correlation among engorged tick biological traits obtained from genetically tick-resistant (R) and tick-susceptible (S) artificially infested Braford heifers.....	63
Artigo 4	Avaliação in vitro do efeito entomopatogênico de isolados fúngicos sobre larvas de carrapatos <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	
Tabela 1	Análise da comparação da mortalidade de larvas de R. B. microplus entre os grupos desafiados com <i>Aspergillus</i> sp SCB 02, <i>Metarhizium anisopliae</i> SCB 09 e controle com água destilada estéril por diferentes períodos de incubação in vitro.....	82
Tabela 2	Análise da comparação da mortalidade de larvas de R. B. microplus entre os grupos desafiados com <i>Beauveria bassiana</i> SCB 12 e SCB 17 e controle com água destilada estéril por diferentes períodos de incubação in vitro.....	82
Tabela 3	Análise do crescimento radial em mm de reisolados fúngicos oriundos de desafio em larvas de R. B. microplus após 72 horas em meio de cultura por diferentes períodos de incubação.....	83

Lista de Abreviaturas

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio
cm - Centímetro
cm² - Centímetro quadrado - unidade de área
CPG – Clamidósporos por grama de fezes
g – Grama (s)
GMD – ganho médio diário
Kg – Quilograma
m - Metro
mL – Mililitro
mm - milímetros
mm³ - Milímetro cúbico
mmHg – Milímetros de Mercúrio
°C – Graus Celsius
OPG – Ovos por grama de fezes
PDA – Ágar Potato Dextrose
PV – Peso vivo
r – coeficiente de regressão
RS – Rio Grande do Sul
T - Temperatura
UFPeI – Universidade Federal de Pelotas
URA – Umidade relativa do ar

Sumário

1. Introdução.....	15
2. Objetivos.....	20
2.1 Objetivos específicos.....	20
3. Artigos.....	21
3.1 Artigo 1 Controle químico de carrapatos: estudo prospectivo da distribuição da resistência química em populações de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> no Rio Grande do Sul.....	21
3.2 Artigo 2 Assessing different chemoprophylactic protocols against bovine tick-borne diseases and their influence on the weight gain calves.....	30
3.3 Artigo 3 Bovine genetic tick resistance effects on biological traits of <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	41
3.4 Artigo 4 Avaliação <i>in vitro</i> do efeito entomopatogênico de isolados fúngicos sobre larvas de carrapatos <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	69
4. Conclusão geral.....	84
5. Referências.....	85

1 INTRODUÇÃO

A pecuária nacional tem se destacado como a mais promissora na produção de carnes destinadas à exportação, para atendimento ao consumo mundial crescente e a dificuldade de outros países manterem a produção para o atendimento de suas demandas internas. As infestações parasitárias causadas por artrópodos, vermes, protozoários e riquétsias representam as etiologias por agentes que requerem os maiores consumos de medicamentos, vacinas e insumos para os controles. Segundo o SINDAN (Sindicato Nacional da Indústria de Produtos para a Saúde Animal), o volume comercializado de produtos destinados à pecuária supera a cifra de mais de R\$3.956.000,00 ao ano (Fig. 1), onde cerca de 25% deste valor é destinado ao tratamento e controle das parasitoses de um rebanho de cerca de 200.000.000 de cabeças entre rebanhos de corte e leiteiros.

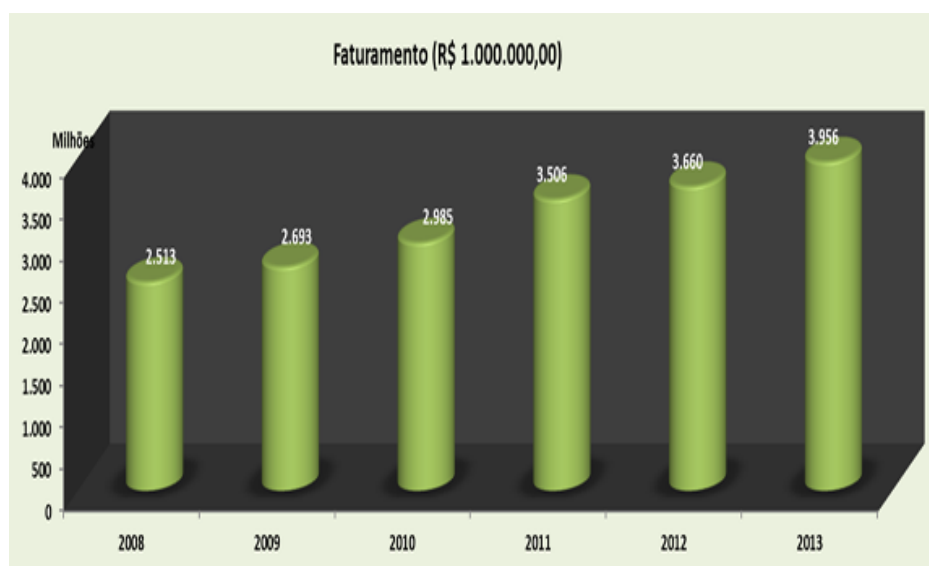


Figura 1. Faturamento do setor de insumos para a saúde animal nos últimos 6 anos no Brasil. (Fonte: SINDAN)

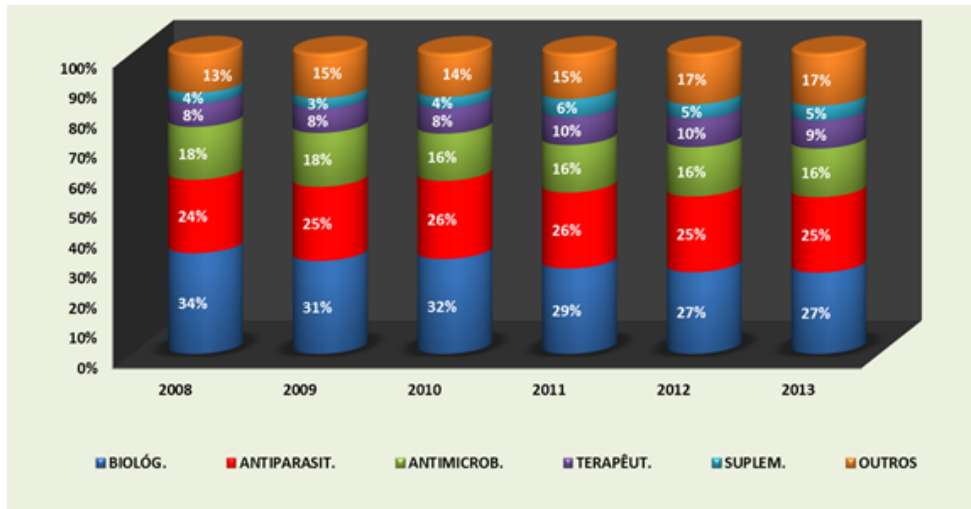


Figura 2. Distribuição de faturamento do setor de insumos para a saúde animal nos últimos 6 anos no Brasil caracterizado por classes terapêuticas. (Fonte: SINDAN)

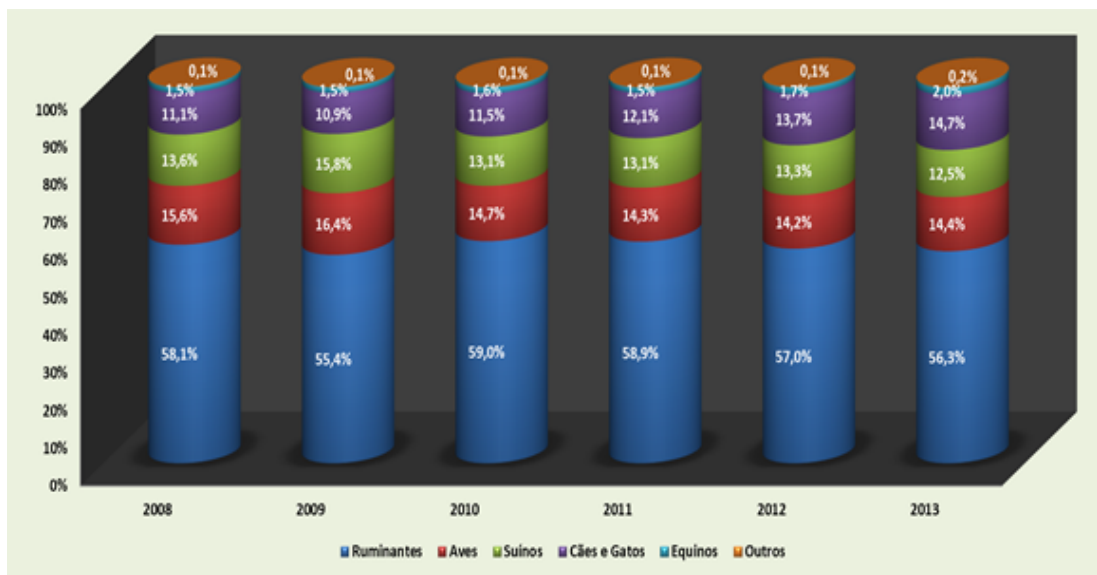


Figura 3. Distribuição de faturamento do setor de insumos para a saúde animal nos últimos 6 anos no Brasil caracterizado por espécies animais. (Fonte: SINDAN)

O mercado de produtos destinados à saúde e à nutrição animal tem crescido gradualmente nas últimas décadas, em maiores proporções ao aumento dos rebanhos nacionais (WOOD MACKENZIE, 2007). As empresas fabricantes de medicamentos e insumos tem se dedicado à elaboração de produtos (AHMED &

KASRAIAN, 2002), em diferentes classes terapêuticas (Fig. 2), que demandam cada vez mais de capacitação técnica para a sua indicação e comercialização (PERRY et al. 2002, GEARY et al. 2004.). Esta demanda tem ressaltado a necessidade de intervenção técnica de médicos veterinários (MCKELLAR & JACKSON, 2004; SCHILLHORN VAN VEEN, 1999), seja para orientação e instrução nos estabelecimentos comerciais, como lojas agropecuárias, quanto em propriedades rurais e empresas pecuárias para produtores rurais (WALLER, 2006), para as diversas espécies animais (Fig.3).

Dentre as parasitoses que acometem os animais domésticos destinados à produção, as infestações por carrapatos e os agentes transmitidos por eles, destacam-se como as mais importantes do ponto de vista econômico, demandando grandes esforços públicos oficiais e privados por parte de produtores rurais e técnicos do setor agropecuário.

As infestações pelo carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e os agentes hematozoários transmitidos por ele, compõem o chamado complexo carrapato-tristeza parasitária, que representa um dos maiores entraves para o desenvolvimento da pecuária bovina nacional.

Os carrapatos ocorrem naturalmente infestando rebanhos bovinos e são importantes ectoparasitos hematófagos que causam danos aos seus hospedeiros tanto pela ação espoliadora e ingestão de sangue quanto pela transmissão de agentes patogênicos, sendo também responsáveis por elevados gastos com produtos carrapaticidas, mão-de-obra e equipamentos para o controle (CORDOVÉS, 1997). O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é o principal agente causador de infestações por artrópodes em bovinos e é responsável por grandes perdas econômicas na pecuária bovina. O carrapato é um ácaro que causa sérios prejuízos econômicos, como perdas na produção de leite, carne e couro (KISS et al., 2012; MARQUES et al., 2000). Além dos prejuízos econômicos diretos, o carrapato também é vetor de *Anaplasma* spp e de *Babesia* spp., agentes etiológicos da Tristeza Parasitária Bovina (GUGLIELMONE, 1995).

Biologicamente os carrapatos *R. (B.) microplus*, são monoxenos, ou seja, desenvolvem todo o seu ciclo biológico num único hospedeiro, e compreendem uma fase de vida livre e outra fase de vida parasitária. A fase parasitária tem início com a

fixação das larvas infestantes no hospedeiro, que se transformarão em teleógenas, as quais fazem postura no solo, fechando o ciclo. As teleógenas chegam a ingerir de 2 a 3 mL de sangue durante sua vida parasitária e transformam cerca de 60% de sua massa corporal em ovos, que em média, chegam a produzir em torno de 3.000 larvas. Um grama de ovos de *R. (B.) microplus* contém cerca de 20.000 ovos (BARRIGA et al., 1995).

O uso de compostos químicos sintéticos tem sido o principal meio no controle de carrapatos. Apesar de sua significativa contribuição, o uso intensivo e indiscriminado destes produtos favoreceu o surgimento da resistência a esses fármacos e não conseguiu eliminar os problemas já existentes. Além disso, são altamente tóxicos, sendo prejudiciais ao ambiente e à saúde humana.

A resistência do *R. (B.) microplus* aos acaricidas frente aos fármacos e as diferentes condições de manejo vêm sendo pesquisadas. O quadro atual do controle químico do carrapato se caracteriza pelo aumento progressivo do número de cepas resistentes aos principais acaricidas utilizados e, conseqüentemente, por um aumento na frequência da aplicação (FURLONG et al., 2007). Frente ao uso indiscriminado desses fármacos, o controle biológico com fungos torna-se uma alternativa a ser empregada em formulações biológicas para o controle dessas infestações (GARCIA et al., 2011).

Dentre os controladores biológicos tem sido relatados como muito importantes os próprios hospedeiros, por suas características genéticas de resposta às infestações, plantas, animais silvestres como aves, insetos, bactérias, protozoários e fungos. Os controladores biológicos à base de microorganismos que agem nas formas de vida livre dos parasitas presentes no ambiente têm demonstrado potencial promissor (LEEMON et al., 2012). Quanto a essa forma de controle na espécie do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, já foram estudadas no Brasil algumas espécies de fungos, como o *Metarhizium anisopliae*, que foi avaliado em laboratório por fungos nematófagos como *Duddingtonia flagrans* (BRAGA et al., 2010; QUINELATO et al., 2012). Vários outros trabalhos promissores com relação ao controle biológico de carrapatos com fungos entomopatogênicos tem sido descritos (FRAZZON et al., 2000; MARLON et al., 2006; REIS, 2008; BARCI et al., 2009; CAMARGO et al., 2012; FERNANDES et al., 2012). Assim, o potencial de efeito entomopatogênico de isolados fúngicos sobre isolados de carrapatos regionais

em diferentes fases de vida parasitária e vida livre tem estimulado o desenvolvimento do presente trabalho (SILVA et al., 2013, dados não publicados).

2 OBJETIVOS

Demonstrar diferentes sistemas de controle de carrapatos e de agentes hematozoários transmitidos por eles que produzem impacto na pecuária bovina, por uso de drogas, características genéticas de bovinos e efeitos entomopatogênico de microrganismos fúngicos.

2.1 Objetivos específicos

- 1- Ensaio 1: Estudar o perfil de resistência aos carrapaticidas químicos de diversas populações de carrapatos *R. (B.) microplus* no Estado do Rio Grande do Sul, submetidas a testes de laboratório;
- 2- Ensaio 2: Testar o uso de um protocolo quimioprofilático no controle da babesiose e anaplasmose subclínica no ganho de peso de terneiros desmamados;
- 3- Ensaio 3: Avaliar o efeito da resistência genética de bovinos com infestações artificiais de carrapatos *R. (B.) microplus*;
- 4- Ensaio 4: Avaliar o efeito entomopatogênico de fungos sobre larvas de carrapatos *R. (B.) microplus*.

3 ARTIGOS

3.1. Artigo 1

Controle Químico de Carrapatos: Estudo prospectivo da distribuição da resistência química em populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Rio Grande do Sul.

SILVA, S.S.; MARMITT, I.P.; CHAGAS, B.C.; NUNES, A.G.; NIEDERMEYER, F.;
ARAUJO, F.B.; NIZOLI, L.; CORDOVÉS, C.O.; SILVA, E.F.; MEIRELES, M.C.

O artigo está em fase de submissão à Revista Science and Animal Health (UFPel)

Controle Químico de Carrapatos: Estudo prospectivo da distribuição da resistência química em populações de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* no Rio Grande do Sul.

SILVA, S.S.; MARMITT, I.P.; CHAGAS, B.C.; NUNES, A.G.; NIEDERMEYER, F.; ARAUJO, F.B.; NIZOLI, L.; CORDOVÉS, C.O.; SILVA, E.F.; MEIRELES, M.C.

Introdução

Na produção de bovinos, a necessidade de um aumento de produtividade, devido ao menor volume de terras disponíveis para a atividade, já é realidade ao redor de quase todo o mundo. Buscando cumprir a necessidade de aumentar manter a produtividade neste ramo de atividade, controlar as pragas e os entraves da produção são uma necessidade sempre em vigência. O carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é um parasita de bovinos, que é prevalente em todos os continentes ao longo dos trópicos (CORDOVÉS, 1997). Este parasita têm sido descrito como o principal causador de prejuízos produtivos na bovinocultura brasileira pela considerável redução na produção de leite, redução na natalidade, gastos elevados com carrapaticidas, perdas de peso, gastos com mão-de-obra utilizada para o seu controle, e perdas na qualidade do couro (GOMES, 2004). Na década anterior somente no Brasil o carrapato do boi causava prejuízos estimados da ordem de US\$ 2 bilhões ao ano (GRISI et al., 2002).

O parasitismo pelo *R. (B.) microplus* pode causar danos no couro e miíases (MARQUES et al., 2000), perda de peso e apatia, e anemia devido a espoliação sanguínea, e inclusive levar a morte. Além da espoliação sanguínea, o carrapato é responsável por transmitir agentes patogênicos causadores de doenças graves como as babesias (DALGLIESH; STEWART, 1983) e *Anaplasma marginale* (GUGLIELMONE, 1995; KESSLER, 2001), agentes etiológicos de uma síndrome conhecida como Tristeza Parasitária Bovina, que é grande causadora de mortes no Brasil, especialmente nas regiões onde a população de carrapatos oscila durante o ano (SACCO, 2002; SCHILD et al., 2008).

O controle do carrapato, realizado pelos produtores, é feito primariamente pela utilização de carrapaticidas químicos. Visando diminuir o uso de produtos químicos na produção têm sido estudados e também já aplicadas na prática, controle de carrapato com estratégias imunológicas (CARREÓN et al., 2012; GARCIA-GARCIA et al., 2000). Também têm se buscado melhorar a resposta do hospedeiro frente ao parasito, com campanhas de melhoramento de raças frente ao parasitismo por carrapatos (BIEGELMEYER et al., 2012). Utilizar estratégias já presentes na natureza, como o uso de predadores naturais do carrapato também são uma forma de potencializar o controle do carrapato a nível de campo. O uso de fungos com

ação nematofágica tem sido discutido, estudado e aplicado na pecuária bovina (FERNANDES et al., 2012).

