

EL EMPLEO DE NUEVOS PARAMETROS
EN LA EVALUACION IN VITRO
DE LA EFICACIA DE ACARICIDAS FRENTE
A BOOPHILUS MICROPLUS (CAN.)

G. Mauricio Bulman¹
Carlos M. Brunel²
Beatriz I. D'Agostino³

RESUMEN

La eficacia de los productos garrapaticidas frente a la garrapata común del vacuno Boophilus microplus (Can.) ha sido evaluada por diversos métodos in vitro, utilizándose más comunmente la medición de la actividad sobre las larvas.

En el presente trabajo empleando teleoginas previamente tratadas, se dan a conocer los resultados logrados con el uso de ocho parámetros que miden la acción acaricida en las diferentes etapas de vida no-parasitaria de esta garrapata, frente al comportamiento in vitro de lotes testigos.

Se discuten las ventajas del empleo de estos parámetros para evaluar las cualidades de los organofosforados como también de nuevos compuestos químicos acaricidas.

INTRODUCCION:

La eficacia de los productos químicos ante la garrapata Boophilus microplus (Can.) ha sido medida biológicamente in vitro mediante varias pruebas, empleando tanto teleoginas {^{1 2 4 5 6 7}} como larvas {^{1 2 3 4 5 6 8 9 10 12}}. Este estadio se utiliza con suma frecuencia, tanto por investigadores extranjeros {^{8 9 11 12}} como argentinos {^{3 4 5 6}} para medir los índices de resistencia del B. microplus a los organofosforados y otros principios activos.

El uso de teleoginas solo se ha limitado en general a lograr los índices de oviposición y eclosión, pero recientes investigaciones {⁷} en el CEDIVEF* sobre la acción de nuevos acaricidas de uso no convencional, difíciles de evaluar únicamente en pruebas a campo, permitieron establecer otros parámetros

¹ Miembro Carrera del Investigador del CONICET. Director, CEDIVEF, Casilla -- 292,3600 FORMOSA (Argentina).

² Personal técnico del CEDIVEF

³ Becaria del CONICET

de medición in vitro que evaluados en conjunto, determinan niveles de acción y confiabilidad de los productos estudiados frente al parásito.

Material y métodos.

Fueron seleccionadas teleoginas adultas repletas desprendidas manualmente o recogidas del suelo, que parasitaran bovinos Bostaurus de raza criolla, cruza con razas británicas, en el Campo Experimental Sargento Rivarola, sito a pocos kilómetros de la ciudad de Formosa. La cepa no demostró quimio-resistencia.

En el mismo día de recolección se separaron 5 lotes de 50 teleoginas sanas cada uno, sometiendo los tratados a la acción de dos productos elegidos al azar y en diferentes concentraciones, mientras el testigo recibió la acción de agua destilada. El tiempo de contacto con las soluciones líquidas -- fue de 15 segundos, momento en el cual se eliminaba el sobrenadante, pasando a secar las teleoginas en sucesivos pases sobre papel de filtro en placas de petri.

Finalmente, tras 10 minutos de secado final a temperatura ambiente, se pasaban individualmente a tubos de Metianu debidamente marcados, colocándose éstos en una pieza a 27°C y 85% de HRA.

Se emplearon como garrapaticidas, el coumaphos {¹} y el amitraz {²}, el primero un organofosforado y el segundo una diamidida, en concentraciones al 100 y 75% respectivamente, de las indicadas para el pie de baño por los laboratorios distribuidores (1/600 y 2/1000 + 10 kg de estabilizante, respectivamente).

Las teleoginas fueron observadas diariamente registrándose los datos en planillas ad hoc. En los tubos testigo se retiraba la kenogina incipiente a los 18 días al pesar los huevos, y en el caso de los tubos tratados recién al morir las teleoginas, hubiesen o no comenzado su oviposición. Las larvas a su vez, se observaron hasta los 60 días posteclosión.

Resultados.

Los resultados obtenidos en el trabajo se exponen en los gráficos I al VIII.

El número de aoves (Gráfico I) con relación al total de garrapatas incubadas, demostró que la inhibición en ambos productos al 100% fue buena, no así al 75% donde el amitraz fue marcadamente pobre, alcanzando sólo el 34%.

