

Figura 3: Comparación entre prevalencia por estación y precipitaciones.

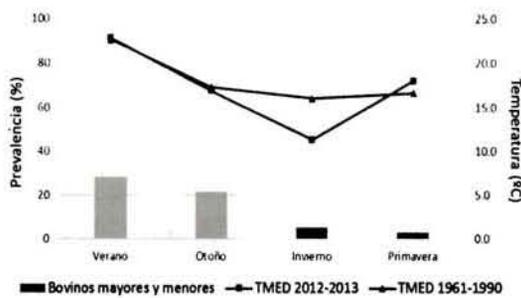


Figura 4: Comparación entre prevalencia por estación y temperatura media.

BIBLIOGRAFÍA

- Dutra, F. (2010). Enfermedades diagnosticadas. Paramphistomiasis aguda en terneros. *Archivo Veterinario del Este* 3:4-6.
- Happich F. A, Boray J. C. (1969). Quantitative diagnosis of chronic fasciolosis. *Australian Veterinary Journal* 45: 329-331.
- Pinedo Vicente R. (2011). Paramphistomosis bovina: parasitosis emergente en el Perú. Sistema de revisiones en investigación veter-

inaria de San Marcos. Lima, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, 12 p.

- Rimbaud E, Diana V. (1991). Descripción de una tabla de mortandad en bovinos asociado a *Paramphistomum*. 19^o Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay, c.c.9-c.c.9.5.
- Sanchis, J., Félix, M. L., Cazapal, C., Castro, Ó., Piñeiro, P., Dell'Oca, L., Venzal, J. M., Arias, M. S., (2013). Prevalencia de *Fasciola hepatica* y *Paramphistomum* spp. en predios ganaderos del norte de Uruguay. En, XVIII Congreso de la Sociedad Española de Parasitología.

DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE LA RESISTENCIA DE LA GARRAPATA *Rhipicephalus microplus* A FIPRONIL EN POBLACIONES DE URUGUAY Y BRASIL. DATOS PRELIMINARES

Eleonor Castro-Janer^{1,2*}, Guilherme M. Klafke³, María Florencia Fontes-Garré², Diego Buscio², André Díaz², Margareth Capurro⁴, Teresinha Tizu Sato Schumaker⁴

¹Departamento de Parasitología. Facultad de Veterinaria. Av. Lasplacas 1620. Montevideo. Uruguay. Autor de correspondencia: elinorcastro59@gmail.com. ²Plataforma de Salud Animal, INIA La Estanzuela, Ruta 50, Km 11, Colonia, Uruguay. ³Laboratorio de Parasitología. Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor-FEPAGRO, Eldorado do Sul, RS. Brasil. ⁴Departamento de Parasitología. Instituto de Ciências Biomédicas, Universidad de San Pablo. San Pablo, Brasil.

RESUMEN

Rhipicephalus microplus, garrapata común del ganado (Canestrini), es una de las plagas más importantes que afecta a los bovinos en las regiones de clima tropical y subtropical. Fipronil tiene el mismo mecanismo de acción que los ciclodienos (lindano, dieldrin). Recientemente se diagnosticó resistencia cruzada entre fipronil y lindano en poblaciones de Uruguay y Brasil. El objetivo del presente trabajo fue identificar y determinar la frecuencia de mutaciones en poblaciones de Uruguay y Brasil resistentes a fipronil (n=11)

confirmadas por bioensayos toxicológicos. Se describieron varios polimorfismos en los canales de cloro- ligados al GABA. Se encontraron cinco substituciones aminoácidas en cepas resistentes, dos de las cuales están asociadas a resistencia a (A286S/ L, V317I). La frecuencia de la mutación A286S/L en 5 poblaciones y en 3 cepas resistentes a fipronil, varió entre 11-100%, pero en 6 poblaciones resistentes no se observó ninguna mutación. La frecuencia de la mutación V317I fue menor y sólo se observó en 3 poblaciones. Se sugiere que otros mecanismos de resistencia están presentes.