Os métodos alternativos de controle têm sido mais utilizados e estudados nesta última década, devido ao crescente número de relatos de populações resistentes aos carrapaticidas químicos (FURLONG et al., 2007). Nas décadas de 1960 e 1970 Gonzales (1973) e Laranja (1988) já relatavam, no Rio Grande do Sul a resistência a organofosforados e piretróides sintéticos, respectivamente. No Brasil, os carrapaticidas injetáveis, lançados na década de 80, já apresentavam resistência desde a década de 90 (MARTINS; FURLONG, 2001). Os últimos fármacos carrapaticidas lançados no mercado, como os princípios à base de benzoilfeniluréia, já apresentam relatos de resistência, no estado do Rio Grande do Sul, pela primeira vez no mundo (RECK et al., 2014).

Para adotar melhores medidas de controle, entender como funciona a resistência aos carrapaticidas químicos, e saber se a distribuição das populações com perfil de resistência aos carrapaticidas químicos está disseminada, ou são somente casos esparsos ao longo de diversas propriedades, é necessário a realização de estudos regionais abrangentes.

Este trabalho teve por objetivo estudar o perfil de resistência aos carrapaticidas químicos de diversas populações de carrapatos no estado do Rio Grande do Sul, submetidas a testes de laboratório, de 2012 a 2014.

Material e Métodos

Durante o período de janeiro de 2012 a maio de 2014, utilizaram-se as amostras de carrapatos de bovinos, colhidas por veterinários de campo e pesquisadores, que foram submetidas para testes de sensibilidade a diferentes drogas. As amostras foram remetidas ao Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel).

Para fins de comparação e avaliação da resistência aos carrapaticidas de contato, foram padronizadas para todas as populações analisadas, a realização do teste com os mesmos grupamentos químicos, princípios ativos e nomes comerciais, que estão descritos na tabela 1. Todos os produtos utilizados foram testados segundo dosagens e recomendações de bula dos fabricantes.

Tabela 1. Relação de grupos químicos, princípios ativos e nomes comerciais de carrapaticidas utilizados nos testes de diagnóstico de sensibilidade amostras de carrapatos pela Técnica de Drummond et al.(1973).

Grupo Químico	Princípio Ativo	Nome Comercial
Formamidas	Amitraz	Triatox
Formamidas	Amitraz	Amipur
Formamidas	Amitraz	Tac Plus
Piretróides	Cipermetrina	Sarcolin
Piretróides	Deltametrina	Butox
Organofosforados	Diclorvós + Clorpirifós	Éctofós
Organofosforados	DDVP + Clorfenvinfós	Carbeson
Piretróides + Organofosforados	Cipermetrina + Clorpirifós + Citronelal	Colosso
Piretróides + Organofosforados	Cipermetrina + Clorpirifós + Citronelal + BPO	Cyperclor Plus
Piretróides + Organofosforados	Cipermetrina + Clorpirifós	Ciclorfós

Todas as populações de carrapatos que chegavam ao laboratório eram identificadas segundo o seu município de origem, propriedade rural, históricos de dosificações anti-helmínticas e queixas de resistência aos princípios ativos já utilizados.

O ensaio de sensibilidade às drogas foi utilizado somente com as teleóginas ingurgitadas e vivas, para a realização do teste de imersão em carrapaticidas preconizado por Drummond et al. (1973). Para fins de análise, os testes com populações de carrapatos com interferência nos grupos controle, onde a mortalidade das teleóginas aos 14 dias foi maior ou igual a 20%, foram descartados do estudo. Considerou-se a população com resistência ao grupamento químico, aquela que frente a pelo menos um dos produtos utilizados, apresentou eficácia menor de 70%. Para considerar a população com resistência múltipla, estipulou-se que a mesma deve apresentar perfil de índice de eficácia menor que 70% em pelo menos um produto em cada grupo químico, e em no mínimo dois grupos químicos testados.

Os resultados foram coletados, planilhados e organizados segundo as ferramentas de estatística descritiva do Software Statistix 9.0.

Resultados e Discussão

No período do estudo, o laboratório recebeu amostras de 74 populações de carrapatos diferentes, utilizou-se para este estudo 55 populações de carrapatos, representando 74,3% das amostras remetidas. As populações descartadas do estudo foram principalmente devido a falhas na coleta e conservação da amostra, número insuficiente de teleóginas e instares inadequados para o teste de imersão (partenóginas e ninfas). Isto sugere que mesmo entre os veterinários e técnicos de campo existem falhas no conhecimento de remessa de amostras, funcionamento do teste de imersão de teleóginas e ou desconhecimento sobre os diferentes instares e fases do ciclo do carrapato.

As 55 populações testadas e utilizadas no estudo, foram provenientes de 21 diferentes municípios do estado do Rio grande do Sul, e 43 (78,2%) apresentaram diferentes graus de resistência, a pelo menos um grupamento químico. O número de testes realizados por município, e o percentual de testes que apresentaram resistência a pelo menos um grupo químico estão evidenciados na Tabela 2.

Tabela 2. Total de populações de carrapatos testados pelo Teste de Drummond et al.(1973) por município e a frequência das populações resistentes a pelo menos um grupo químico, de 2012 a 2014.

Município	Número de Testes	Testes que apresentaram diferentes graus de resistência
Aceguá	3	100% (3/3)
Arroio Grande	3	100% (3/3)
Caçapava do Sul	2	100% (2/2)
Candiota	1	100% (1/1)
Canguçu	7	85,7% (6/7)
Capão do Leão	2	100% (2/2)
Cerrito	1	0% (0/1)
Charqueadas	1	100% (1/1)
Cristal	1	100% (1/1)
Dom Pedrito	5	80,0% (4/5)
Herval	4	75,0% (3/4)
Jaguarão	1	0% (0/1)
Pedras Altas	4	75,0% (3/4)
Pedro Osório	2	0% (0/2)
Pelotas	6	66,7% (4/6)
Pinheiro Machado	1	0% (0/1)
Piratini	5	80,0% (4/5)
Rio Grande	2	100% (2/2)
Rio Pardo	2	100% (2/2)
São Gabriel	1	100% (1/1)
Viadutos	1	100% (1/1)
Total	55	78,2% (43/55)

O grupo de carrapaticidas químicos das formamidinas foi o que total e relativamente, apresentou mais populações resistentes aos seus produtos testados, com 37 populações (67,3%) apresentando índices de eficácia carrapaticida indicativos de resistência. Os Piretróides apresentaram 21 populações com resistência (38,2%). As associações de Piretróides com organofosforados apresentaram 12 populações com resistência aos seus produtos testados (21,8%). Já os Organofosforados apresentaram o menor índice total e relativo de populações resistentes aos seus produtos, com 11 casos (20%). Os índices de testes que apresentaram resistência a cada grupamento químico em cada município das amostras estudadas, estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Relação das populações de carrapatos testados pelo Teste de Drummond et al.(1973) por município e a frequência das populações resistentes para cada grupo químico, de 2012 a 2014.

Município	Testes	Resist. Piretróides	Resist. Organofosforados	Resist. Organofosf. + Piret.	Resist. Formamidinas
Aceguá	3	0 (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	100% (3/3)
Arroio Grande	3	33,3% (1/3)	33,3% (1/3)	33,3% (1/3)	100% (3/3)
Caçapava do Sul	2	100% (2/2)	0% (0/2)	50% 1	100% (2/2)
Candiota	1	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	100% (1/1)
Canguçu	7	42,9% (3/7)	0% (0/7)	28,6% (2/7)	57,1% (4/7)
Capão do Leão	2	100% (2/2)	50,0% (1/2)	50,0% (1/2)	50,0% (1/2)
Cerrito	1	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
Charqueadas	1	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	100% (1/1)
Cristal	1	100% (1/1)	100% (1/1)	0% (0/1)	100% (1/1)
Dom Pedrito	5	40,0% (2/5)	40,0% (2/5)	20,0% (1/5)	80,0% (4/5)
Herval	4	50,0% (2/4)	0% (0/4)	0% (0/4)	75,0% (3/4)
Jaguarão	1	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
Pedras Altas	4	50,0 % (2/4)	50,0% (2/4)	25,0% (1/4)	50,0% (2/4)
Pedro Osório	2	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)	0% (0/2)
Pelotas	6	16,7% (1/6)	16,7% (1/6)	33,3% (2/6)	50,0% (3/6)
Pinheiro Machado	1	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
Piratini	5	40,0% (2/5)	40,0% (2/5)	40,0% (2/5)	80,0% (4/5)
Rio Grande	2	50,0% (1/2)	50,0% (1/2)	0% (0/2)	100% (2/2)
Rio Pardo	2	50,0% (1/2)	0% (0/2)	50,0% (1/2)	100% (2/2)
São Gabriel	1	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	100% (1/1)
Viadutos	1	100% (1/1)	0% (0/1)	0% (0/1)	0% (0/1)
Total	55	38,2% (21/55)	20,0% (11/55)	21,8% (12/55)	67,3% (37/55)

As populações testadas, que apresentaram resistência a mais de um grupo químico (resistência múltipla) ultrapassaram os 40%. O número de populações com resistência múltipla por município, e a frequência desta ocorrência, estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4. Total de populações de carrapatos testados pelo Teste de Drummond et al.(1973) por município e a frequência das populações resistentes com resistência múltipla no RS, de 2012 a 2014.

Município	Testes	Resistência Múltipla
Aceguá	3	0% (0/3)
Arroio Grande	3	66,7% (2/3)
Caçapava do Sul	2	100% (2/2)
Candiota	1	0% (0/1)
Canguçu	7	42,9% (3/7)
Capão do Leão	2	100% (2/2)
Cerrito	1	0% (0/1)
Charqueadas	1	0% (0/1)
Cristal	1	100% (1/1)
Dom Pedrito	5	60,0% (3/5)
Herval	4	50,0% (2/4)
Jaguarão	1	0% (0/1)
Pedras Altas	4	25,0% (1/4)
Pedro Osório	2	0% (0/2)
Pelotas	6	50,0% (3/6)
Pinheiro Machado	1	0% (0/1)
Piratini	5	40,0% (2/5)
Rio Grande	2	50,0% (1/2)
Rio Pardo	2	50,0% (1/2)
São Gabriel	1	0% (0/1)
Viadutos	1	0% (0/1)
Total	55	41,8% (23/55)

Conclusão

Mais de 70% das populações testadas apresentaram resistência a pelo menos um grupo químico, enquanto que 41,8% apresentaram resistência múltipla. A resistência às drogas carrapaticidas apresenta ampla distribuição no Rio Grande do Sul, com alto grau de risco de dispersão pelo crescente trânsito legal entre propriedades de produção pecuária.

Referências Bibliográficas

BIEGELMEYER, P.; NIZOLI, L. Q.; CARDOSO, F. F.; DIONELLO, N. J. L. Aspectos da resistência de bovinos ao carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Archivos de Zootecnia**, v. 61 (R), p. 1-11, 2012.

CARREÓN, D.; DE LA LASTRA, J. M. P.; ALMAZÁN, C. et al. Vaccination with BM86, subolesin and akirin protective antigens for the control of tick infestations in white tailed deer and red deer. **Vaccine**, v. 30, n. 2, p. 273-9, 2012.

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

DALGLIESH, R. J.; STEWART, N. P. The use of tick transmission by *Boophilus microplus* to isolate pure strains of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* from cattle with mixed infections. **Veterinary parasitology**, v. 13, p. 317-323, 1983.

FERNANDES, É. K. K.; BITTENCOURT, V. R. E. P.; ROBERTS, D. W. Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. **Experimental parasitology**, v. 130, n. 3, p. 300-5, 2012.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R.; PRATA, M. C. DE A. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? **A Hora Veterinária**, v. 27, n. 159, p. 1-7, 2007.

GARCÍA-GARCÍA, J. C.; MONTERO, C.; REDONDO, M. et al. Control of ticks resistant to immunization with Bm86 in cattle vaccinated with the recombinant antigen Bm95 isolated from the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Vaccine**, v. 18, n. 21, p. 2275-87, 2000.

GOMES, A. **Carrapato-do-boi: prejuízos e controle**. Divulgação CNPGC EMBRAPA, Campo Grande, MS, dez. 2000, n. 42.

GONZALES, J. C.; MORAN, C.; SILVA, N. R. Ação de misturas de carrapaticidas sobre carrapatos resistentes. **Arquivo Faculdade Vet. UFRGS**. v. 1, n. 1, pp. 11-17. 1973.

GRISI, L.; MASSARD, C.L.; MOYA BORJA, G.E. 2002. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. **A Hora Veterinária**, 125(21): 8-10.

GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. **Veterinary parasitology**, v. 57, n. 1-3, p. 109-19, 1995.

KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.

KLAFKE, G. M. et al. Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 142, p. 386-390, 2006

LARANJA, R. J.; CERESÉR, V. H.; CORRÊA, B. L.; MARTINS, J. R. Carrapaticidas usados e em uso no Rio Grande do Sul. **Boletim I.P.V.D.F.** v. 1, n. 1, pp. 57-69. 1988.

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

MARQUES, F. A. C.; YAMAMURA, M. H.; VIDOTTO, O. Lesões no couro bovino causadas pelos principais ectoparasitas nas regiões noroeste do estado do Paraná e sudoeste do estado do Mato Grosso. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 21, n. 1, p. 33-39, 2000.

RECK, J.; KLAFKE, G. M.; WEBSTER, A.; DALL'AGNOL, B.; SCHEFFER, R.; SOUZA, U. A.; CORASSINI, V. B.; VARGAS, R.; SANTOS, J. S.; MARTINS, J. R. S. First report of Fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: A field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary Parasitology**, v. 201, n. 1-2, pp-128-136.

SACCO, A. M. S. **Profilaxia da Tristeza Parasitária Bovina: Por quê, quando e como fazer**. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, (Circular técnica, 28), 2002, 30 p.

SCHILD, A. L.; RUAS, J. L.; FARIAS, N. A.; GRECCO, F. B.; SOARES, M. P. Aspectos epidemiológicos de um surto de babesiose cerebral em bovinos em zona livre de carrapato. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 8-11, 2008.

3.2. Artigo 2

Assessing different chemoprophylactic protocols against bovine tick-borne diseases and their influence on the weight gain calves.

SERGIO S. DA SILVA, IURI V.P. MARMITT, SAMUEL R. FELIX, DANIELA M.S. CASSOL, MARCUS L.G. REZENDE, ÉVERTON F. DA SILVA, MARIO C.A. MEIRELES E LEANDRO Q. NIZOLI

O artigo foi aceito para a publicação na Revista SEMINA, 2014 e está em fase de correções sugeridas pelos revisores do corpo editorial.

Avaliação de diferentes protocolos de quimioprofilaxia da Tristeza Parasitária Bovina sobre o ganho de peso de novilhos.

Assessing different chemoprophylactic protocols against bovine tick-borne diseases and their influence on the weight gain of calves

Resumo

No presente estudo foram utilizados novilhos da raça Aberdeen Angus remanescentes de um surto de babesiose e anaplasmose, expostos a infestações por carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. No dia zero, o lote de 87 novilhos pesando em média 223,46 Kg, apresentava GMD de peso vivo de 0,258 Kg por dia nos últimos 34 dias. O lote foi dividido em 3 grupos: G1, 37 novilhos com GMD abaixo da média; G2, 35 novilhos com GMD abaixo da média; G3, 15 novilhos com GMD acima da média geral do lote. Os novilhos do G1 foram submetidos à quimioprofilaxia com uso de 1,17 mg Kg⁻¹ de diacetato de diminazeno e 6,7 mg Kg⁻¹ de oxitetraciclina. Os novilhos do G2 foram submetidos à quimioprofilaxia com o uso de 1,2 mg Kg⁻¹ de dipropionato de imidocarb. Os animais do G3 não foram medicados. O G1 obteve o melhor desempenho de ganho de peso no período (0,613 Kg dia⁻¹) (P<0,05) e não apresentou nenhum caso clínico da doença durante o experimento. O protocolo quimioprofilático do G2 teve desempenho mediano, sem diferença dos demais grupos (0,528 Kg dia⁻¹) e o G3 teve o pior desempenho (0,343 Kg dia⁻¹), porém ocorreram 2 quadros clínicos de anaplasmose no final do experimento no G2. Na comparação do desempenho no ganho de peso total por animal no período, o G3 (Controle) obteve 11,667 Kg, O G2 obteve 17,957 Kg e o G1 obteve 20,851 Kg. O protocolo quimioprofilático a base de diacetato de diminazeno e oxitetraciclina demonstrou-se uma ferramenta importante para aplacar os efeitos deletérios da TPB subclínica no período pós desmame, podendo ser recomendada como ferramenta de melhoria de desempenho em categorias jovens de bovinos destinados ao abate precoce.

Palavras-chave: *Anaplasma marginale*; *Babesia* spp; bovinos; ganho de peso; quimioprofilaxia

Abstract

In the present study, 87 Aberdeen Angus calves were used to assess the effects of low dose, agent-specific drugs on weight gain after a babesiosis and anaplasmosis outbreak. All animals were weighed on weaning (day -34) and again on day zero, with a mean (on day zero) of 223.46 Kg and an average individual daily weight gain (ADG) of 0.258 Kg. The animals were then separated in three groups: G1 was composed of 37 calves with below average ADG; G2 was composed of 35 animals with below average ADG; and G3 was composed of 15 animals with above average ADG. On day zero animals in G1 were treated with 1.17 mg Kg⁻¹ of diminazene diacetate and 6.7 mg Kg⁻¹ of oxytetracycline; those in G2 were treated with 1.2 mg Kg⁻¹ of imidocarb dipropionate; and those in G3 were not treated. The animals were then monitored daily for the onset of disease, and on days 15 and 34 they were weighed and had their blood harvested. Animals in G1 had the better overall ADG (0.613 Kg day⁻¹) (P<0.05), with no clinical cases during the experiment. The performance in G2 was moderate, not differing from either G1 or G3 (mean ADG = 0.528 Kg day⁻¹), however, this group had two clinical cases of anaplasmosis during the experiment. Animals in G3 had the worst performance, considering ADG (0.343 Kg day⁻¹). When total weight gain per animal is compared for the study period (35 days), those in

G1 gained an average of 20.851 Kg, followed by animals in G2 with 17.957 Kg, and then animals in G3 with 11.667 Kg. These results show that a low dose, agent specific (G1) drug protocol will considerably reduce the detrimental effects of subclinical tick borne diseases in the post weaning period and can be recommended as a rearing tool for calves destined for early slaughter.