Con respecto a los días transcurridos para comenzar el aove, las medias logradas en los lotes tratados al 100% no ofrecieron diferencias apreciables entre sí. Los mayores lapsos con relación al lote testigo representaron el 84 y 65% respectivamente. El coumaphos 75 a su vez, señaló la menor postergación del inicio del aove, pero superó no obstante en un 50% a los testigos (Gráfico II).

En el Gráfico III se registra la supervivencia en días de las teleoginas de los lotes tratados y testigo. Las teleoginas del lote amitraz 75 alcanzaron el 88% de una supervivencia considerada normal, mientras en los demás lotes con aove, se registraron cifras inferiores al 79%. En las teleoginas sin aove, la supervivencia fue menor. Aclárase que en los testigos, la media de 21 días se obtiene sumando los 3,8 días hasta el aove con los 18 días hasta ser retiradas las teleoginas vivas de los tubos de Metianu, siendo por lo tanto la supervivencia total mucho mayor.

{*} Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias Formosa.

{¹} Ester 0,0 dietiltiofosfórico 3 Cloro-4-metil-7-oxicumarina.

{²} NN-di-(2,4 Dimetilfenil)metil-Metilamina).

En el Gráfico IV el coumaphos 75 registró a los 18 días, una oviposición inferior a la del lote 100, siendo ambas comparativamente insignificantes frente al lote testigo (14,5 y 1,8% respectivamente). En cambio en los lotes con amitraz, la oviposición fue mayor y alcanzó el 26 y 31% del testigo.

Esta menor inhibición por el amitraz, tanto en los lotes 100 como 75, se repite en el Gráfico V, donde se registra el porcentaje de eclosión de las correspondientes oviposiciones. En estos lotes, la inhibición alcanzó el 73- y 69% respectivamente, mientras que con el coumaphos 100 ésta fue superior al 85%.

Al comparar el tiempo, medido en días, transcurridos desde el inicio del aove y el comienzo de la eclosión en los lotes tratados (Gráfico VI), éste no varió significativamente para los valores de los aoves donde hubo eclosión. En cambio todos los lotes acortaron este período y adelantaron el comienzo del aove en cifras superiores al 17% con relación a la media del lote testigo.

El porcentaje de eclosión de estos aoves (Gráfico VII) aportó nuevamente una inhibición notablemente menor en el lote amitraz 75 con relación a los demás.

Por último, en el Gráfico VIII se registran los valores de viabilidad de las larvas a los 20 y 60 días posteclosión.

Discusión:

Para el contacto de las teleoginas con los productos garrapaticidas, se adoptó un tiempo marcadamente más reducido, a diferencia de otros grupos de trabajo (INTA, Grillo Torrado *et al.*, 15 minutos y Pérez Arrieta *et al.*, 5 minutos). Ello se debió a la búsqueda de un lapso que asemejara convenientemente las condiciones de trabajo a campo, donde los vacunos nadan el largo de los bañaderos de inmersión en aproximadamente 15 segundos, ya que por el costo de los productos los bañaderos se construyen con un máximo de 9 metros de largo. Por otra parte, el secado rápido busca reproducir el trabajo en las especiales condiciones ecológicas con los elevados calores imperantes en el nordeste argentino. Esta nueva experiencia utilizando 15 segundos como tiempo de contacto de los productos con las teleoginas, confirmó sus ventajas y recomendó su adopción definitiva en la metodología de trabajo encarada por el CEDIVEF.

La elección del coumaphos y el amitraz obedeció a la única razón de emplear los parámetros de evaluación en acaricidas de distinto origen químico, mientras que el empleo de dos concentraciones al 75% de las indicadas para el pie de baño, creó productos hipotéticos con el sólo fin de la realización de este ensayo.

No obstante, resulta interesante destacar que si bien al 100% ambos productos mostraron pequeñas diferencias de comportamiento, aceptables en el contexto general de la prueba, el coumaphos fue superior en todo momento al amitraz.

En efecto, el amitraz 100 se encontraría cercano a su límite de confiabilidad, perdiendo considerablemente su eficacia al reducirse en un 25% el aporte del principio activo en el pie de baño. Al emplearse al 75%, surgieron serias deficiencias en la acción acaricida, contrariamente al coumaphos 75 donde el grado de confiabilidad resultó excelente y en algunos parámetros superó en eficacia al mismo producto en su concentración 100.