SUMMARY

Rhipicephalus microplus, the southern cattle tick, (Canestrini), is one of the most damaging pests that parasites cattle in tropical and subtropical regions of the world. Recently, cross-resistance between fipronil and lindane has been reported on populations from Uruguay and Brazil. The objective of the present study was to determine the frequency of these mutations on fipronil-resistant populations from Uruguay and Brazil (n=11) confirmed with toxicological bioassays. Polymorphisms in the GABA-gated chloride channel gene of fipronil-resistant ticks was described. Five aminoacid substitutions were present in the resistant strains; some of them were associated with resistance (A286S/L, V317I). The frequency of A286S/L mutation on 5 field populations and 3 fipronil-resistant strains varied between 11 and 100% but on 6 fipronil-resistant populations no mutations were registered. The frequency of mutation V317I was lesser and it was observed only in 3 populations. Other mechanisms of resistance could be present.

INTRODUCCIÓN

La garrapata *Rhipicephalus microplus* constituye una de las plagas más importantes de los bovinos, cuyo su control se base principalmente en el uso de garrapaticidas. Cada vez es más necesario el desarrollo de test moleculares para el diagnóstico precoz y menos demorado de la resistencia, para poder establecer con antelación estrategias de control y monitorearlas. Actualmente, los test moleculares disponibles para garrapatas no detectan los diferentes tipos de resistencia ya que se conocen pocas mutaciones asociadas a la misma: tres para piretroides sintéticos en el dominio *para* del canal de sodio, una para amitraz en el receptor de octopamina y una para dieldrin en el *rdl*-GABA (Hope et al., 2010). El mecanismo de acción de los phenilpirazoles (fipronil) es el mismo que el de los cilcodienos (lindano y dieldrin), actuando sobre los canales de cloreto ligados al GABA. Recientemente fue diagnosticada resistencia cruzada entre fipronil y lindano en poblaciones de garrapatas de Uruguay y Brasil (Castro Janer et al., 2015). Basado en estos resultados, se plantearon como objetivos: verificar si la mutación *rdl*-GABA diagnosticada en poblaciones australianas resistentes a

dieldrin estaba presente en poblaciones de la región; - identificar otras en el gen GABA; - y determinar la frecuencia de estas mutaciones.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron poblaciones de referencia susceptibles (Mozo) y resistentes a fipronil (RF-San, Juarez y Jaguar) diagnosticadas por bioensayos *in vitro*, y 5 poblaciones de campo resistentes. Se extrajo DNA genómico de teatóginas (5-18/población) y de larvas mantenidas a -20 °C (n=10), y en algunos casos se obtuvo cDNA. Se realizó una PCR-RFLP de acuerdo a lo descrito por Hope et al. (2010) para detectar la mutación asociada a dieldrin en garrapatas resistentes a fipronil y lindano. El fragmento amplificado es donde se encuentra el sitio de restricción de la enzima Tsp45I (290 pb) que en garrapatas mutantes resistentes a dieldrin tiene una modificación (AC/CT).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

No se encontró la mutación descrita para dieldrin (Hope et al., 2010) en las poblaciones resistentes a fipronil y lindano de Uruguay y Brasil. Sin embargo, se observaron varias alteraciones nucleotídicas silenciosas (n=11) y otras (n=10) asociadas a cambios de aminoácidos. En la Figura 1 se muestran las sustituciones de aminoácidos en el gen GABA (Figura 1), una de ellas posiblemente asociada a diferencias poblacionales (A335T) entre las garrapatas de Australia y América. El análisis comparativo del DNAG y del cDNA aporta datos relevantes para la asociación de la alteración A286L con resistencia a fipronil. Pero también es posible que exista otro patrón de resistencia asociado a una modificación de la estructura conformacional del receptor cuando se presenta la alteración A286S junto con otras 4 mutaciones. La frecuencia de la mutación A286S/L en 5 poblaciones de campo y en 3 cepas resistentes a fipronil varió entre 11 y 100%, no observándose en individuos de otras 6 poblaciones. Esto tal vez se deba a que puede haber una duplicación del gen GABA, o a que el número de individuos estudiados fue bajo. La frecuencia de la mutación V317I fue menor. Es posible que otro mecanismo de resistencia esté presente.