Key-words: *Anaplasma marginale*; *Babesia* spp.; cattle; chemoprophylaxis; weight gain

Introduction

Tick borne diseases (TBD) caused by hemoparasites (*Babesia bigemina* and/or *Babesia bovis*), and bacteria (*Anaplasma marginale*), are responsible for the most prevalent and economically important livestock disease of all tick-borne ailments (SUAREZ; NOH, 2011). Babesiosis, is usually transmitted by the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick (DALGLIESH; STEWART, 1983), while Anaplasmosis can also be transmitted by blood sucking flies (GUGLIELMONE, 1995; KESSLER, 2001).

Favorable climate conditions are required for the development of the tick vector, and enzootic instability will occur when populations fluctuate throughout the year. Some Brazilian regions are considered unstable, specifically the southern part of Rio Grande do Sul (RS), the southernmost state in Brazil. In winter, low temperatures and frequent frosts kill most tick larvae, reducing cattle infestation. Dry, hot summers will also hamper the tick's development cycle. Cattle born in these regions may not be exposed to the vector or TBD agents, resulting in a lack of immunity. Osaki et al. (2002) showed that passive immunity will wane in time, and be at its lowest when the calves reach five months of age. This effect increases the chances of subclinical outbreaks once tick population increase. Calves will suffer with low PCV and reduced weight gain, without necessarily showing significant signs that would trigger veterinary intervention (NIZOLI et al., 2012).

Conventional treatment, according to Vial and Gorenflot (2006), is 3.5 mg Kg⁻¹ diminazene diaceturate for babesiosis. Anaplasmosis can be treated with 20 mg Kg⁻¹ of long-acting oxytetracycline (FACURY-FILHO et al. 2012). Double effect drugs, such as imidocarb dipropionate can also be used in doses from 1 to 3 mg Kg⁻¹ (VIAL; GORENFLOT 2006). In clinical cases of anaplasmosis, even after treatment, animals will become chronic carriers of the agent, and at greater risk of reoccurrence (FELSHEM et al., 2010). In 2012, Nizoli et al. showed that reduced doses of an association of oxytetracycline and diminazene diaceturate were able to minimize the production losses associated with subclinical TBD. However, these authors did not assess the use of double effect drugs for the same outcome.

The present study assesses the use of an association protocol (oxytetracycline and diminazene diaceturate) and single drug protocol (imidocarb dipropionate) on subclinical babesiosis and anaplasmosis, especially on the weight gain of recently weaned calves, in an enzootic instable environment.

Material and Methods

In this study, 87 recently weaned calves (from a group of 297) were identified with unique earrings and ear tattoos. All calves, predominantly of the Angus breed, were kept under field conditions, grazing freely with no additional feed but mineral salt (*ad libitum*). Ages ranged from six to nine months, with an average weight of 223.46 Kg (\pm 43.12). The assay was conducted during a period of varying tick infestations, from April to June 2012, representing an environment for natural TBD challenge. The study was conducted in a rural setting in the municipality of Capão do Leão, RS, Brazil (31° 53'S and 52° 38'W)

All the animals were weighed on an electronic scale (Tru-Test XR3000[®]) on days -34 and zero, and the average daily weight gain (ADG) prior to the start of the experiment was assessed. The overall average was 0.258 Kg a day. After the second weighing (day zero), those animals with an ADG below the mean were separated to compose the treated groups: G1 (n=37) and G2 (n=35). Among those with above average ADG, 15 were chosen for the mock treated control group: G3.

On day zero, animals in G1 were treated with a deep intra-muscular (IM) injection of diminazene diaceturate (1.17 mg Kg⁻¹) and oxytetracycline (6.7 mg Kg⁻¹), using one third of the recommended treatment dose, as described by Nizoli et al. (2012). Animals in G2 were treated with an IM injection of imidocarb dipropionate (1.2 mg Kg⁻¹) as recommended for prophylactic purposes (VIAL; GORENFLOT, 2006). Animals in G3 were mock treated with IM sterile saline.

Faeces were collected from all animals in day zero to assess gastrointestinal parasite burdens through the modified Gordon & Whitlock method (UENO; GONÇALVES 1998). This was used as an internal control to discard the possibility of interference from gastrointestinal parasites in the assessed parameters. Nonetheless, all animals were treated with 34% nitroxylin (1 mL 50Kg⁻¹).

The calves in all three groups were maintained under field conditions with *ad libitum* mineral supplementation, separated from other animals, and submitted to daily inspections regarding general health and tick infestations. Commercial products used in this study were: Imizol^{®1} (imidocarb dipropionate at 120 mg mL⁻¹); Pirofort^{®2} (diminazene diaceturate at 70 mg mL⁻¹); and Ourotetra Plus LA^{®3} (oxytetracycline at 200 mg mL⁻¹ and diclofenac sodium at 10 mg mL⁻¹).

Blood samples were harvested, with and without anticoagulant, on days zero, 15, and 34. The samples were maintained in isothermal boxes, and immediately sent for downstream processing in the *Laboratório de Doenças Parasitárias* (LADOPAR) of the *Faculdade de Veterinária –UFPEL*. Blood samples were used to assess packed cell volume (PCV). Samples with PCVs lower than 25% were also used to produce stained smears in order to assess *Babesia* and *Anaplasma* burdens. Sera were separated and used in an indirect immunofluorescence assay against *B. bovis*, *B. bigemina* (VIDOTTO et al., 1997), and *A. marginale* (MARANA et al., 2006).

All results were analyzed in the Statistix 9 software. The ADG were compared using the Kruskal-Wallis test. PCV were compared using ANOVA followed by the Tukey test. The correlation between PCV and ADG was assessed through the Spearman test.

Results

Serology revealed that 55% of the animals in the study population were positive for *A. marginale*, 45.9 % for *B. bigemina*, and 4 % for *B. bovis*, by the end of the assay. Between days zero and 34, 15 animals seroconverted for *A. marginale*, and nine for *B. bigemina*. This seroconversion was not associated with treatment ($P>0.05$), occurring in all three groups. During the routine inspections, young tick instars were observed in calves from all groups, confirming the risk of infection/reinfection. Likewise, gastro-intestinal parasite infestations were relatively low (mean EPG; G1= 150 ± 199; G2= 206 ± 281; G3 = 167 ± 216), with no difference among groups ($P>0.05$).

¹ MSD Saúde Animal.

² Ourofino Saúde animal.

³ Ourofino Saúde animal.

The ADG, calculated through the weighing of the animals on days zero, 15, and 34, are expressed on table 1. In the assessment considering the difference from day -34 to zero, the ADG of G3 was higher than that of the other groups, as predicted by the proposed methodology. Between days zero and 15, G1 had the greater ADG ($p < 0.05$). No difference was observed among G2 and G3 in these first 15 days. Likewise, G1 was the only group that did not register a reduction in ADG in this period. Between days 15 and 34, there was no difference in weight gain among groups. The complete ADG data can be observed in table 1. Considering the total gain in the study period (from day zero to 34), G1 had a greater ADG than the control, but no other differences were observed. Further data regarding the total gain during the study period can be seen on table 2.

The PCV did not seem to be associated with the ADG in this assay, and remained within limits considered normal throughout the study in all animals (except the two animals in G2 that became clinically ill). These two animals had PCVs of 20 and 18%, and characteristic signs of anaplasmosis, which was confirmed by the stained blood smears. Cell infection rates of 40% were observed in both cases, confirming the clinical disease caused by *Anaplasma marginale*. Complete results regarding the PCV can be seen on table 3.

Discussion

The results generated in the present study suggest that a combination of diminazene diaceturate and oxytetracycline, at 1.17 and 6.7 mg.Kg⁻¹, respectively, can be used to minimize the losses associated with subclinical babesiosis and/or anaplasmosis, during and after weaning. Furthermore, this association seems to have a better effect than dual purpose drugs (imidocarb dipropionate) during this high risk period. Losses associated with subclinical TBDs are difficult to assess, however, some authors suggest that, in the area of this study alone, they may reach up to 1,623,000 dollars in deaths, not considering weight loss, medical care, and other possible expenses (ALMEIDA et al., 2006). Grisi et al. (2002) estimate that the disease causes over 500 million in losses each year, just in Brazil. In our study the difference in weight gain throughout was of 270 g a day in favor of those treated with the combination (613 g.day⁻¹) compared to those untreated (343 g.day⁻¹) (Table 2). This difference represents a total of 9.18 Kg during the 34 days of the study, when a new application of the drugs would be recommended in order to maintain the prophylactic effects (NIZOLI et al., 2012). Considering the better weight gain of the control group prior to the start of the study (from day -34 to day zero), the productive and economic gains may be even larger, and randomized studies should be conducted to confirm this. Likewise, when animals treated with the combination are compared to those treated with a dual purpose drug (528 g.day⁻¹), the difference is of 85 g.day⁻¹ per animal in favor of the prior.

In a previous study, Nizoli et al. (2012) showed a similar effect of the association of oxytetracyclin and diminazene diaceturate, however, the experimental design did not allow the comparison of the treated groups and the control, only the recovery of treated animals. Furthermore, that study did not assess intermediate dates or dual purpose drugs, PCV, and seroconversion. In our study the fluctuation in weight gain, characteristic of enzootically unstable settings, could be observed, evidenced by the decrease of this parameter by day 15 in groups G2 and G3. In G2, this may have occurred because imidocarb has a delayed effect on anaplasmosis.

The drugs used in this study are the most frequently applied by veterinarians in the treatment of bovine babesiosis and anaplasmosis (KUTTLER, 1980; TODOROVIC et al., 1973; VIAL; GORENFLOT, 2006). Nonetheless, some authors recommend the use of enrofloxacin for the treatment of anaplasmosis (FACURY-FILHO et al., 2012), but this drug has shown little effect in several studies (ATIF et al., 2012; COETZEE et al.,

2006). While in Brazil the recommended dose against anaplasmosis is up to 20 mg Kg⁻¹ of long acting oxytetracycline in a single application (FACURY-FILHO et al., 2012; SILVA et al., 2007), other countries use the drug in doses as low as 7 mg Kg⁻¹ (ORTIZ et al., 2012). In this light, we believe that not only subclinical, but even mild cases of anaplasmosis could be treated with the dose used in this study (6.7 mg Kg⁻¹), allowing full productive recuperation. Even if used in high doses, oxytetracycline and imidocarb diacetate rarely eliminate *Anaplasma* completely, and cattle, once infected, will become lifelong carriers (COETZEE et al., 2005, 2006). Therefore, the use of high doses is not justified for prophylactic purposes.

Although the PCV did vary during this study, with significant differences among groups (Table 3), the mean values remained above 32% throughout, regardless of ADG or serological status, and these parameters were not correlated. The only exceptions were the two animals that suffered clinical anaplasmosis, with PCV counts of 20 and 18% on day 34 (both from G2). These results show that subclinical bovine babesiosis and anaplasmosis does not seem to have a significant effect on PCV, contrary to its considerable impact on productive parameters (NIZOLI et al., 2012).

The results obtained in this study confirm the enzootic instability of the region, as predicted by Guglielmone (1995). Another assay with cattle herds from the same region, with latitudes close to 32°S, had also indicated the risk of outbreaks due to these factors (MARTINS et al., 1994).

The seroconversion of some animals, associated with the presence of young tick instars (larvae and nymphs) during inspection, suggest the transmission of TBDs in the herd during the experimental period, with no clinical cases in G1, indicating the advantage of the drug association in these settings. Animals that were positive to one or more TBD agents at the start of the experiment had a better outcome in the treated groups, reinforcing the potential of this rearing tool also in regions where the disease is endemic.

Conclusions

This study confirms the potential of prophylactic applications of diminazene diacetate and oxytetracycline in diminishing the deleterious effects of subclinical babesiosis and anaplasmosis in recently weaned calves. The association of these two agent specific drugs is more efficient than the use of a similar protocol based on a dual purpose drug (imidocarb dipropionate), avoiding clinical cases of anaplasmosis for, at least, 34 days. These results suggest that the chemoprophylactic protocol described herein should be adopted to increase the productivity of calves destined for early slaughter.

Acknowledgments. The authors thank professor Odilon Vidotto, of the *Universidade Estadual de Londrina*, for the serological analyses. We thank the manager of the *Estância Capão Redondo*, Mr. Virgílio Bahmann, for helping with the experimental conditions and animals. We thank the technical advisor from Ourofino, Mr. Rodrigo Jeske Dummer.

References

- ALMEIDA, M. B.; TORTELLI, F. P.; RIET-CORREA, B.; SOARES, M. P.; FARIAS, N. A. R.; RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. S. Tristeza parasitária bovina na região sul do Rio Grande do Sul: estudo retrospectivo de 1978-2005. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, Seropédica, v. 26, n.4, p. 237-242, 2006.
- ATIF, F. A.; KHAN, M. S.; KHAN, M. A.; ASHRAF, M.; AVAIS, M. Chemotherapeutic efficacy of oxytetracycline, enrofloxacin and imidocarb for the elimination of persistent *Anaplasma marginale* infection in naturally infected Sahiwal cattle. *Pakistan Journal of Zoology*, Punjab, v. 44, n. 2, p. 449-456, 2012.

- COETZEE, J. F.; APLEY, M. D.; KOCAN, K. M.; Comparison of the efficacy of enrofloxacin, imidocarb and oxitetracycline for clearance of persistent *Anaplasma marginale* infections in cattle. *Veterinary Therapeutics: research in applied veterinary medicine*. USA, v. 7, n. 4, p. 347-360, 2006.
- COETZEE, J. F.; APLEY, M. D.; KOCAN, K. M.; RURANGIRWA, F. R.; DONKERSGOED, J. V. Comparison of three oxytetracycline regimens for the treatment of persistent *Anaplasma marginale* infections in beef cattle. *Veterinary Parasitology*. Amsterdam, v. 127, n. 1 p. 61-73, 2005.
- DALGLIESH R. J.; STEWART N. P. The use of tick transmission by *Boophilus microplus* to isolate pure strains of *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale* from cattle with mixed infections. *Veterinary Parasitology*. Amsterdam v. 13 n. 4, p. 317-323, 1983.
- FACURY-FILHO, E. J.; CARVALHO, A. U.; FERREIRA, P. M.; MOURA, M. F.; APOLINARIO, B. C.; SANTOS, L. P.; RIBEIRO, M. F. Effectiveness of enrofloxacin for the treatment of experimentally-induced bovine anaplasmosis. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. São Carlos, v. 21, n. 1, p. 32-36, 2012.
- FELSHEIM, R. F.; CHÁVEZ, A. S. O.; PALMER, G. H.; CROSBY, L.; BARBET, A. F.; KURTTI, T. J.; MUNDERLOH, U. G. Transformation of *Anaplasma marginale*. *Veterinary Parasitology*. Amsterdam, v. 167 n. 2-4, p. 167-174, 2010.
- GRISI, L.; MASSARD, C. L.; BORJA, G. E. M.; PEREIRA, J. B. Impacto econômico das principais ectoparasitoses em bovinos no Brasil. *Hora Veterinária*. Porto Alegre, v. 21, n. 125, p. 8-10, 2002.
- GUGLIELMONE, A. A. Epidemiology of babesiosis and anaplasmosis in South and Central America. *Veterinary Parasitology*. Amsterdam, v. 57 n. 1-3, p. 109-119, 1995.
- KESSLER, R. H. Considerações sobre a transmissão de *Anaplasma marginale*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. Seropédica, v. 21, n. 4, p. 177-179, 2001.
- KUTTLER, K. L. Pharmacotherapeutics of drugs used in treatment of anaplasmosis and babesiosis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*. Schaumburg, v. 176, n. 10, p. 1103-1108, 1980.
- MARANA, E. R. M.; ALFIERI, A. A.; ANDRADE, G. M.; FREIRE, R. L.; GARCIA, J. L.; VIDOTTO, O. Comparação dos Testes Sorológicos de Imunofluorescência Indireta, Conglutinação Rápida, ELISA indireto e ELISA de Competição para detecção de anticorpos contra *Anaplasma marginale* em soros de diferentes áreas enzoóticas. *Semina: Ciências Agrárias*. Londrina, v. 27, n. 4, p. 629-638, 2006.
- MARTINS, J. R.; CORREA, B. L.; CERESER, V. H.; ARTECHE, C. C. P.; GUGLIELMONE, A.A. Some aspects of the epidemiology of *Babesia bovis* in Santana do Livramento, southern Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. São Carlos, v. 3, n. 2, p. 75-78, 1994.
- NIZOLI, L. Q.; MARMITT, I. V. P.; BIEGELMEYER, P.; MOTTA, J. F.; SANTOS, T. R. B.; SILVA, S. S. Efeito quimioprofilático do diaceturato de diminazeno (Ganaseg®) e oxitetraciclina (Talcin Max®) contra a Tristeza Parasitária subclínica na melhoria do ganho de peso em novilhos precoces para abate. *A Hora Veterinária*. Porto Alegre, v. 31, n. 186, p. 17-20, 2012.
- ORTIZ, E. F.; GERDTS, O. V.; PALENCIA, N. P.; PINEDA, A. M.; HURTADO, O. J. B. Therapeutic effect of an anaplasmodic and anti-protozoa product against the blood parasites of cattle. *CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*. Bogotá, v. 7, n. 1, p. 33-48, 2012.
- OSAKI, S. C.; VIDOTTO, O.; MARANNA, E. R. M.; VIDOTTO, M. C.; YOSHIHARA, E.; PACHECO, R. C.; IGARASHI, M.; MINHO, A. P. Ocorrência de anticorpos anti *Babesia bovis* e estudo sobre a infecção natural em bovinos da raça Nelore, na região de Umuarama, Paraná Brasil. *Revista Brasileira de Parasitologia*. São Carlos, v. 11, n.2, p. 77-83, 2002.
- SACCO, A. M. S. *Profilaxia da Tristeza Parasitária Bovina: Por quê, quando e como fazer*. Bagé: Embrapa Pecuária Sul, (Circular técnica, 28), 2002, 30 p.
- SILVA, R. A.; CORRÊA, F. N.; BOTTEON, R. C. C. M.; BOTTEON, P. T. L. Infecção natural por hemoparasitos em bezerros submetidos à quimio-profilaxia aos 30 dias de idade. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*. São Carlos, v. 16, n. 3, p. 163-165, 2007.
- SUAREZ, C. E.; NOH, S. Emerging perspectives in the research of bovine babesiosis and anaplasmosis. *Veterinary Parasitology*. Amsterdam, v. 180, n. 1-2, p. 109-125, 2011.
- TODOROVIC, R. A.; VIZCAINO, D. V. M.; GONZALEZ, E. F.; ADAMS, L. G. Chemoprophylaxis (Imidocarb) against *Babesia bigemina* and *Babesia argentina* infections. *The American Journal of Veterinary Research*. Schaumburg, v. 34, n. 9, p. 1153-1161, 1973.