En la práctica es previsible que el mal manejo de los bañaderos y del producto, que incluye incorrectas ubicaciones, reposiciones y refuerzos, llevará en corto plazo a una selección química y supervivencia de ejemplares con la formación de cepas resistentes frente a este producto.

En el parámetro del Gráfico III, el amitraz 75 ya demostró un reducido efecto letal al ser comparado con los demás lotes. En el del Gráfico IV los lotes de coumaphos inhibieron satisfactoriamente la oviposición en ambas concentraciones, no así los lotes amitraz que demostraron una menor acción inhibidora sobre la actividad reproductiva de las hembras adultas. Este hecho se confirmó al estudiar la eclosión, donde no menor del 31% de los huevos fue-ron viables. Al proseguir el estudio, la viabilidad señalada se prolonga en las mediciones realizadas a los 20 y 60 días, permitiendo así una buena posi-bilidad de reinfestación con las larvas sobrevivientes, originadas de teleo-ginas de animales bañados con el amitraz.

Para una mejor interpretación de estos resultados, ambos productos se -diferenciaron, inclusive en las concentraciones 100, por el menor efecto letal del amitraz sobre las teleoginas, permitiendo el aove y la eclosión con-buena viabilidad de las larvas. Esto es coincidente con trabajos australia-nos {¹¹} que demostraron la formación rápida de metabolitos inocuos en las -larvas sometidas a pruebas de inmersión en soluciones con amitraz.

Un producto garrapaticida, aunque demuestre excelente acción de volteo-pero reducida acción letal, asegura la permanencia de la parasitación del --campo y consiguiente reinfestación del ganado. Con el empleo del coumaphos,-al menos con la cepa de B.microplus utilizada en el ensayo, esta superviven-cia del ácaro fue casi inexistente, hecho que aseguraría - siempre que medie un correcto manejo sanitario - el fin perseguido con las balneaciones, cual-es la reducción de la infestación y ulterior limpieza de los campos.

Con relación a los parámetros empleados, que cubren las distintas accio-nes de los acaricidas en los sucesivos estadios de evolución no parasitaria-de la garrapata, los autores estiman que el establecimiento de niveles máxi-mos de tolerancia, permitirá evaluar los garrapaticidas en una primera prue-ba in vitro, aconsejando por una parte la reconsideración de la formulación-presentada, o por otra, eliminando aquellos productos que no reúnen las con-diciones necesarias para un ensayo controlado a campo, con lo cual se reduci-rían los elevados costos de las pruebas oficiales actualmente en uso.

Nuevas investigaciones actualmente en ejecución en el CEDIVEF, unidas a las ya realizadas, buscan corroborar los niveles máximos de tolerancia deter-minados en los distintos parámetros y de allí evaluar satisfactoriamente en-pruebas de rutina, tanto los acaricidas que actúan por inmersión o aspersion, como los nuevos {⁷} que se aplican por vía parenteral.

SUMMARY

The efficiency of acaricides for the common cattle tick Boophilus-microplus (Can.) has been evaluated by various in vitro methods, - the measurement of their activity on larvae being the most commonly employed.

In this paper, in which previously treated adult female ticks are-used, the acaricide activity is measured during the different non-parasitic stages by the results found in eight efficiency parame-ters, comparing these with those found in non-treated control groups.

The advantages of the use of these parameters for evaluating the - quality of organophosphorous and other acaricide chemical compounds is then discussed.