CONCLUSIONES

Ausencia de la mutación en el gen GABA en la posición T290L descrita para *R. microplus* en poblaciones de garrapatas de Australia.
-Presencia de alteraciones del aminoácido

A286S/L, relacionado al mismo residuo de alanina substituído por una serina (A302S) descrito en insectos resistentes a dieldrin.
-Presencia de al menos una alteración de aminoácido posiblemente asociado a resistencia de *R. microplus* a fipronil y lindano.

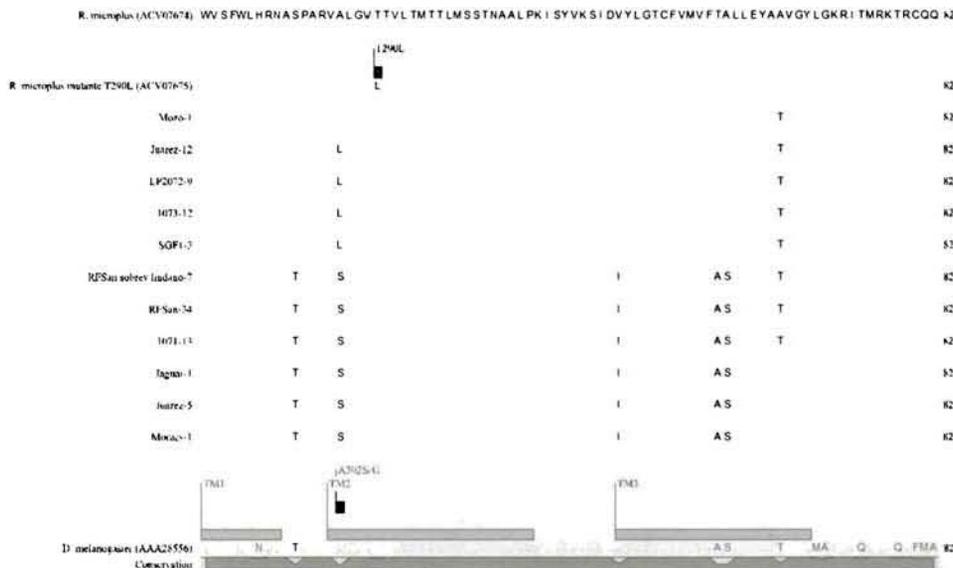


Figura 1. Segmento de secuencia de aminoácidos, traducida a partir de secuencias de DNAg de gene GABA de individuos de poblaciones resistentes (Juárez, Jaguar, RFSan, LP2072, 1073, 1071 y Moraes) y susceptible (Mozo) a fipronil/lindano. En rojo están marcados los residuos mutados asociados a resistencia a dieldrin en *R. microplus* de Australia (T290L) y *Drosophila melanogaster* (A302S). En azul están representados los dominios transmembrana (TM 1, 2 y 3) formadores del canal iónico asociado al receptor de GABA. Los puntos representan los residuos de aminoácidos idénticos a la secuencia de referencia de *R. microplus* (ACV07674).

Financiamiento: ANII, INIA, FAPESP, FAPERGS, CNPq, FDRH-RS

BIBLIOGRAFÍA

- Castro-Janer, E., Klafke, G.M., Capurro, M.L., Schumaker, T.T.S. 2015. Cross-resistance between fipronil and lindane in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Vet. Parasitol. 210:77-83
- Hope, M., Menzies, M., Kemp, D. 2010. Identification of a Dieldrin Resistance-Associated Mutation in *Rhipicephalus(Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). J. Econ. Entomol. 103, 1355-1359.