UENO, H.; GONÇALVES P. C. *Manual para diagnóstico das helmintoses de ruminantes*. 4.ed. Tokyo: Japan International Cooperation Agency, Tokyo Japan, 1998, 143 p.

VIAL, H. J.; GORENFLOT, A. Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary Parasitology*. Amsterdam, v. 138, n. 1, p. 147-160, 2006.

VIDOTTO, O.; ANDRADE, G. M.; AMARAL, C. H. S.; BARBOSA, C. S.; FREIRE, R. L.; ROCHA, M. A.; VIDOTTO, M. C.; SILVA, S. S. Frequência de anticorpos contra *Babesia bigemina*, *B. bovis* e *Anaplasma marginale* em rebanhos de bovinos leiteiros da região de Londrina, Paraná. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. Belo Horizonte, v. 49, n. 5, p. 655-659, 1997.

Table 1. Mean (\pm Standard Deviation) ADG observed on days zero, 15, and 34, of calves treated with different chemoprophylactic protocols against bovine TBDS in the municipality of Capão do Leão-RS

Group	Day 0	Day 15	Day 34
G 1	0.138 \pm 0.170 Kg cA	0.326 \pm 0.418 Kg bA	0.814 \pm 0.334 Kg aA
G 2	0.151 \pm 0.156 Kg bA	0.070 \pm 0.467 Kg bAB	0.849 \pm 0.375 Kg aA
G 3	0.807 \pm 0.132 Kg aB	-0.190 \pm 0.418 Kg bB	0.717 \pm 0.598 Kg aA

Different upper case letters represent statistically different results on the column; Kruskal-Wallis ($p < 0.05$); Different lower case letters represent difference on the line; Tukey ($p < 0.05$).

G1- diminazene diacetate and oxytetracycline; G2 – imidocarb dipropionate; G3 - Control

Table 2. Mean ADG for the entire experimental period, of calves treated with different chemoprophylactic protocols against bovine TBDS in the municipality of Capão do Leão-RS

Group	ADG	Lowest ADG	Highest ADG	Mean individual weight gain
G 1	0.613 ± 0.260 Kg A	0.118 Kg	1.221 Kg	20.851 Kg A
G 2	0.528 ± 0.209 Kg AB	- 0.029 Kg	0.912 Kg	17.957 Kg AB
G 3	0.343 ± 0.309 Kg B	- 0.088 Kg	0.853 Kg	11.667 Kg B

Different letters represent statistically different results on the column; Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

G1- diminazene diacetate and oxytetracycline; G2 – imidocarb dipropionate; G3 - Control

Table 3. Mean (\pm Standard Deviation) PCV observed on days zero, 15, and 34, of calves treated with different chemoprophylactic protocols against bovine TBDs in the municipality of Capão do Leão-RS

Group	Day 0	Day 15	Day 34
G 1	34.67 \pm 5.16 aAB	35.67 \pm 3.23 aA	35.53 \pm 2.46 aA
G 2	33.39 \pm 5.25 bB	35.67 \pm 2.91 aA	32.45 \pm 2.48 bB
G 3	37.13 \pm 4.12 aA	32.60 \pm 2.95 bB	35.46 \pm 3.11abA

Different upper case letters represent statistically different results on the column; lower case represent difference on the line; Kruskal-Wallis ($p < 0.05$).

G1- diminazene diacetate and oxytetracycline; G2 – imidocarb dipropionate; G3 – Control

3.3. Artigo 3

**Bovine genetic tick resistance effects on biological traits of *Rhipicephalus*
(*Boophilus*) *microplus*.**

P. BIEGELMEYER, L.Q. NIZOLI, S.S. DA SILVA, T.R.B. DOS SANTOS, N.J.L.
DIONELLO, C.C. GULIAS-GOMES, F.F. CARDOSO

(O Artigo foi submetido à Veterinary Parasitology)

Bovine genetic tick resistance effects on biological traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

P. Biegelmeier^{a,*}, L.Q. Nizoli^b, S.S. da Silva^b, T.R.B. dos Santos^b, N.J.L. Dionello^a, C.C. Gulias-Gomes^c, F.F. Cardoso^c

^a*Departamento de Zootecnia, Universidade Federal de Pelotas, 96160000, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil*

^b*Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 96160000, Capão do Leão, Rio Grande do Sul, Brazil*

^c*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, EMBRAPA Pecuária Sul, 96401970, Bagé, Rio Grande do Sul, Brazil*

Abstract

This study aimed to verify the influence of bovine genetic tick resistance on biological traits of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Tick samples were collected from Braford heifers, 20 genetically classified as tick-resistant and 20 as tick-susceptible, according to breeding values for tick counts predicted after phenotypic and genetic evaluations. These 40 heifers were exposed to four subsequent artificial infestations with 20,000 larvae. Resistant heifers carried 18.3%, 9.5%, 9.0% and 14.4% of ticks carried by susceptible heifers after the four infestations, respectively. Ticks engorged in the susceptible group showed higher posture

weight ($P < 0.05$) and higher values of reproductive efficiency index ($P < 0.0001$) and nutritional efficiency index ($P < 0.0001$) than ticks of resistant group. Tick initial weights showed a directly relation with reproductive efficiency index in susceptible heifers ($P < 0.05$) and a negative relation in resistant group ($P < 0.05$), suggesting a defense mechanism related to the efficiency of ingested blood conversion to eggs in ticks engorged on resistant hosts. Results showed that bovine genetic tick resistance, in addition to affecting the number of ticks carried by animals, also affected the posture weights and reproductive and nutritional efficiency indexes of ticks. This suggests that the selection of resistant animals could be a useful tool in the strategic tick control in production systems, reducing tick infestation levels in bovines and environment. Understanding the genetic factors related to the phenotype expression of susceptibility or resistance could accelerate the identification of resistant genotypes.

Keywords: Braford; Cattle tick resistance; Initial weight; Posture weight; Reproductive efficiency index; Nutritional efficiency index

1. Introduction

Among factors that affect cattle production efficiency in tropical and subtropical countries, the animal adaptation to the environment is of essential importance. Parasite infestation is one of the major environmental challenges to cattle in hot climate regions, particularly the *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick parasitism (Mendes et al., 2011). Anaemia, bodyweight loss, decreased milk production, transmission of diseases and high

costs of chemical control treatments are some of the losses caused by this parasitism (Jongejan and Uilenberg, 2004; Jonsson, 2006). In conjunction with the ability of ticks to develop acaricide resistance, this context has stimulated researchers to investigate alternative tick control methods capable of being combined with the traditional use of chemicals to increase the efficiency of *R. (B.) microplus* control in cattle production systems. Among these alternatives, selection to increase the frequency of genes related to tick resistance in herds has been indicated as a viable solution (Frisch et al., 2000). Genetic variability for tick counts observed between animals of different breed compositions and within breeds indicates the possibility of genetic gains through selection of animals evaluated and classified as genetically resistant (Fraga et al., 2003; Henshall, 2004; Prayaga and Henshall, 2005).

Although the immunological mechanisms developed by bovines exposed to natural or artificial infestations are not completely understood, differences in immune profiles and variations in genes responsible for encoding cellular or humoral immune factors have been reported and related to phenotypes of resistance and susceptibility (Acosta-Rodríguez et al., 2005; Martinez et al., 2006; Piper et al., 2010; Porto Neto et al., 2013).

Besides direct killing or removing ticks of animal bodies, some authors reported that cattle genetic resistance to *R. (B.) microplus* also affects biological traits of the parasite and can reduce the viability of eggs, fertility rates, and cause premature detachment, resulting in fewer ticks on the body of animals and in the environment (Wagland, 1975; Singh and Girschick, 2003).

Investigating the effects of natural and acquired immune responses of Hereford cattle exposed to artificial infestations on biological functions of *R. (B.) microplus*, Barriga et al. (1993) reported that even within a group of apparently homogeneous individuals (same breed, gender, age and management, for example), significant differences in the immune response

can be observed between animals along the infestations, which, according to the authors, are possibly related to genetic differences in the bovine expression of immune response against parasitism. This study aimed to evaluate the effect of host genetic tick resistance on biological traits of *R. (B.) microplus* ticks collected from artificially infested Braford heifers genetically classified as tick-resistant and tick-susceptible.

2. Materials and methods

2. 1. Animals and determination of bovine genetic tick resistance

Classification of the bovines in this experiment as genetically tick-resistant or genetically tick-susceptible was based on their breeding values (BV) for tick counts. The (co)variance components necessary to calculate BV were calculated from data of 9,007 Hereford and Braford (Hereford x Zebu) bovines raised in extensive systems of farms located in Southern Brazil and belonging to the Delta G Connection genetic improvement consortium (Delta G Connection, 2007). The historical database maintained by GenSys Associated Consultants contained counts of the number of ticks at inner hind legs region of 6,709 naturally infested bovines born between 2001 and 2008, with one count per animal. A second database for the same population was created in partnership with Embrapa Southern Region Animal Husbandry Center, and contained information from two or three subsequent tick counts at the whole left side of 2,298 naturally infested bovines born in 2009, totaling 6,607 count records. The counts were performed in an extended yearling evaluation period, and the

average age was 522 ± 66 days. The pedigree information was composed by 17,252 records, including base animals with unknown parents.

The two databases were jointly analyzed using a bivariate animal model (Henderson, 1984), which considered counts at inner hind legs region and at whole side as different by genetically correlated traits, such that historical records contributed to breeding value estimates of current animals. The statistical model considered the fixed effect of contemporary groups (CG), which were defined combining animals from the same farm, sex, year and season of birth, management, and date of tick count. The linear effects of breed composition and heterozygosity and the linear and quadratic effects of animal age were considered as covariates, and the additive genetic effects and residual were considered as random. Contemporary groups with less than five individuals and animals that were 3.5 standard deviation above or below the mean tick count of their CG were excluded previously from the analyzes. Tick counts were transformed by applying a base 10 logarithmic function to the observed value + 1. Covariance components and breeding values were jointly estimated using Bayesian inference through the INTERGEN software (Cardoso, 2010).

Based on obtained breeding values and tick count data, 22 heifers classified as extremely resistant and 21 as extremely susceptible were selected from 974 Braford heifers born in 2009, which had breed composition between $\frac{1}{2}$ Hereford + $\frac{1}{2}$ Zebu and $\frac{3}{4}$ Hereford + $\frac{1}{4}$ Zebu, and at least two successive tick counts. Heifers with BV among the lowest 10% ($BV < -0.08$), average standard deviation (ASD) of counts in relation to their CG mean among the lowest 10% ($ASD < -1.28$), and that were always at least 1.0 standard deviation below the mean of their CG in each count were designated as "Resistant Group" (R). Heifers with BV among the highest 10% ($BV > 0.10$), ASD among the highest 10% ($ASD > 1.28$), and always 1.0 standard deviation above the mean for their CG in each count were considered the

"Susceptible Group" (S). For composition of the resistance groups, between the heifers that met all the above criteria, were chosen those with three tick counts.

2. 2. *Artificial infestations*

Selected heifers were transferred from their original farms to Embrapa Southern Region Animal Husbandry Center, in the city of Bagé, Rio Grande do Sul state, Brazil (latitude 31°19'S, longitude 54°06'W and 212 m altitude), where artificial infestations were performed. Before the experiment, heifers were treated with a commercial amitraz acaricide (Amipur[®]) and maintained in a tick-free pasture during three months before infestations. Until the end of the experimental period, these animals did not receive any further acaricide treatment. Artificial infestations used *R. (B.) microplus* larvae between 10 and 15 days old, obtained from a strain susceptible to common acaricides, free of *Babesia* sp and *Anaplasma* sp, maintained by Embrapa Ectoparasitology Laboratory. Aliquots of 1 g of eggs (about 20,000 larvae) were placed in syringes and incubated in a BOD (Biochemical Oxygen Demand) at 27 ± 1 °C and relative humidity at 80 ± 10 % for larvae hatching (15 days). Four successive artificial infestations were performed, at 14-day intervals, between February 9 and March 23, 2011, by larvae distribution along bovine dorsal region. In the first and the third infestation, heifers were treated with 1.2 mg.kg^{-1} imidocarb dipropionate (Imizol[®]) to prevent possible cases of babesiosis and anaplasmosis by natural infestations from the experimental pasture to which the animals were transferred after the first infestation. To monitor possible environmental infestations, only 40 animals were artificially infested (20 classified as genetically tick-resistant and 20 as genetically tick-susceptible), and three heifers (one from R group and two from S group) were maintained in the experimental group without artificial

infestations, as tracers of natural infestations. During the experiment, air temperature averaging 21.2 °C, ranging from 8.9 °C to 32.2 °C, and relative air humidity averaging 72.4%, ranging from 25.5% to 97.5%. At the beginning of the infestations heifers weighed 370.1 ± 44.6 kg.

2. 3. Tick collection

From the 19th through the 23rd day after each infestation, engorged tick females with at least 4.5 mm of diameter were daily counted on the left side of each animal. Ticks were manually collected in days of highest observed infestation (22nd day after the first infestation and 21st day after the others). Sampled ticks were placed in individual identified containers and submitted to Parasitic Diseases Laboratory of Pelotas Federal University, in the city of Capão do Leão, Rio Grande do Sul state, Brazil, to record tick initial weight, posture weight, corpse weight, and calculate reproductive and nutritional efficiency indexes.

The engorged females were individually weighed, placed in petri dishes and incubated at BOD at 27 ± 1 °C and relative humidity at 80 ± 10 % for oviposition. Due to high infestation levels presented by tick-susceptible heifers, it was stipulated a maximum evaluation of 10 ticks per animal. Therefore, the 10 ticks evaluated were randomly selected from all ticks collected in each heifer, in each infestation. Fourteen days after tick incubation, egg mass produced by each parasite was weighed. From the second tick collection, corpse weights also were registered. Reproductive (REI) and nutritional (NEI) efficiency indexes were determined according to Bennett (1974) using the following formulae: $REI (\%) = (PW \times$

100)/IW and NEI (%) = (PW x 100)/(IW – CW), where IW = ticks initial weight, PW = posture weight, and CW = corpse weight.

2. 4. Statistical analyses

Tick biological traits and count data were subjected to repeated measures analysis of variance using the MIXED procedure of the SAS software (SAS Institute Inc., 2008). To approximate the normal distribution assumption, REI and NEI data were transformed by $\arcsine\sqrt{\%/100}$ and tick count data by $\log_{10}(\text{count} + 1)$. The statistical model used was:

$$Y_{ijk} = \mu + G_i + T_j + H_{k(i)} + (G \times T)_{ij} + e_{ijk},$$

where Y_{ijk} = is tick count or biological traits of ticks obtained from the k th heifer within the i th resistance group and j th time of infestation; G_i = tick-resistance group effect (R, S); T_j = time of infestation effect (1, 2, 3, 4); $H_{k(i)}$ = heifer random effect within resistance group; $(G \times T)_{ij}$ = interaction between tick-resistance group and infestation time, and e_{ijk} = experimental error.

Means difference comparisons were based on Tukey-Kramer test ($P < 0.05$). Spearman's correlation coefficients were used to verify associations among tick biological traits within genetic tick-resistance group, and between tick-resistance breeding values and these characteristics. The relationship between IW and PW was further evaluated using linear regression analysis. All the statistical analyses were performed using the SAS software.

3. Results

3. 1. *Breeding values and tick counts*

Means and standard deviations of predicted breeding values (BV) for tick counts of the 40 heifers selected and exposed to the artificial infestations were -0.170 ± 0.07 for the 20 animals classified as genetically tick-resistant (R), and 0.178 ± 0.05 for the 20 animals classified as genetically tick-susceptible (S). Breeding values of the heifers selected but not exposed to the artificial infestations were -0.181 and -0.177 in the two R heifers, and 0.149 in the S heifer.

Untransformed tick count data means and standard errors registered in days of highest infestation presented by the animals after each infestations (22nd day in first infestation and 21st day in others) are represented in Fig. 1. Tick resistance group showed a high effect ($P < 0.0001$) on the tick counts. From the first through fourth infestation resistant heifers showed, respectively, 18.3%, 9.5%, 9.0% and 14.4% of the total ticks counted in susceptible heifers, demonstrating the validity of genetic evaluations previously performed and used as criteria for classification of animals according to their tick resistance.

Means (\pm SE) of ticks presented by the three heifers not exposed to artificial infestation were 6.67 ± 3.38 , 8.67 ± 4.63 and 1.33 ± 0.88 after the first, second and third infestation, respectively. No ticks were observed in these heifers after the fourth infestation. This indicates that the level of natural infestation from the pasture where animals were kept after artificial infestations was very low, such that the number of ticks recorded in artificially challenged heifers was not significantly influenced by possible natural infestations.