BIBLIOGRAFIA

- 1) QUEVEDO J.M. (h); GUTIERREZ R.O.; ELIZONDO M.J. y LUKOVICH R.: Un procedimiento para medir la eficiencia de los garrapaticidas. *Re.-Inv.Gan., INTA, Bs.As., 17, 217:242 (1963);*
- 2) QUEVEDO J.M. (h); GUTIERREZ R.O. y Elizondo M.J.: Garrapaticidas, Garrapatas y una técnica para su estudio. II° Cong. Nac. de Veter. Bs.As., 1960. Public. SEAG, INTA (1966);
- 3) GRILLO TORRADO, J.M.; GUTIERREZ R.O. y PEREZ ARRIETA, A.: El factor de resistencia en larvas de la garrapata B.microplus (Can.) a los compuestos organofosforados. *Rev.Inv.Gan., Bs.As., Serie 4, Vol. IX, N° 1, 25:35 (1972);*
- 4) GRILLO TORRADO, J.M. y GUTIERREZ, R.O.: Método para medir la actividad de los acaricidas sobre larvas de garrapata. Evaluación de sensibilidad. *Rev.Inv.Agrup. INTA, 4, Pat.Anim., VI, 14, (1969);*
- 5) GRILLO TORRADO, J.M. y GUTIERREZ, R.O.: Fósforo resistencia de una cepa - argentina de garrapata B.microplus. Su medición. *Rev.Med. - Vet., Bs.As., 51, 2, (1970);*
- 6) PEREZ ARRIETA, A.; MARTI VIDAL, J.V. y BULMAN, G.M.: Determinación y estudio de una nueva cepa argentina fósforo-resistente de B.microplus (Can.), proveniente de Santo Tomé, Prov. de Corrientes. VI° Sem.Mil.de Vet., Bs.As. 1979 y *Rev.Mil.de Vet., Bs. As. Vol. XXVI, N° 123, 275:283 (1980);*
- 7) BULMAN, G.M.; SCHMIED, L.M.; ALOISI, G.; DIAZ, C.R.; BRUNEL, C.M.; CICUTA, M.E. y ETCHECHOURY, M.M.: Resultados de la acción garrapaticida del closantel en solución al 5% inyectable ante la garrapata común del vacuno B.microplus (Can.) en bovinos de la zona subtropical argentina, conforme a dos esquemas distintos de tratamiento. III° Congreso Arg. de Cs.Vet., Bs.As (1980);
- 8) STONE, B.F. y HAYDOCK, K.P.: A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick Boophilus microplus (Can.). *Bull of Entom.Res. LIII, 563:578 (1962);*
- 9) SHAW, R.D.: - Culture of an organophosphorous resistant strain of B.microplus (Can.) and an assesment of its resistance spectrum. -- *Bull. of Entom. Res. LVI; 389 (1965);*
- 10) PEREZ ARRIETA, A.; MARTI VIDAL, J. y ARISTARAIN J.C.: Medición de tres métodos de determinación del factor de resistencia del B.microplus (Can.) a los acaricidas fosforados. VI Jorn.Int.Fac.Cs Vs., La Plata, (1978);
- 11) SCHUNTNER, C.A. y THOMPSON, P.G.: Metabolism of (¹⁴C) Amitraz in larvae - in B.microplus. *FAO, AGA: TD (78) inf.1 (1978);*
- 12) SCHUNTNER, C.A. y THOMPSON, P.G.: Mechanisms of Resistance to Bromophos - ethyl in two strains of the cattle tick B.microplus. *FAO,-AGA: TD (78) inf.1 (1978);*

* * * * *

GRAFICO I

N° DE AOVES / TOTAL DE TELEGINAS INCUBADAS

LOTES	COUMAPHOS 100	11 / 50	%	Inhibición		COUMAPHOS 75	22	%	Inhibición	
				50	78%					50
TRATADOS	AMITRAZ 100	16 / 50	% <th colspan="2">Inhibición</th> <td rowspan="2">AMITRAZ 75</td> <td rowspan="2">33</td> <td rowspan="2">% <th colspan="2">Inhibición</th> </td>	Inhibición		AMITRAZ 75	33	% <th colspan="2">Inhibición</th>	Inhibición	
				50	66%				50	66
LOTE TESTIGO	-----	50 / 50	100	--		-----	50	100	---	
				50					50	

Fuente: CEDIVEF 1980/81

DIAS PARA COMENZAR EL AOVE

LOTES TRATADOS	COUMAPHOS 100	\bar{x} 7 (12-4)	COUMAPHOS 75	\bar{x} 5,7 (12-3)
	AMITRAZ 100	6,3 (10-3)		

LOTE TESTIGO	—	3,8
-----------------	---	-----

FUENTE: CEDIVEF 1980/1981

SUPERVIVENCIA DE TELEOGINAS (EN DIAS)

(CON Y SIN AOVE)

LOTES TRATADOS	CON AOVE						SIN AOVE					
	COUNAPHOS			AMITRAZ			COUNAPHOS			AMITRAZ		
	100	75	100	75	100	75	100	75	100	75	100	75
	N°	X̄	N°	X̄	N°	X̄	N°	X̄	N°	X̄	N°	X̄
11 / 50	16,6 (21-14)	22 / 50 (22-9)	14,0 (20-10)	14,7 (22-13)	16 / 50	33 / 50	18,5 (21-3)	12,7 (21-9)	28 / 50	11,2 (24-5)	34 / 50	17 / 50 (34 - 3)