3. 2. Ticks traits analyses

General means obtained for tick initial weight (IW), posture weight (PW), corpse weight (CW), and reproductive (REI) and nutritional indexes (NEI) are presented in Table 1. In order to facilitate the results interpretation, the REI and NEI means were back-transformed for presentation. Considering the whole period of the experiment, the initial weight and corpse weight of genetically resistant and susceptible bovines were similar ($P > 0.05$). The lowest overall mean of PW ($P < 0.05$), REI ($P < 0.0001$) and NEI ($P < 0.0001$) were observed in ticks engorged on resistant heifers. Regarding tick traits trajectory over four artificial infestations, there was significant interaction between resistance group and time ($P < 0.05$) only for PW (Fig. 2), REI (Fig. 3) and NEI (Fig. 4). In the third infestation, ticks of resistant heifers showed lower REI ($P < 0.0001$) than did the ticks of susceptible heifers. In the fourth infestation, ticks of S group showed also higher PW ($P < 0.05$) and NEI ($P < 0.0001$) mean compared to ticks collected from R heifers. No differences were observed between IW and CW means, comparing ticks of the same resistance group among the four infestations or comparing ticks collected in the same infestation between the two resistance groups.

3. 3. Correlation analyses

Correlations obtained among tick traits were, in general of similar magnitude and same direction for IW, CW and PW for both resistance groups (Table 2). Tick initial weight was highly and positively associated with posture weight for susceptible and resistant heifers. Corpse weights also presented strong positive correlation with IW in both groups. On the

other hand, nutritional and reproduction efficiency indexes correlations were substantially different between R and S heifers (Table 2). A weak and inverse relationship was registered between IW and REI for the two groups, with positive correlation in susceptible heifers and negative in resistant. No relationship was found between other weight traits and efficiency indexes for tick obtained from R heifer, while IW, CW and PW were in positive association with REI and NEI in the S group. Despite the positive correlations between IW and PW in both resistance groups, PW regression slope on IW of ticks from R group heifers was of smaller magnitude compared to that observed in ticks engorged on heifers from S group (Fig. 5). Tick count estimated breeding values of genetic tick-resistant heifers showed association with REI ($r = 0.29$; $P < 0.01$) and NEI ($r = 0.46$; $P < 0.0001$).

4. Discussion

This study evaluated tick counts and biological traits over four consecutive artificial infestations of Braford heifers genetically classified as tick-resistant and tick-susceptible. Development of tick-resistance over successive infestations was showed by Hewetson (1968), in Sahiwal and Illawara Shorthorn cattle, and Wagland (1975), in Brahman and Shorthorn cattle. These authors related tick initial weight decreased with resistance development by the animals, but that was not observed in the present study, when working with not naïve heifer. However, the lower PW of ticks collected from R heifers in the fourth infestation (Fig. 2) could be an indicative that genetic resistance provided better immune defense mechanisms to maintain constant oviposition capacity of engorged tick females under successive artificial challenges, while S heifer have depleted immune response and increased tick PW. Considering the overall PW mean (Table 1) and that 1 g of *R. (B.) microplus* posture is about

20 thousand eggs (Sutherst et al., 1978; Gonzales, 1993), ticks of S heifers produced 12% more eggs than ticks of R heifers. Added to the fact that susceptible hosts carry a much larger tick amount (Fig. 1), this indicates possible genetic resistance impact on decreasing field infestation levels. Therefore, gradual elimination of individuals evaluated and classified as genetically susceptible could be an alternative to reduce tick environment population (Sutherst et al., 1979; Madalena et al., 1985), decreasing constant acaricide treatments and other damages caused by parasitism.

Reproductive efficiency index (REI) estimates how much of ingested blood is converted in eggs, and the nutritional efficiency index (NEI) evaluates how much of weight loss (initial tick weight – corpse weight) was used to produce eggs. Smaller overall REI and NEI means observed in this study for genetically tick-resistant group (Table 1) indicates that ticks engorged on susceptible heifers transformed ingested blood to eggs more efficiently than ticks from R group. This suggests that defense mechanisms presented in response to infestations by resistant bovines, besides acting in early larval development reducing the number of adult parasites, apparently also affect ticks physiological processes involved in conversion of initial weight to eggs.

Despite strategies developed by ticks to evade host immune responses, presence of functional IgG antibodies in the hemolymph of ticks for up to 48 h after detachment has been reported (Vaz Jr. et al., 1996). One of the tick mechanisms to modulate cattle humoral immune responses is the expression of IgG binding proteins (IGBP) in the parasites salivary glands. During hematophagism, these proteins appear to transport IgG antibodies produced by the host from tick gut back into the bovine through their saliva (Wang and Nuttall, 1999; Guderra et al., 2002). Differences in IGBP ability to bind to IgG allotypes and, consequently, differences in parasite ability to modulate humoral immune system of *B. indicus* and *B. taurus* cattle have been reported and related to resistance phenotypes (Carvalho et al., 2011). The fact

that animals of different breed compositions and with different tick-resistance phenotypes produced different antibodies in response to ticks challenges (Kashino et al., 2005) represents another indication that among the genes related to tick-resistance are those encoding immunoglobins. Variations in genes that encode surface proteins, which act as receptors on antigen presenting cells to T lymphocytes, may also be related to greater or lesser tick-susceptibility of cattle. Associations between tick-resistance and microsatellite markers in the class II region of BoLA gene have been reported by several authors (Acosta-Rodriguez et al., 2005; Martinez et al., 2006; Untalan et al., 2007).

High correlations between initial weight and weight of engorged females posture in this study (Table 2) suggest that both traits were affected by similar host immunological factors, agreeing with results presented by Barriga et al. (1995). Nearly complete association ($r = 0.97$) between those traits in susceptible heifers indicates that egg masses produced by ticks of this S group were almost entirely dependent on blood intake capacity of ticks during their development on cattle. Although also positive and high, the correlation of 0.80 observed in the R group indicates that a greater portion of the variation observed in PW was due to factors other than IW, compared to S group. Similarly, the less expressive association between corpse weight and initial weight of ticks observed in R group (0.62) compared to S group (0.89) suggests a greater influence of other factors than initial weights on the corpse weights of ticks engorged on genetically tick-resistant hosts. Positive correlations observed between the breeding values for tick-resistance and REI and NEI reinforce the idea that genetic evaluation and selection of animals classified as resistant may in the long term influence not only the number of ticks that can develop on cattle, but also reduce parasite dissemination ability in environment and infestation levels in the fields.

Smaller magnitude of correlation between IW and PW observed R group heifers compared to S group and negative association between IW and REI of ticks from resistant

cattle provide evidence to support our theory of an immunological mechanism developed by R heifers that can disturb conversion of ingested blood to eggs mass. Cattle immune system ability to develop defense mechanisms against ticks over subsequent parasite contact supports the concept of an acquired resistance and the idea that bovines without a prior contact with ticks are equally susceptible to infestations (Wagland, 1975). It is important to note that all heifers used in this study already had previous contact with *R. (B.) microplus* before the performed artificial infestations. Thereby, heifer responses to artificial challenges may have been influenced by resistance mechanisms already developed or pre-stimulated in infestations prior to the experimental period. This, however, has no significant impact on conclusions of this work, since our objective was not to profile bovine immune response, but to verify if genetic tick-resistance, determined by phenotypic evaluation and traditional tick count breeding value prediction, would influence tick biological traits besides the number of ticks carried by heifers.

In this study, genetic variability for tick-resistance observed in Braford heifers affected not only the number of ticks carried by the animals, but also tick oviposition capacity and nutritional and reproductive efficiency indexes. Thus, in addition to economic losses related to reduced animal productive performance or to higher demand for treatments, keeping highly tick-susceptible animals in the herds implies higher environmental infestation levels, perpetuating high incidence of ticks in the farm. Genetic evaluation of livestock for tick-resistance and inclusion of tick counts as selection criteria for more resistant animals in breeding programs can be implemented as an auxiliary tool for strategic control of *R. (B.) microplus* in production systems. Understanding immunological mechanisms responsible for expression of resistant phenotypes could accelerate the identification of genetic factors involved in this process. Such advances could enable genetic evaluations for tick-resistance based on information gathered directly from genetic code of the animals, allowing to increase

prediction accuracy, accelerate identification of superior genotypes, and avoid cattle exposure to ticks required by current genetic evaluations methods.

Acknowledgments

We thank Embrapa and CNPq for the funding for the project and CAPES for the scholarships given to the authors.

References

- Acosta-Rodríguez, R., Alonso-Morales, R., Balladares, S., Flores-Aguilar, H., Garcia-Vazquez, Z., Gorodezky, C., 2005. Analysis of BoLA class II microsatellites in cattle infested with *Boophilus microplus* ticks: class II is probably associated with susceptibility. *Vet. Parasit.* 127, 313-321.
- Barriga, O.O., Silva, S.S., Azevedo, J.S.C., 1993. Inhibition and recovery of tick functions in cattle repeatedly infested with *Boophilus microplus*. *J. Parasitol.* 79, 710-715.
- Barriga, O.O., Silva, S.S., Azevedo, J.S.C., 1995. Relationships and influences between *Boophilus microplus* characteristics in tick-naive or repeatedly infested cattle. *Vet. Parasitol.* 56, 225-238.

Bennett, G.F., 1974. Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). I. Influence of tick size on egg production. *Acarologia* 16, 1, 52-61.

Cardoso, F.F., 2010. Application of bayesian inference in animal breeding using the Intergen program: manual of version 1.2. Embrapa Pecuária Sul, Bagé, 30 pp.

Carvalho, W.A., Ianella, P., Arnoldi, F.G.C., Caetano, A.R., Maruyama, S.R., Ferreira, B.R., Conti, L.H.A., Silva, M.R.M., Paula, J.O.F., Maia, A.A.M., Santos, I.K.F.M., 2011. Haplotypes of the bovine IgG₂ heavy gamma chain in tick-resistant and tick-susceptible breeds of cattle. *Immunogenetics* 63, 5, 319-324.

Delta G Connection, 2007. Institutional. Available in: http://www.deltag.com.br/pt_br/pg_institucional.php.

Fraga, A.B., Alencar, M.M., Figueiredo, L.A., Razook, A.G., Cyrillo, J.N.G., 2003. Análise de fatores genéticos e ambientais que afetam a infestação de fêmeas bovinas da raça Caracu por carrapatos (*Boophilus microplus*). *Braz. J. Anim. Sci.* 32, 1578-1586.

Frisch, J.E., O'Neill, C.J., Kelly, M.J., 2000. Using genetics to control cattle parasites - The Rockhampton experience. *Int. J. Parasitol.* 30, 253-264.

Gonzales, J.C., 1993. O controle do carrapato do boi. Mestre Jou, Porto Alegre, 79 pp.

Gudderra, N.P., Sonenshine, D.E., Apperson, C.S., Roe, R.M., 2002. Hemolymph proteins in ticks. *J. Insect Physiol.* 48, 3, 269-278.

Henderson, C.R., 1984. Applications of linear models in animal breeding. University of Guelph, Guelph, 462 pp.

Henshall, J.M., 2004. A genetic analysis of parasite resistance traits in a tropically adapted line of *Bos taurus*. *Aust. J. Agric. Res.* 55, 1109-1116.

Hewetson, R.W., 1968. Resistance by cattle to cattle tick *Boophilus microplus*. II. The inheritance of resistance to experimental infestations. *Aust. J. Agric. Res.* 19, 497-505.

Jongejan, F., Uilenberg, G., 2004. The global importance of ticks. *Parasitol.* 129, S3-S14.

Jonsson, N.N., 2006. The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Vet. Parasitol.* 137, 1-10.

- Kashino, S.S., Resende, J., Sacco, A.M.S., Rocha, C., Proenca, L., Carvalho, W.A., Firmino, A.A., Queiroz, R., Benavides, M., Gershwin, L.J., De Miranda Santos, I.K.F., 2005. *Boophilus microplus*: the pattern of bovine immunoglobulin isotype responses to high and low tick infestations. *Exp. Parasitol.* 110, 12-21.
- Madalena, F.E., Teodoro, R.L., Lemos, A.M., Oliveira, G.P., 1985. Causes of variation of field burdens of cattle ticks (*B. microplus*). *Rev. Bras. Genet.* 8, 361-375.
- Martinez, M.L., Machado, M.A., Nascimento, C.S., Silva, M.V.G.B., Teodoro, R.L., Furlong, J., Prata, M.C.A., Campos, A.L., Guimarães, M.F.M., Azevedo, A.L.S., Pires, M.F.A., Verneque, R.S., 2006. Association of BoLA-DRB3.2 alleles with tick (*Boophilus microplus*) resistance in cattle. *Genet. Mol. Res.* 5, 514-524.
- Mendes, M.C., Lima, C.K.P., Nogueira, A.H.C., Yoshihara, E., Chiebao, D.P., Gabriel, F.H.L., Ueno, T.E.H., Namindome, A., Klafke, G.M., 2011. Resistance to cypermethrin, deltamethrin and chlorpyrifos in populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from small farms of the State of São Paulo, Brazil. *Vet. Parasitol.* 178, 383-388.
- Piper, E.K., Jonsson, N.N., Gondro, C., Lew-Tabor, A.E., Moolhuijzen, P., Vance, M.E., Jackson, L.A., 2009. Immunological profiles of *Bos taurus* and *Bos indicus* cattle infested

with the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Clin. Vaccine Immunol. 16, 1074-1086.

Porto Neto, L.R., Jonsson, N.N., Ingham, A., Bunch, R.J., Harrison, B.E., Barendse, W., 2013. The *RIPK2* gene: a positional candidate for tick burden supported by genetic associations in cattle and immunological response of knockout mouse. Immunogenetics 64, 379-388.

Prayaga, K.C., Henshall, J.M., 2005. Adaptability in tropical beef cattle: genetic parameters of growth, adaptive and temperament traits in a crossbred population. Aust. J. Exp. Agric. 45, 971-983.

SAS Institute Inc., 2008. SAS/STAT® 9.2 User's Guide 9.2, Cary, NC, SAS Institute Inc.

Singh, S.K., Girschick, H.J., 2003. Tick–host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases. Curr. Sci. 85, 1284-1298.

Sutherst, R.W., Wharton, R.H., Cook, I.M., Sutherland, I.D., Bourne, A.S., 1979. Long-term population studies on the cattle tick (*Boophilus microplus*) on untreated cattle selected for different levels of resistance. Aust. J. Agric. Res. 30, 353-368.

- Sutherst, R.W., Wharton, R.H., Utech, K.B.W., 1978. Guide to studies on tick ecology. Division of Entomology, Melbourne, 1-59. (Technical Paper, 14).
- Untalan, P.M., Pruett, J.H., Steelman, C.D., 2007. Association of the bovine leukocyte antigen major histocompatibility complex class II DRB3*4401 allele with host resistance to the Lone Star tick, *Amblyomma americanum*. *Vet. Parasitol.* 145, 190-195.
- Vaz Jr., I.S., Martinez, R.H., Oliveira, A., Heck, A., Loogullo, C., Gonzales, J.C., Dewes, H., Masuda, A., 1996. Functional bovine immunoglobulins in *Boophilus microplus* hemolymph. *Vet. Parasitol.* 62, 155-60.
- Wagland, B.M., 1975. Host resistance to cattle tick (*Boophilus microplus*) in Brahman (*Bos indicus*) cattle. I. Response of previously unexposed cattle to four infestations with 20,000 larvae. *Aust. J. Agric. Res.* 26, 1073-1078.
- Wang, H., Nuttall, P.A., 1999. Immunoglobulin-binding proteins in ticks: New target for vaccine development against a blood-feeding parasite. *Cell. Mol. Life Sci.* 56, 286-295.

Table 1

Least square (LS) means and 95% confidence interval (CI) of engorged tick biological traits in genetically tick-resistant and tick-susceptible artificially infested Braford heifers

Trait	Tick-Resistant			Tick-Susceptible		
	<i>N</i>	LS Mean	95% CI	<i>N</i>	LS Mean	95% CI
Initial weight (g)	138	0.204 ^a	0.186 – 0.222	510	0.202 ^a	0.190 – 0.214
Posture weight (g)	132	0.097 ^{b*}	0.087 – 0.107	483	0.109 ^a	0.102 – 0.116
Corpse weight (g)	121	0.044 ^a	0.038 – 0.050	377	0.045 ^a	0.041 – 0.049
REI (%) ¹	132	47.23 ^{b***}	45.66 – 48.80	483	53.51 ^a	52.43 – 54.58
NEI (%) ²	120	54.33 ^{b***}	51.49 – 57.17	376	66.43 ^a	64.51 – 68.34

^{a,b}Means with different superscripts within a line differ (^{*} $P < 0.05$, ^{***} $P < 0.001$).

¹Reproductive Efficiency Index.

²Nutritional Efficiency Index.

Table 2

Correlation among engorged tick biological traits obtained from genetically tick-resistant (R) and tick-susceptible (S) artificially infested Braford heifers

Trait	Group	Initial weight (g)	Posture weight (g)	Corpse weight (g)	REI (%)
Posture weight (g)	S	0.97***			
	R	0.80***			
Corpse weight (g)	S	0.89***	0.85***		
	R	0.62**	NS		
REI (%) ¹	S	0.32*	0.50***	0.39**	
	R	-0.46*	NS	NS	
NEI (%) ²	S	0.59***	0.66***	0.64***	0.72***
	R	NS	NS	NS	0.81***

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.0001$; NS = not significant.

¹Reproductive Efficiency Index.

²Nutritional Efficiency Index.

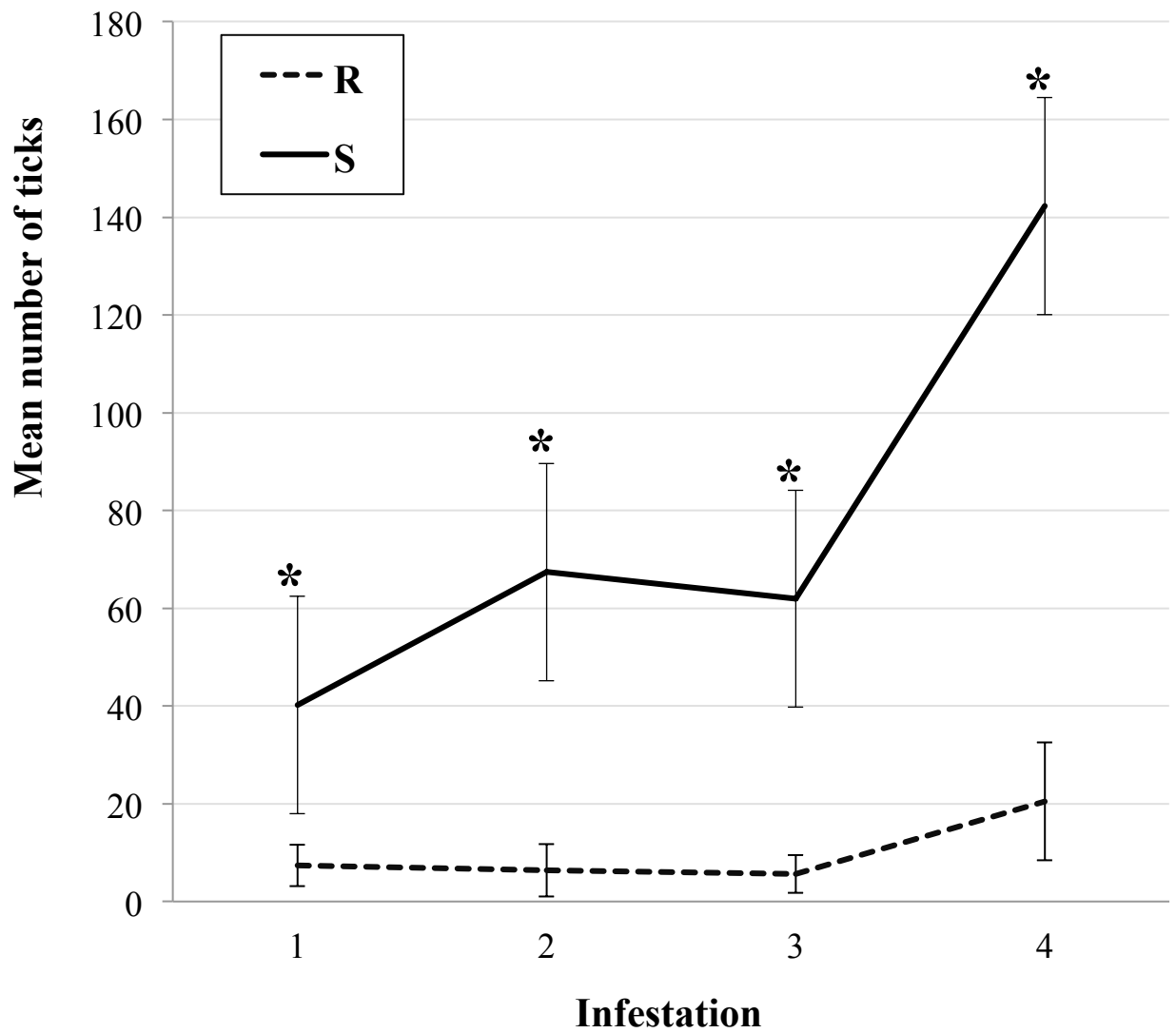


Fig. 1. Mean (\pm SE bars) tick count according to infestation and genetic tick-resistance group. Asterisks indicate difference between resistant (R) and susceptible (S) heifers ($P < 0.0001$).

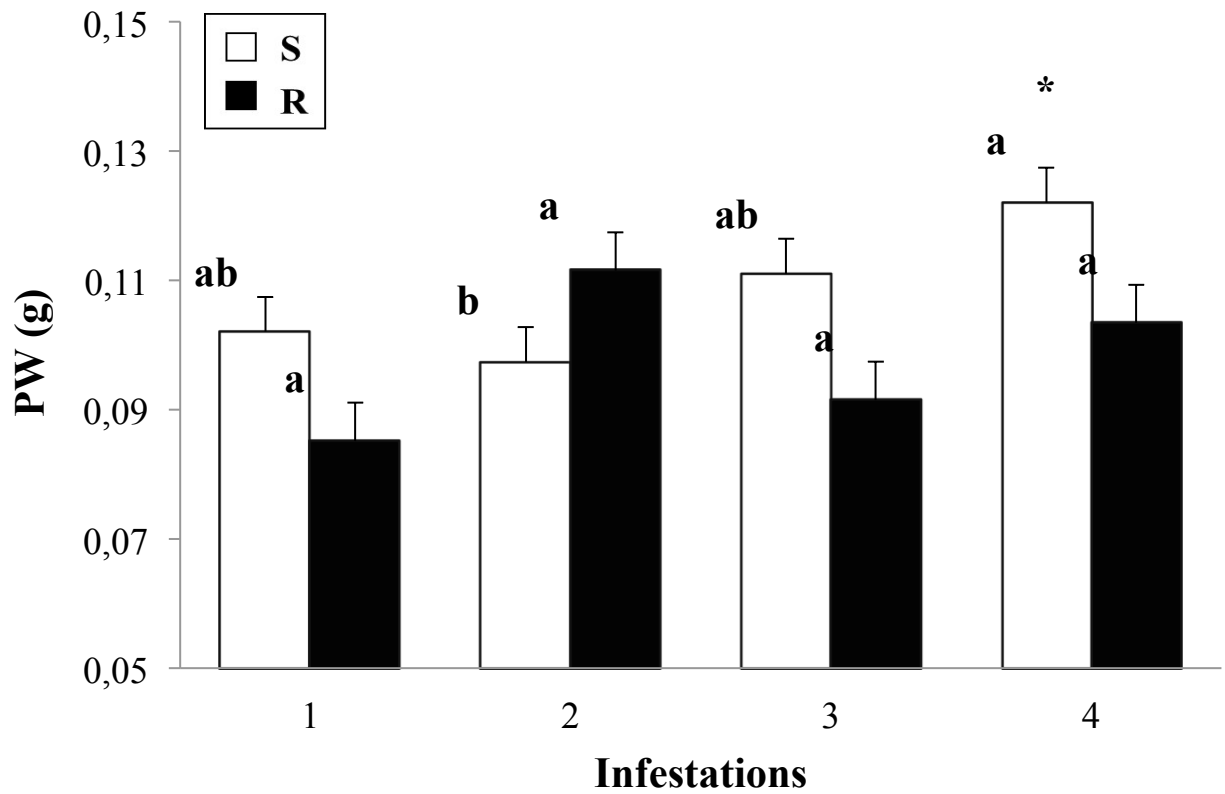


Fig. 2. Effect of bovine genetic resistance on posture weight least square mean (\pm SE) of ticks registered in genetically tick-resistant (R) and tick-susceptible (S) Braford heifers over four artificial infestations. Different small letters indicate difference ($P < 0.05$) within the same tick resistance group between artificial infestations. Asterisks indicate difference between R and S ($*P < 0.05$).

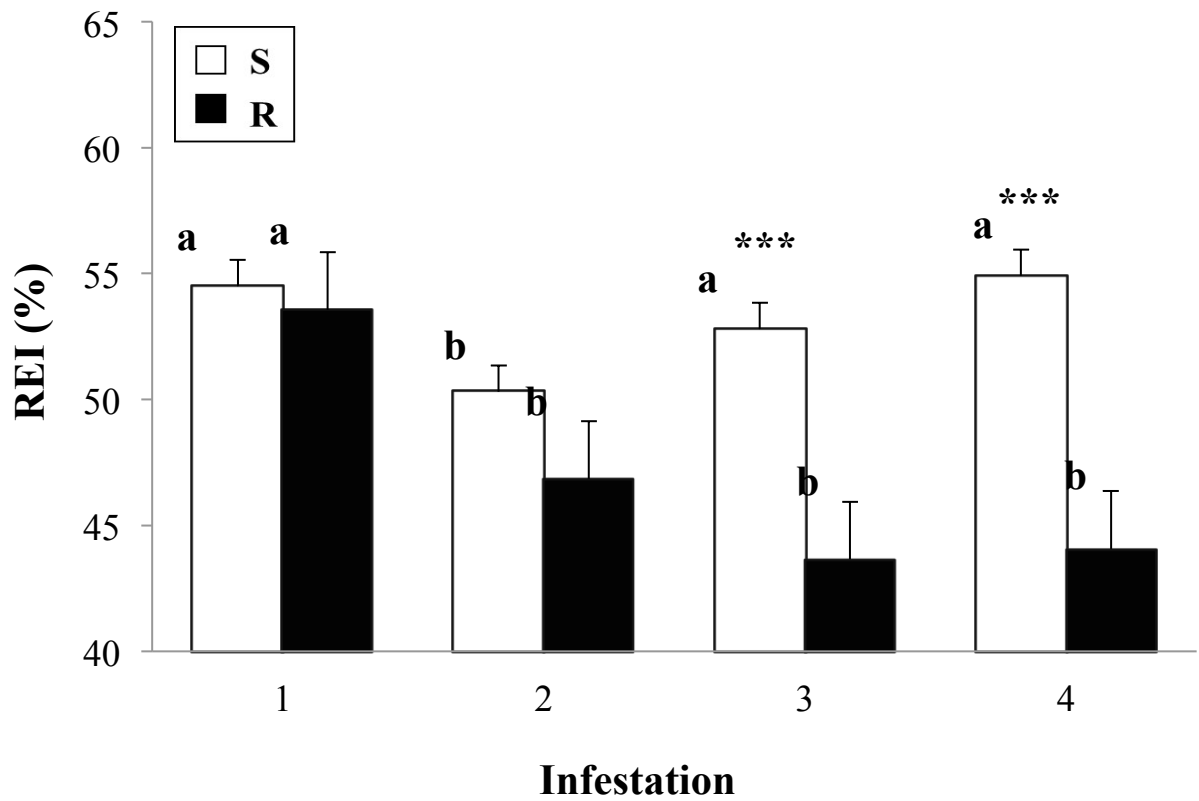


Fig. 3. Effect of bovine genetic resistance on reproductive efficiency index least square mean (\pm SE) of ticks registered in genetically tick-resistant (R) and tick-susceptible (S) Braford heifers over four artificial infestations. Different small letters indicate difference ($P < 0.05$) within the same tick resistance group between artificial infestations. Asterisks indicate difference between R and S (***) ($P < 0.0001$).

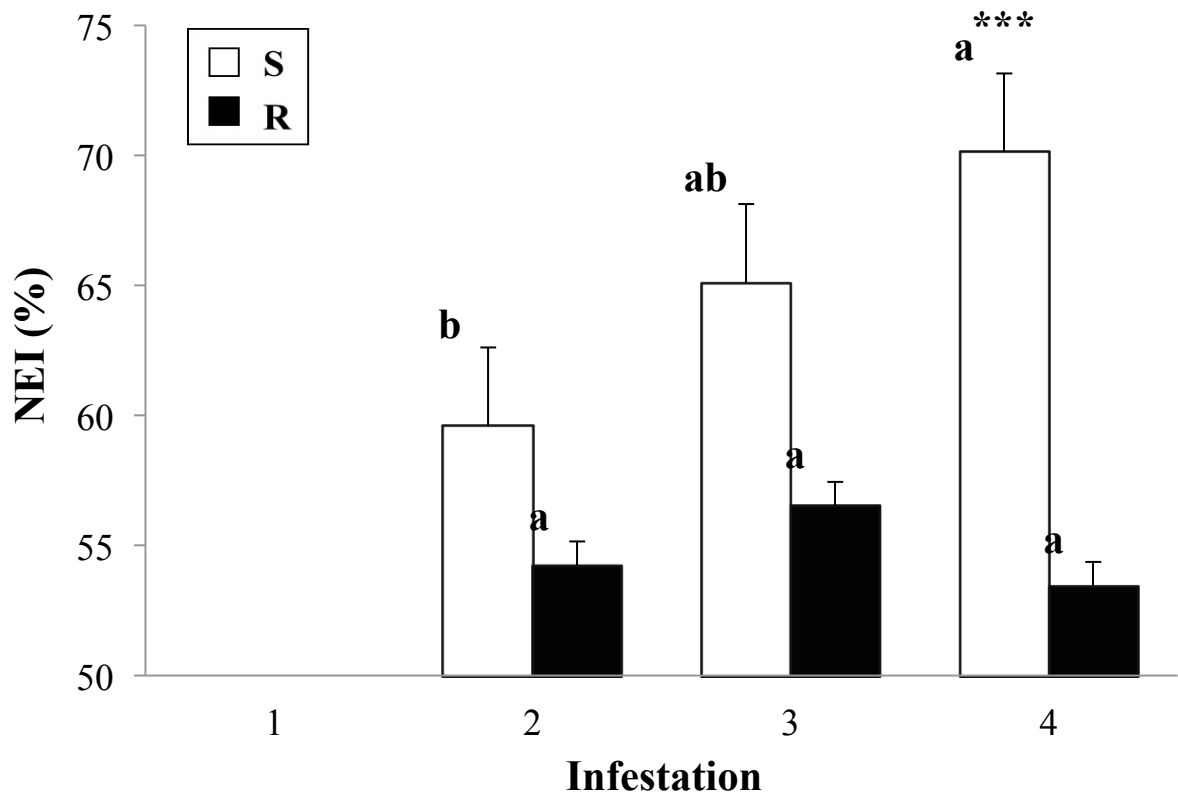


Fig. 4. Effect of bovine genetic resistance on nutritional efficiency index least square mean (\pm SE) of ticks registered in genetically tick-resistant (R) and tick-susceptible (S) Braford heifers over four artificial infestations. Different small letters indicate difference ($P < 0.05$) within the same tick resistance group between artificial infestations. Asterisks indicate difference between R and S ($***P < 0.0001$).

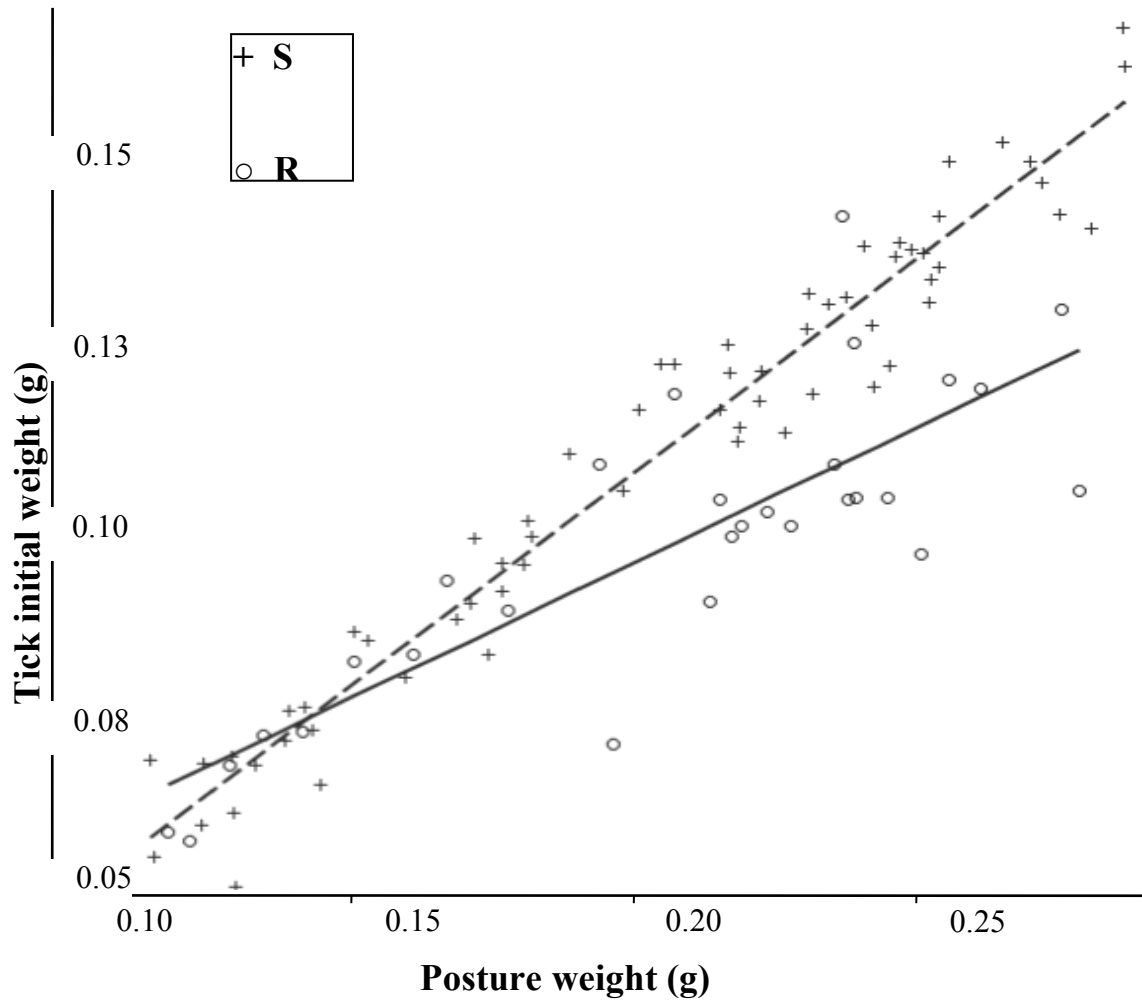


Fig. 5. Posture weight as a function of the initial weight of ticks engorged in genetically tick-susceptible (S) and tick-resistant (R) Braford heifers.

3.4 Artigo 4

Avaliação *in vitro* do efeito entomopatogênico de isolados fúngicos sobre larvas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

SILVA, S.S.; ARAÚJO, F.B.; MARMITT, I.V.P.; NIEDERMEYER, F.; FARIA, R.O.;
CESPEDES, C.O.C.; NIZOLI, L.Q.; MEIRELES, M.C.A.