LOTE TESTIGO	CON AOVE					
	COUNAPHOS			AMITRAZ		
	100	75	100	75	100	75
	N°	X̄	N°	X̄	N°	X̄
50 / 50						

LOTE TESTIGO	CON AOVE					
	COUNAPHOS			AMITRAZ		
	100	75	100	75	100	75
	N°	X̄	N°	X̄	N°	X̄
50 / 50						

FUENTE: CEDIVF 1980/1981

GRÁFICO IV

PESO DEL AOVE Y N° DE HUEVOS

(A LOS 18 DIAS)

LOTES	peso aove (mg)	COUMAPHOS	COUMAPHOS	AMITRAZ	AMITRAZ
		100	75	100	75
TRATADOS		\bar{X} : 15,4 (65-05)	\bar{X} : 11,9 (6-0,1)	\bar{X} : 27,5 (63-9)	\bar{X} : 32,6 (92-0,3)
	n° de huevos	\bar{X} : 347	\bar{X} : 43	\bar{X} : 632	\bar{X} : 743

LOTE	peso aove (mg)	\bar{X} : 105 mg
TESTIGO	n° de huevos	\bar{X} : 2386

FUENTE: CEDIVF 1980/1091

% DE OVIPOSICIÓN A LOS 18 DIAS

LOTES	COUMAPHOS 100	COUMAPHOS 75	AMITRAZ 100	AMITRAZ 75
TRATADOS	14,66	1,80	26,19	31,04

LOTE TESTIGO	1 0 0
-----------------	-------

DIAS DESDE COMIENZO ADVE HASTA LA ECLOSION

(% de reducción en días, para iniciar sova con relación a testigos)

LOTES	TG CON ECLOSION / TG CON ADVE	COUMAPHOS 100	COUMAPHOS 75	AMITRAZ 100	AMITRAZ 75
		6 / 11	7 / 22	9 / 16	17 / 33
TRATADOS	DIAS INICIO ADVE HASTA ECLOSION	\bar{x} : 21,8 (25-17)	\bar{x} : 22,4 (24-21)	\bar{x} : 22,2 (24-19)	\bar{x} : 22,3 (24-19)
	% REDUCCION(en días, PARA INICIAR ADVE CON RELACION TESTIGOS)	19,2	17,0	17,7	17,4

LOTE TESTIGOS	50 / 50	\bar{x} : 27 (38 - 18)
------------------	---------	----------------------------

Fuente : CEDIVER 1980 / 81

PORCENTAJES DE ECLOSION

LOYES	COUMAPHOS 100		COUNAPHOS 75		AMITRAZ 100		AMITRAZ 75	
	N°	% inhibición	N°	% inhibición	N°	% inhibición	N°	% inhibición
TRATADOS	6 / 50	70,3	7 / 50	91,2	9 / 50	78,9	17 / 50	57,4
	$\bar{X}: 28,8$		$\bar{X}: 8,5$		$\bar{X}: 20,4$		$\bar{X}: 41,3$	

LOTE	ECLOSION		% INHIBICION	
	N°	AVE	N°	AVE
TESTIGO	50	50	97	3,0

FUENTE : CEDIVEF 1980/1981

VIABILIDAD DE LARVAS A LOS 20 Y 60 DIAS

	20 D I A S			60 D I A S		
	n° tubos c/ larvas vivas	\bar{X}	% inhibición	n° tubos con larvas vivas	\bar{X}	% inhibición
COUNAPIOS 100	2 / 6	30,0 (100-0)	69,6	0 / 6	-	100
COUNAPIOS 75	4 / 7	57,1 (100-100)	42,1	2 / 7	10,0(50-0)	89,8
AMITRAZ 100	7 / 9	77,7 (100-0)	21,2	6 / 9	66,1(100-0)	32,5
AMITRAZ 75	17 / 17	100(100-100)	0	12 / 17	39,4(100-0)	59,7
TESTIGO	50 / 50	98,7(100-93)	1,3	50 / 50	98,0(100-90)	2

FUENTE: CEDIVF 1980/1991