Será submetido à revista: Acta Scientiae Veterinariae

Avaliação *in vitro* do efeito entomopatogênico de isolados fúngicos sobre larvas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

***In vitro* assessment of entomopathogenic effect of fungi isolates in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* tick larvae.**

Sergio Silva da Silva^{4*}; Flávia Biasoli Araújo⁵; Iuri Vladimir Pioly Marmitt¹; Fabiane Niedermeyer¹; Renata Osório Faria²; Carlos Octávio Cordovés Cespedes⁶; Leandro Quintana Nizoli¹; Mário Carlos Araújo Meireles²

Palavras-chave

Efeito entomopatogênico, fungos, larvas, carrapato, *R.B. microplus*

Abstract

Background: The tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* is a bovine ectoparasite that causes economic losses in herds of tropical and subtropical areas, due to the diseases it transmits and to the parasitism itself, which causes reductions in milk yield, calf production and high costs to control the tick. The capacity of entomopathogenic fungi to control stored grain pests, particularly Coleoptera, has been investigated in several studies in recent years. Emphasis has been on evaluation of the species *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* against pests of stored maize. Isolates often perform well in short-term laboratory bioassays, causing high rates of mortality within 1-2 weeks, although there may be significant variability in virulence and host specificity according to the origin and culture history of individual isolates. The aim of this study was to demonstrate the *in vitro* entomopathogenic effect of fungal isolates on larvae *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

⁴ Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil. CORRESPONDENCE: S.S.da Silva [silva.sergios10@gmail.com – Tel. +55 (53) 3275-7135]. Universidade Federal de Pelotas – UFPel, Campus Universitário Capão do Leão, Faculdade de Veterinária, Sala 5A . CEP 96.010-900 – Pelotas, RS, Brazil.

⁵ Laboratório de Micologia (MICVET) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil.

⁶ Instituto Interamericano de Cooperação para a Agricultura, Secretaria de Desenvolvimento Rural Sustentável do Estado do Rio Grande do Sul, Av. Praia de Belas, 1768, 4º Andar, Sala 402, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil – C.O.C.Cespedes [cordovesco@yahoo.com]

Materials, Methods & Results: The experiment was conducted in the Laboratory of Parasitic Diseases (LADOPAR), Faculty of Veterinary Medicine, Federal University of Pelotas. Were cultured four different fungal isolates to infect larvae inside of disposable tips sterile, including *B. bassiana*, *Aspergillus sp.*, *M. anisopliae*. Each tip was adsorbed previously with impregnation solution of 10^8 conidia. Live larvae were counted after 0, 7, 14 and 21 days after incubation (DAI). Live and dead larvae were incubated directly on agar dextrose potato to measure colony radial.

Discussion: *B. bassiana* isolates showed potential entomopathogenic effect producing nearly 100% mortality of tick larvae. There was reisolation from all isolates from live and dead larvae in culture medium. *B. bassiana* demonstrated potential for use in biological control of ticks.

Key words: entomopathogenic effect, fungi, larvae, tick, *R.B. microplus*.

Descritores: Efeito entomopatogênico, fungos, larvas, carrapato, *R.B. microplus*

Introdução

O carrapato *Rhipicephalus Boophilus microplus* é um ectoparasita dos bovinos que causa perdas econômicas em rebanhos de áreas tropicais e subtropicais, devido às doenças que transmite e ao próprio parasitismo, o que provoca redução na produção de leite, produção de bezerros e os altos custos para o controle do carrapato (de Castro and Newson, 1993).

Os métodos de controle das infestações por *R. B. microplus* são principalmente baseados no uso de produtos químicos. O uso incorreto desses produtos causam invariavelmente o desenvolvimento de resistência dos carrapatos e a contaminação do ambiente e dos alimentos com resíduos. Assim, cada vez mais o controle microbiológico tem aumentado e o uso de fungos tem sido uma das estratégias mais atrativas para o controle biológico desses artrópodes (Whitten et al., 1991), considerando que estes entomopatógenos são altamente especializados em penetrar nos tegumentos (Alves, 1998).

A capacidade de fungos entomopatogênicos para o controle de pragas da agricultura e da pecuária tem sido investigada em vários estudos nos últimos anos (Adane *et al.*, 1996; Moino *et al.*, 1998; Bourassa *et al.*, 2001; Kassa et al, 2002; Kaaya et al., 2002).

Uma grande ênfase tem sido na avaliação das espécies *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* contra parasitos dos bovinos como o carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Frazzon *et al.*, 2000). Em geral os isolados muitas vezes apresentam um bom

desempenho em ensaios biológicos, em condições laboratoriais de curto prazo, produzindo altas taxas de mortalidade dentro de 1 a 2 semanas, embora possa haver variabilidade significativa na virulência e da especificidade do hospedeiro de acordo com a origem e história da cultura de isolados individuais (Bidochka et al., 1997; Cherry et al., 2005).

O *M. anisopliae* e *B. bassiana* são considerados fungos imperfeitos (Deuteromycotina: Hyphomycetes). São fungos entomopatogênicos com uma das mais amplas faixas de hospedeiros, tem sido dos primeiros reconhecidos como candidatos potenciais para o controle biológico de pragas na agricultura, bem como apresentam ocorrência comum podendo ser facilmente isolados de amostras de solo e de artrópodes (Almeida, et al., 2001; Murad, et al., 2006). Fungos *M. anisopliae* invadem ativamente através da cutícula do hospedeiro (Alves, 1998) por pressão mecânica, devido à formação do apressório e de degradação produzida pela ação sinérgica de enzimas hidrolíticas como proteases, quitinases e lipases (St. Leger et al., 1986; Pinto et al., 1997; Bittencourt et al., 1999).

Todos os fungos entomopatogênicos apresentam esporos infectivos, conídios, que germinam e penetram na cutícula do seu hospedeiro (Hesketh et al., 2010). O processo de infecção dos fungos entomopatogênicos é iniciado pelos conídios, produzidos assexuadamente, que em contato com a cutícula do hospedeiro suscetível se fixam por interações hidrofóbicas (Alves, 1998). A adesão dos conídios depende da presença de várias enzimas como proteases, quitinases e esterases, que ocorrem na superfície dos conídios e que alteram a superfície do tegumento do organismo alvo, favorecendo a germinação e a nutrição do fungo (St Leger et al, 1986). Após a adesão, ocorre a germinação dos conídios na superfície, sendo que nessa fase o conídio forma um tubo germinativo que posteriormente se diferencia em apressório (Small et al., 2005). A fase de penetração envolve um processo físico onde há pressão mecânica da hifa terminal pelo apressório e grampo de penetração, e um processo químico, referente à produção de enzimas hidrolíticas, que degradam a cutícula do parasito (Clarkson et al., 1996). Após a penetração, o fungo se espalha pela hemocele (Flexner et al., 1996) e produz quantidades significativas de compostos tóxicos dentro do hospedeiro causando paralisia e morte. A beauvericina, beauverolides, bacianolide e isarolides, foram isolados de hospedeiros infectados por *Beauveria bassiana* (Hamill et al., 1969, Elsworth, 1977) e destruxin e citocalasin foram isolados a partir de hospedeiros infectados por *M. anisopliae* (Lubeck, 2008). Depois disso o fungo coloniza o corpo totalmente e esporula na sua superfície, podendo subsequentemente infectar outros hospedeiros suscetíveis.

A variabilidade genética dos isolados já foi comprovada, principalmente, quanto aos padrões moleculares e patogenicidade a insetos e ácaros pragas (Neves et al., 2000; Alves et al., 2001; Murad, et al., 2008), constituindo-se desta maneira em reservatórios diversificados para estudos visando a seleção de materiais que apresentem características adequadas para sua utilização em programas de controle biológico de pragas. A estratégia mais comum de uso de fungos entomopatogênicos no controle de pragas é a introdução inundativa, na qual se utilizam grandes quantidades do entomopatógeno para uma rápida supressão da população (Lacey et al., 2001).

O objetivo do presente trabalho foi demonstrar o efeito entomopatogênico *in vitro* de colônias fúngicas autóctones sobre larvas de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Laboratório de Doenças Parasitárias (LADOPAR) e Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Micologia Veterinária (MICVET) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas. Foram cultivados quatro diferentes isolados de fungos, em meio sólido de cultura ágar dextrose batata (PDA), para crescimento e quantificação de inóculos. Os isolados de fungos foram obtidos da Micoteca do Setor de Controle Biológico do LADOPAR/MICVET obtidos por isolamento de amostras ambientais parasitando artrópodes mortos capturados em experimentos prévios. Os isolados identificados como *Aspergillus* sp SCB06, *Metarhizium anisopliae* SCB09, *Beauveria bassiana* SCB12 e *Beauveria bassiana* SCB17 foram padronizados em inóculos de 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por mL de solução obtida a partir do último repique, em 48 horas antes do uso no desafio contra larvas de carrapatos.

Foram preparadas 60 ponteiras descartáveis de polietileno estéreis sem barreira (Diamont® D1000), contendo uma forração adaptada no interior com papel filtro absorvente (Whatmann nº2). Cada ponteira foi adsorvida previamente com impregnação do papel de filtro com solução de 100 µL contendo 10^8 UFC de cada isolado fúngico ou água destilada estéril para controle e vedadas com tecido de voal na base, fixado por borrachas odontológicas. O sistema de adsorção de culturas fúngicas em papel de filtro absorvente para a exposição de larvas para desafio apresenta uma proposta diferente daquela de autores como Bahiense, et al.,(2006), que tradicionalmente promovem imersão das larvas em solução líquida contendo fungo para posteriormente promover a secagem em papel absorvente.

As ponteiras foram separadas em 5 Grupos cada um com 12 ponteiras: Grupo 1 (Controle) impregnadas com água destilada estéril; Grupo 2 *Aspergillus* sp. SCB06; Grupo 3 *Metarhizium anisopliae* SCB09; Grupo 4 *Beauveria bassiana* SCB12 e Grupo 5 *Beauveria bassiana* SCB17. Para cada ponteira foram aspiradas 200 larvas de carrapatos *R. (B.) microplus* de 15 dias de vida, comprovadamente vivas móveis do isolado *RBm FVUFPEl 02* mantido no laboratório, utilizando-se uma bomba de vácuo a 200 mmHg (Motta et al., 2010).

Após a aspiração das larvas as ponteiras foram fechadas na ponta com parafilme, para evitar fuga e foram mantidas em estufa até 21 dias em estufa B.O.D. a 28° C e umidade relativa do ar superior a 80%. Um conjunto de três ponteiras aleatórias de cada grupo foi removido da estufa no dia 0, 7, 14 e 21 dias após a incubação (DAI), abertas e foram contadas as larvas vivas móveis por aspiração com a bomba de vácuo.

De cada conjunto de ponteiras 6 larvas vivas e 6 mortas foram selecionadas e semeadas em meio de cultura sólido ágar Sabouraud dextrose para reisolamento dos fungos e demonstração do crescimento da colônia após desafio nas larvas. A partir da semeadura, o crescimento radial da colônia (Lubeck et al., 2008) foi mensurado com paquímetro pelo diâmetro da colônia durante três dias (24, 48 e 72 horas). Para a realização das semeaduras e das leituras, foi utilizado um grid de 12 células de um cm², aplicável externamente sobre a placa de cultura para localização da posição de cada um dos inóculos. O tempo de interação entre os isolados e as larvas no interior das ponteiras no dia zero foi de 60 minutos, enquanto que para as demais foi de 7, 14 e 21 DAI.

As placas de Petri contendo as culturas foram mantidas em estufa bacteriológica a 28°C.

Para analisar a correlação entre o índice de mortalidade de larvas e o crescimento radial das colônias fúngicas reisoladas foi feito o Teste de correlação de Spearman utilizando o Software Statistix V9.0. Os dados de taxa mortalidade em percentual foram transformados em logaritmo (\log^{x+1}) e realizada a Análise de Variância (ANOVA) e comparação das médias pelo teste de Tukey com 95% de Intervalo de Confiança utilizando o Software Statistix V9.0.

Resultados e Discussão

Durante o desafio promovido pelo tempo de exposição das colônias fúngicas, houve atenuação fúngica dos isolados pela reprodução às custas dos substratos disponibilizados pelo contato com as larvas de carrapatos. No caso de *Aspergillus* sp. e *Metarhizium anisopliae* houve crescimento dos isolados, que foi comprovado pelo reisolamento em meio de cultura de ágar Sabouraud, crescente com o tempo de exposição. No entanto não foi demonstrado o efeito entomopatogênico descrito para outros fungos, já que as mortalidades obtidas no 21 DAI foram similares ao grupo controle, conforme tabela 1. No período inicial, 0 DAI o grupo inoculado com *Aspergillus* sp. apresentou mortalidade superior aos grupos controle e *Metarhizium anisopliae*. Provavelmente, este efeito seja devido às interações inespecíficas, produzidas pelo rápido crescimento do isolado fúngico, como característica peculiar de fungos ambientais, como *Aspergillus* sp. favorecida pela condição de temperatura, alta umidade relativa do ar e substrato biológico. Miranda-Miranda et al., (2011) demonstraram que o *Aspergillus* é um dos contaminantes naturais de carrapatos, e em algumas situações pode ser causador de infecção letal pela produção de toxinas. No presente trabalho, não foram caracterizadas toxinas produzidas pelos fungos em crescimento durante o ataque às larvas.

A análise da mortalidade das larvas após desafio pelos isolados dos fungos *Beauveria bassiana* SCB12 e SCB 17 demonstraram efeito entomopatogênico. A mortalidade por estes isolados nos intervalos de exposição de 21 DAI foi superior àquela do grupo controle. Um dos isolados teve mortalidade intermediária quando comparada com o outro isolado de *B. bassiana* SCB17 e o grupo controle no 7 DAI, conforme tabela 2.

Outros autores têm relatado a *Beauveria* sp. como um fungo candidato promissor para estratégias de controle de carrapatos na forma livre como larvas, assim como em teleóginas ingurgitadas e desprendidas dos hospedeiros bovinos. Historicamente tem sido demonstrado resultados que caracterizam diferenças no efeito entomopatogênico entre isolados de *B. bassiana* diferenças no efeito entomopatogênico. Tem sido demonstrado que isolados de *B. bassiana* apresentam maior efeito na mortalidade de teleóginas de *R. (B.) microplus* do que *M. anisopliae*, com resultados semelhantes para o efeito sobre larvas (Perinotto et al., 2012).

No presente trabalho, dentre os dois isolados testados, no 21 DAI não houve diferença, no entanto o isolado *Beauveria bassiana* SCB 12 foi mais precoce no efeito nocivo sobre as

larvas do que *Beauveria bassiana* SCB 17, que retardou o seu efeito, equivalendo-se apenas a partir do 14 DAI, descritos na tabela 2.

Quando analisados os efeitos entomopatogênicos dos diferentes isolados fúngicos submetidos a desafio sobre larvas, foram observados dois comportamentos, relacionados à eficiência no controle de formas de vida livre de carrapatos. Se por um lado as mortalidades produzidas pelos isolados de *Aspergillus* sp. SCB 02 e *M. anisopliae* SCB 09 tiveram comportamento muito semelhante ao grupo controle (69,0%) no 21 DAI, as mortalidades produzidas pelos isolados *B. bassiana* SCB 12 e SCB 17, estiveram muito próximas de 100% (95,2%), mostrado na fig. 1. Estes resultados são encorajadores como candidatos promissores ao desenvolvimento para aplicação em controle biológico do potencial biótico de infestações de carrapatos no campo. Os dados corroboram com as descrições de Kaaya et al., (1996), que reforçaram há muito anos o potencial do controle biológico integrado ao uso de pesticidas químicos.

Em relação às características da cultura pós-desafio sobre larvas de carrapatos e crescimento fúngico, foi possível o reisolamento a partir de larvas atacadas vivas e mortas. Na mensuração do crescimento radial de colônia *in vitro* foi detectado que houve variação na velocidade e intensidade de crescimento de acordo com o isolado. A variação da velocidade de crescimento foi descrita por Lubreck et al., (2008), naquele estudo os autores demonstraram variações de crescimento radial entre diferentes isolados fúngicos submetidos a diferentes condições de temperatura de incubação. Comparativamente a maior precocidade e crescimento radial foi obtida em *Aspergillus* sp. SCB 02 desde o zero até o 21 DAI, enquanto que os demais isolados tiveram desenvolvimento mais retardado como descrito na tabela 3.

Analisando os diferentes níveis de crescimento de colônia no 14 DAI, ficou demonstrado que não houve correlação significativa ($P > 0,05$) com as respectivas taxas de mortalidade. O coeficiente de relação obtido foi de $r = -0,2079$.

Os achados demonstraram que o potencial de crescimento das colônias fúngicas no reisolamento em meio de cultura, não estão relacionadas diretamente com o efeito entomopatogênico sobre as larvas de carrapatos em condições de laboratório. Provavelmente o potencial de crescimento no reisolamento possa estar associado com as características de ambiência nas condições experimentais, sem necessariamente ter relação com as características de entomopatogenicidade de cada isolado.

Considerando o potencial efeito entomopatogênico dos isolados *Beauveria bassiana* SCB 12 e SCB 17 em condições de laboratório em temperatura e umidades constantes, é possível especular sobre a necessidade de realização de testes em condições de campo com temperaturas e umidade favoráveis. Para Monteiro, et al., (1998), mesmo sendo constatados efeitos nítidos sobre os ovos e as larvas de vida livre, os resultados experimentais podem sofrer derivações decorrentes das condições ambientais no campo.

Segundo Kaaya et al., (2000), larvas de *Rhipicephalus appendiculatus* e *Amblyomma variegatum*, apresentaram em suas pesquisas, 100% de mortalidade quando tratadas com 10^9 conídios/mL de *M. anisopliae* e *B. bassiana*. Para Samish et al., (2001) quando larvas ingurgitadas de *R. sanguineus* foram banhadas com suspensão de esporos na concentração 1×10^7 conídios/mL dos fungos *B. bassiana*, *Paecilomyces fumosoreus* e *Metarhizium flavoviride* apresentam mortalidade de 10 a 20% e quando tratadas com a mesma concentração com o fungo *M. anisopliae*, observou-se mortalidade de 49,1 a 82,6%.

Os trabalhos de Bittencourt et al. (1995), demonstraram que houve aumento na mortalidade de larvas de *R. B. microplus* devido à ação do fungo *B. bassiana* enquanto que Paião et al. (2001) observaram aumento da mortalidade de larvas proporcionalmente ao aumento das concentrações de esporos do fungo.

Para Butt et al., (2000), Wraight et al., (2001) a história da cultura é um dos fatores que pode influenciar na virulência dos fungos e que repetida em cultura *in vitro* pode causar atenuação de fungos patogênicos ou conduzir a diferenças de virulência entre os isolados.

Conclusões

Dentre diferentes isolados autóctones testados pelo desafio contra larvas de carrapatos *R.(B.) microplus*, somente os isolados de *B. bassiana* SCB12 e SCB17 apresentaram efeito entomopatogênico significativo. Não houve correlação significativa entre o diâmetro das colônias fúngicas reisoladas de carrapatos após o desafio, com as taxas de mortalidade. Os isolados fúngicos de *B. bassiana* apresentaram graus de efeitos entomopatogênicos em diferentes tempos de incubação durante o período de desafio, porém ao final de 21 DAI as taxas de mortalidade foram equivalentes. Sugerem-se estudos de adaptação das tecnologias de desafio para a demonstração de efeitos entomopatogênico para a seleção e uso de fungos com potencial de controle de larvas de carrapatos, em condições de campo.

Referências Bibliográficas

- Adane, K., Moore, D., Archer, S.A., 1996.** Preliminary studies on the use of *Beauveria bassiana* to control *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in the laboratory. *Journal of Stored Products Research* 32, 105–113.
- Almeida, J. E.; Filho, A. B. 2001.** Banco de microorganismos entomopatogênicos. *Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento*. 20: 30 – 35.
- Alves, S.B. 1998.** Controle microbiano de insetos. 2. ed. Piracicaba: FEALQ, 1163p.
- Alves, S.B.; Vieira, S.A.; Macedo, D.; Lopes, R.B. 2001.** Diversidade genética de isolados de *Metarhizium anisopliae* detectada por RAPD-PCR e patogenicidade a *Diatraea saccharalis*. In: *SIMPÓSIO DE CONTROLE BIOLÓGICO*, 7., Poços de Caldas, MG. Resumos. Lavras: 2001. p.175.
- Basso, L.M.S; Monteiro, A.C.; Belo, M.A.A.; Soares, V.E.; Garcia, M.V.; Mochi, D.A. 2005.** Controle de larvas de *Boophilus microplus* por *Metarhizium anisopliae* em pastagens infestadas artificialmente. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40(6):595-600.
- Bahiense, T.C.; Fernandes, E.K.K.; Bittencourt, V.R.E.P. 2006.** Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Veterinary Parasitology* 141: 319–324.
- Bidochka, M. J.; St. Leger, R. J.; Roberts, D. W. 1997.** Mechanism of deuteromycetes fungal infections in grasshoppers and locusts: an overview. *Memors of the Entomology Society of Canada*. 171: 213 - 224.
- Bittencourt, V.R.E.P. et al. 1995.** Eficácia in vitro dos isolados 747 e 986 do fungo *Beauveria bassiana* no carrapato *Boophilus microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*,4(1.1.):86.
- Bittencourt, V.R.E.P., Mascaranhas, A.G., Faccini, J.L.H., 1999.** Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. *Ciência Rural* 29, 351–354.
- Bourassa, C., Vincent, C., Lomer, C.J., Borgemeister, C., Mauffette, Y., 2001.** Effects of entomopathogenic Hyphomycetes against the larger grain borer, *Prostephanus truncatus*

(Horn) (Coleoptera: Bostrichidae), and its predator, *Teretriosoma nigrescens* Lewis (Coleoptera: Histeridae). *Journal of Invertebrate Pathology*. 77, 75–77.

Cherry, A.J.; Abalo, P.; Hell, K.A. 2005. A laboratory assessment of the potential of diferente strains of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* (Balsamo) Vuillemin and *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff) to control *Callosabruachus maculatus* (F.) (Coleóptera:Brucidae) in stored cowpea. *Journal of Stored Products Research*, 41(3): 295-309.

Clarkson, J.M.; Charnley, A.K. 1996. New insights into mechanisms of fungal pathogenesis in insects. *Trends in Microbiology* 4(5):197-203.

Correia, A.C.B., Fiorin, A.C., Monteiro, A.C., Veríssimo, C.J. 1998. Effects of *Metarhizium anisopliae* on the tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in stabled cattle. *J. Invertebr. Pathol.* 71, 189–191.

de Castro, J.J., Newson, R.M., 1993. Host resistance in cattle tick control. *Parasitology Today* 9: 13–17.

Elsworth, J.F.; Grove, J. F. 1977. Cyclodepsipeptides from *Beauveria bassiana* Bals, Parte I Beaueroides H and I. *Journal of the chemical Society*3(3): 270-273.

Flexner, J.; Lighthert, B.; Croft, B.A. 1986. The effect of microbial pesticides to non-target, beneficial arthropds. *Agriculture, ecosystems & environment, Amsterdan*,16: 203-254.

Frazzon, A.P., Vaz Junior, I., Masuda, A., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2000. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94: 117-125.

Hamill, R. L.; Sullivan, H.R.; Gorman, M. 1969. Determination of pyrrolnitrin and derivates bu gas-liquid chromatography. *Journal of Applied Microbiology*,18(.3): 310-312.

Hesketh, H.; Roy, H.E; Eilenberg, J.; Pell, J.K.; Hails, R.S. 2010. Challenges in modelling complexity of fungal entomopathogens in semi-natural populactions of insects. *BioControl*.(55):55-73.

- Kaaya, G.P., Mwangi, E., Ouna, E., 1996.** Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyomma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 67: 15–20.
- kaaya, G.P.; Hassan, S. 2000.** Entomogenous fungi as promising biopesticides for tick control. *Experimental and Applied Acarology* (24):913-926.
- Kassa, A., Zimmermann, G., Stephan, D., Vidal, S. 2002.** Susceptibility of *Sitophilus zeamais* (Motsch.) (Coleoptera: Curculionidae) and *Prostephanus truncatus* (Horn) (Coleoptera: Bostrichidae) to entomopathogenic fungi from Ethiopia. *Biochemical of Science Technology*, 12: 727–736.
- Lacey, L.A.; Frutos, R.; Kaya, H.K.; Vail, P. 2001.** Insect pathogens as biological control agents: do they have a future. *Biologic Control*, 21(3):230-248
- Lubeck, I., Arruda, W., Souza, B.K., Stanisçuaski, F., Carlini, C.R., Schrank, A., Vainstein, M.H., 2008.** Evaluation of *Metarhizium anisopliae* strains as potential biocontrol agents of the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and the cotton stainer *Dysdercus peruvianus*. *Fungal Ecology* 1: 78-88.
- Moino, A., Alves, S.B., Pereira, R.M., 1998.** Efficacy of *Beauveria bassiana* (Balsamo) vuillemin isolates for control of stored-grain pests. *Journal of Applied. Entomology* 122: 301–305.
- Monteiro, S.G., Bittencourt, V.R.E.P., Daemon, E., Faccini, J.L.H., 1998.** Efeito dos fungos entomopatogênicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari:Ixodidae). *Ciência Rural* 28: 461–466.
- Motta, J.F.; Marmitt, Rodrigues, A.C.; Bento, J.R.; Araújo, L.F.; Silva, S.S. 2011.** Metodologia de aspiração de larvas de *Rhipicephalus microplus* com bomba a vácuo. *Congresso de Iniciação Científica UCPel*, 20:28. Pelotas, RS.
- Murad A.M.; Laumann, R.A.; Lima, T.A.; Sarmiento, R.C.; Noronha, E.F.; Rocha, T.L.; Valadares-Ingliš, M.C.; Franco, O.L. 2006.** Screening of entomopathogenic *Metarhizium anisopliae* isolates and proteomic analysis of secretion synthesized in response to cowpea weevil (*Callosobruchus maculatus*) exoskeleton. *Comparative Biochemistry and Physiology*, Part C 142:365–370

- Murad A.M.; Noronha, E.F.; Miller, R.N.G.; Costa, F.T.; Pereira, C.D.; Mehta, A., Caldas, R.A.; Franco, O.L. 2008.** Proteomic analysis of *Metarhizium anisopliae* secretion in the presence of the insect pest *Callosobruchus maculatus*. *Microbiology* 154: 3766–3774.
- Neves, P.J.; Alves, S.B. . 2000.** Selection of *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. and *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. strains for control of *Cornitermes cumulans* (Kollar). *Braz. Arch. Biol. Technol.*, 43(4):373-378
- Paião, J.C.V., Monteiro, A.C., Kronka, S.N. 2001.** Susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) to isolates of the fungus *Beauveria bassiana*. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 245–251.
- Perinotto, W.M.S.; Angelo, I.C.; Golo, P.S.; Quinelato, S.; Camargo, M.G.; Sá, F.A.; Bittencourt, V.R.E.P., 2012.** Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental Parasitology* 130: 257–260
- Pinto, A.S., Barreto, C.C., Schrank, A., Ulhoa, C.J., Vainstein, M.H., 1997.** Purification and characterization of an extracellular chitinase from the entomopathogen *Metarhizium anisopliae*. *Canadian Journal of Microbiology.* 43: 322–327.
- Samish, M. et al. 2001.** Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Journal of Parasitology, Lawrence*, 87(6): p.1355-1359.
- Small, C.L.N.; Bidochka, M.J. 2005.** Up regulation fo Prl a subtilisin-like protease, during conidiation in the insect pathogen *Metarhizium anisopliae*. *Mycological Research*, 109(3) p.307-313.
- St. Leger, R.J., Charnley, A.K., Cooper, R.M., 1986.** Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: mechanisms of interation between pathogen enzymes and insect cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 47: 295–302.
- Whitten, M.J; Oakeshott, J.G. 1991.** Opportunities for modern biotechnology in control of insect pest and weeds, with special reference to developing countries. *FAO Plant Protection Bulletin, Rome*, 39(4):155-181.

Tabela 1. Análise da comparação da mortalidade de larvas de *R. B. microplus* entre os grupos desafiados com *Aspergillus* sp SCB 02, *Metarhizium anisopliae* SCB 09 e controle com água destilada estéril por diferentes períodos de incubação *in vitro*.

Grupo	0 DAI	7 DAI	14 DAI	21 DAI
<i>Aspergillus</i> sp SCB 02	15,2%±8,1 A	34,7%±12,7 A	55,5%±37,8 A	67,2%±28,5 A
<i>Metarhizium anisopliae</i> SCB09	7,3%±6,5 ^B	24,3%±22,1 A	60,5%±21,8 A	70,8%±17,6 A
Controle	0,7%±2,3 ^B	17,8%±10,7 A	58,8±33,0 ^A	71,8%±23,7 A

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey com Intervalo de Confiança de 95%.

Tabela 2. Análise da comparação da mortalidade de larvas de *R. B. microplus* entre os grupos desafiados com *Beauveria bassiana* SCB 12 e SCB 17 e controle com água destilada estéril por diferentes períodos de incubação *in vitro*.

Grupo	0 DAI	7 DAI	14 DAI	21 DAI
Controle	0,7%±2,3 ^B	17,8%±10,7 ^B	58,8±33,0 ^B	71,8%±23,7 ^B
<i>Beauveria bassiana</i> SCB 12	25,3%±18,2 A	45,5%±33,2 ^A	92,3±8,5 ^A	95,7%±3,8 ^A
<i>Beauveria bassiana</i> SCB 17	1,3%±2,5 ^B	39,5%±15,7 ^{AB}	91,7±5,7 ^A	94,7%±5,5 ^A

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$) pelo teste de Tukey com Intervalo de Confiança de 95%.

Tabela 3. Análise do crescimento radial em mm de reisolados fúngicos oriundos de desafio em larvas de *R. B. microplus* após 72 horas em meio de cultura por diferentes períodos de incubação.

Grupo	Diametro dia 0	Diametro dia 7	Diametro dia 14	Mortalidade 14 DAI
<i>Aspergillus</i> sp SCB 02	9,50± 0,67 A	9,83 ± 0,72 A	9,58 ± 1,24 A	55,50%
<i>B. bassiana</i> SCB 17	0,00± - B	7,91 ± 3,03 AB	9,25 ± 1,81 AB	91,70%
<i>M. anisopliae</i> SCB 09	0,00± - B	2,50 ± 1,24 C	7,25 ± 2,30 AB	60,50%
<i>B. bassiana</i> SCB 12	0,00± - B	4,30 ± 3,10 BC	7,00 ± 2,45 B	92,30%

Letras diferentes na coluna indicam diferença estatística ($P < 0,05$) na análise de variância e comparação das médias pelo teste de Kruskal-Wallis com Intervalo de Confiança de 95%.

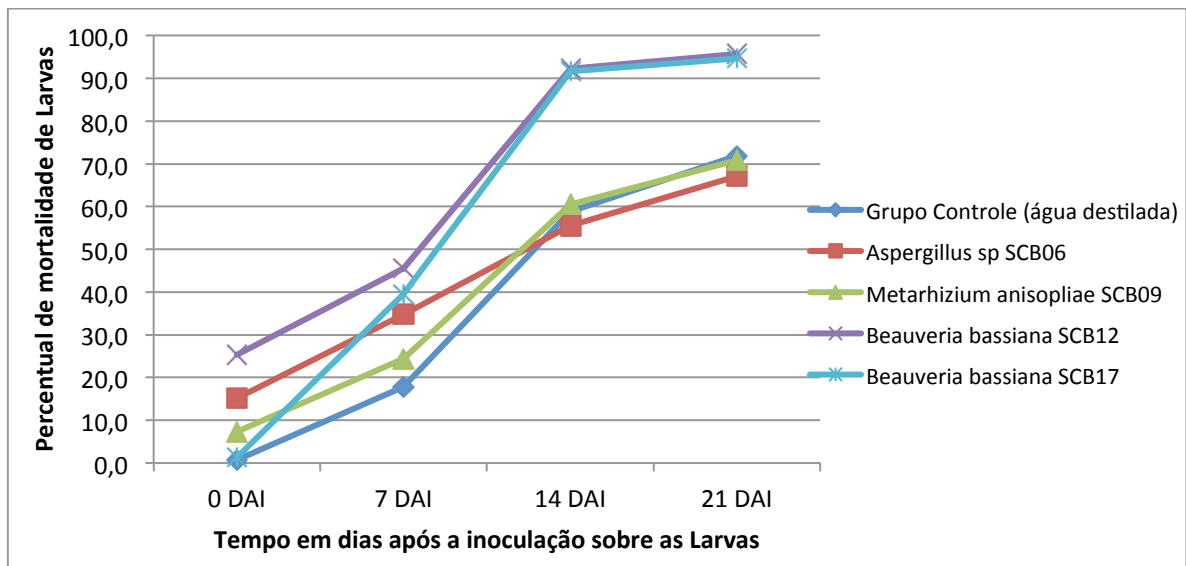


Fig. 1. Análise da comparação da mortalidade de larvas de *R. B. microplus* entre os grupos desafiados com diferentes isolados fúngicos e controle com água destilada estéril por diferentes períodos de incubação *in vitro*.

4 CONCLUSÃO GERAL

A resistência às drogas carrapaticidas apresenta ampla e crescente distribuição no Rio Grande do Sul, com alto grau de risco de dispersão entre propriedades pecuárias; a quimioprofilaxia para a tristeza parasitária bovina, pode ser recomendada como importante ferramenta de manejo para aceleração de crescimento e acabamento de carcaças em bovinos super precoces destinados ao abate; a resistência genética de bovinos é um importante fator para a redução das infestações por carrapatos e pode ser utilizada como um dos critérios de seleção de reprodutores destinados para a produção pecuária em regiões endêmicas de infestações por carrapatos; os fungos autóctones com efeito entomopatogênicos como *Beauveria bassiana* representam importantes controladores de infestações por carrapatos e devem ser melhor estudados para contribuição nas estratégias de controle integrado. A integração de medidas de controle biológico com microorganismos entomopatogênicos com o controle genético visando a adequação de perfis imunológicos dos reprodutores associados ao controle químico vigiado e monitorado deverá ser reforçada com estratégia. O controle químico de carrapatos deve ser indicado nas propriedades rurais como ferramenta complementar e não prioritária para contenção das infestações por carrapatos nos rebanhos bovinos.

5 REFERÊNCIAS

ALVES, S. B. **Controle Microbiano de Insetos**. São Paulo: Manole, 1986, 407p.

ALVES, S. B. Fungos entomopatogênicos. In: ALVES, S. B. (Ed.) **Controle microbiano de insetos**. 2 ed. Piracicaba: FEALQ, 1998. p. 289-382.

BITTENCOURT, V.R.E.P., MASSARD, C.L., LIMA, A.F. Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). **Revista Universidade Rural - Série Ciências da Vida**, v. 17, p. 83-88, 1995.

BITTENCOURT, V. R. E. P. et al. Avaliação do efeito do contato de *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. com ovos e larvas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 5, n. 2, p. 81-84, 1996.

BITTENCOURT, V. R. E. P. et al. Avaliação da eficácia in vitro de dois isolados do fungo entomopatogênico *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuill. em fêmeas ingurgitadas de *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 6, n. 1, p. 49-52, 1997.

DRUMMOND, R.O., GLADNEY, W.J., WHETSTONE, T.M., et al. Laboratory testing of insecticides for control of the winter tick. **Journal of Economical Entomology**, v. 64, p. 686-688, 1971.

MADLIN, M. F., ROBINSON, R. K., WILLIAMS, R.J. Appressorium-like structures in insect parasiting deuteromycetes. **Journal of Invertebrate Pathology**, v. 9, p. 404-412, 1967.

GEARY, T.G., CONDER, G.A., BISHOP, B., 2004. The changing landscape of antiparasitic drug discovery for veterinary medicine. **Trends Parasitol.** 20, 449–455.

GITHIORI, J.B., HOGLUND, J., WALLER, P.J., 2005. Ethnoveterinary plantpreparations as livestock dewormers: practices, popular beliefs, pitfalls and prospects for the future. **Ann. Health Res. Rev.** 6, 91–103.

MCKELLAR, Q.A., JACKSON, F., 2004. Veterinary anthelmintics: old and new. **Trends Parasitol.** 20, 456–461.

PERRY, B.D., RANDOLPH, R.F., MCDERMOTT, J.J., SONES, K.R., THORNTON, P.K., 2002. Investing in Animal Health Research to Alleviate Poverty. International Livestock Research Institute (ILRI), Nairobi, Kenya, 148 pp.

SCHILLHORN VAN VEEN, T.W., 1999. Agricultural policy and sustainable livestock development. **Int. J. Parasitol.** 29, 7–15.

WOOD MACKENZIE, 2007. Animal Health Market by Species. <http://www.ifahsec.org/Search/search.asp>.

WALLER, P.J. 2006. From discovery to development: Current industry perspectives for the development of novel methods of helminth control in livestock. **Veterinary Parasitology** 139: 1–14