

Resistência aos pesticidas piretróides em populações de *Rhipicephalus microplus* e aos piretróides e organofosforados em *Haematobia irritans* colhidas em rebanhos de corte no Estado de São Paulo



*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
Embrapa Pecuária Sudeste
Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento*

Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento 38

Resistência aos pesticidas piretróides em populações de *Rhipicephalus microplus* e aos piretróides e organofosforados em *Haematobia irritans* colhidas em rebanhos de corte no Estado de São Paulo

Márcia Cristina de Sena Oliveira
Luciana Gatto Brito
Fábio da Silva Barbieri
Thuane Caroline Gonçalves
Eliane Tanaka
Rodrigo Giglioti
Talita Barban Bilhassi
Raul Costa Mascarenhas Santana
Talita Athiê Néó
Ana Carolina de Souza Chagas
Márcio Dias Rabelo

Embrapa Pecuária Sudeste
São Carlos, SP
2015

Embrapa Pecuária Sudeste

Rod. Washington Luiz, km 234
13560 970, São Carlos, SP
Caixa Postal 339
Fone: (16) 3411- 5600
Home page: www.embrapa.br/pecuaria-sudeste

Comitê de Publicações da Unidade

Presidente: Alexandre Berndt
Secretária-Executiva: Simone Cristina Méo Niciura
Membros: Ane Lisye F.G. Silvestre, Maria Cristina Campanelli Brito,
Milena Ambrosio Telles, Sônia Borges de Alencar

Normalização bibliográfica: Mara Angélica Pedrochi
Editoração eletrônica: Maria Cristina Campanelli Brito
Foto(s) da capa: Gisele Rosso

1ª edição

1ª edição on-line (2015)

Todos os direitos reservados

A reprodução não-autorizada desta publicação, no todo ou em parte, constitui violação dos direitos autorais (Lei no 9.610).

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Embrapa Pecuária Sudeste

Resistência aos pesticidas piretroides em populações *Rhipicephalus microplus* e aos piretroides e organofosforados em *Haematobia irritans* colhidas em rebanhos bovinos corte no estado de São Paulo. — [Recurso eletrônico] / Márcia Cristina de Sena Oliveira [et al.] — São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2015.

Sistema requerido: Adobe Acrobat Reader.

Modo de acesso: <<http://www.cppse.embrapa.br/080servicos/070publicacaogratis/boletim-de-pesquisa-desenvolvimento/Boletim38.pdf/view.>>

34 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 38
ISSN: 1980-6841.

1. Resistência fenotípica e genotípica. 2. Mosca. 3. Carrapato. 4. Ectoparasita. I. Oliveira, Márcia Cristina de Sena. II. Brito, Luciana Gatto. III. Barbieri, Fábio da Silva. IV. Gonçalves, Thuane Caroline. V. Tanaka, Eliane. VI. Gigliotti, Rodrigo. VII. Bilhassi, Talita Barban. VIII. Santana, Raul Costa Mascarenhas. IX. Néo, Talita Athiê. X. Chagas, Ana Carolina de Souza. XI. Rabelo, Márcio Dias. XII. Título. XIII. Série.

CDD: 632.95

Sumário

Resumo	5
Abstract	7
Introdução	9
Material e Métodos	11
Colheita de moscas-dos-chifres	11
Bioensaios com <i>Haematobia irritans</i> para detecção da resistência fenotípica aos inseticidas piretroides e organofosforados	12
Extração de DNA das moscas	13
Análise genotípica da resistência a piretroides em mosca-dos-chifres	13
Análise genotípica da resistência a organofosforados	15
Bioensaios com <i>Rhipicephalus microplus</i> para detecção da resistência fenotípica aos inseticidas piretroides	16
Extração de DNA dos carrapatos	16
Análise genotípica da resistência a piretroides	17
Resultados e discussão	17
Avaliação dos questionários	17
Resistência aos pesticidas piretroides nas populações da mosca-dos-chifres	18
Avaliação genotípica para mutação do tipo KDR	19
Resistência aos pesticidas organofosforados nas populações da mosca-dos-chifres	22
Resistência a pesticidas piretroides nas populações de carrapatos dos bovinos	24
Conclusões	28
Referências	29
Apêndice A	34

Resistência aos pesticidas piretróides em populações de *Rhipicephalus microplus* e aos piretróides e organofosforados em *Haematobia irritans* colhidas em rebanhos de corte no Estado de São Paulo

Márcia Cristina de Sena Oliveira¹

Luciana Gatto Brito²

Fábio da Silva Barbieri²

Thuane Caroline Gonçalves³

Eliane Tanaka³

Rodrigo Gigliotti⁴

Talita Barban Bilhassi⁴

Raul Costa Mascarenhas Santana¹

Talita Athiê Néo⁵

Ana Carolina de Souza Chagas¹

Márcio Dias Rabelo¹

Resumo

A crescente resistência aos pesticidas em populações do carrapato *Rhipicephalus microplus* e da mosca-dos-chifres *Haematobia irritans* tem provocado prejuízos aos pecuaristas do Brasil. Testes fenotípicos, que detectam a suscetibilidade de diferentes populações desses parasitas a vários pesticidas estão disponíveis e deveriam ser usados com maior frequência, como critério na seleção de bases com melhor eficácia. Testes que detectam mutações específicas devido ao uso de pesticidas piretróides e organofosforados foram recentemente desenvolvidos e servem para monitorar a ocorrência de altos níveis de resistência, tendo em vista que a resistência ocorre somente em parasitas submetidos a tratamentos constantes com o mesmo princípio químico. Assim neste experimento foi investigado o uso dos pesticidas nas fazendas de gado de corte no estado de São Paulo e a resistência fenotípica e genotípica dos carrapatos e mosca-dos-chifres colhidos nesses rebanhos. Além disso, os testes genotípicos foram validados para as populações de parasitas e padronizados para serem usados na rotina do Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste. Foram testadas dez populações de moscas e dez de carrapatos,

¹ Embrapa Pecuária Sudeste, São Carlos, SP, marcia.sena-oliveira@embrapa.br

² Embrapa Rondônia, Porto Velho, RO

³ Aluna PIBIC/CNPq, Universidade Central Paulista

⁴ Departamento de Zootecnia da Unesp Jaboticabal, SP

⁵ Universidade Federal de São Carlos, SP

colhidas em propriedades rurais no estado de São Paulo. As moscas foram submetidas aos testes com papéis de filtro impregnados com cipermetrina e diazinon, e os carrapatos, ao Teste do Pacote de Larvas (LPT) impregnado com cipermetrina. Os resultados de mortalidade dos parasitas para cada diluição do inseticida foram anotados em planilhas e analisadas pelo procedimento Probit do programa Statistical Analysis System (SAS), para a obtenção das concentrações letais para 50% (CL50) e para 90% (CL90) e o cálculo do Fator de Resistência (FR) das populações de parasitas. As moscas que sobreviveram às maiores concentrações dos pesticidas foram submetidas à extração do DNA para a pesquisa de mutação específica para resistência a cipermetrina (KDR e sKDR) e diazinon (G262A). As larvas de carrapatos sobreviventes foram submetidas à extração de DNA individualmente e testadas para a mutação do tipo KDR. Das 17 propriedades amostradas para moscas e carrapatos, 11 tinham rebanhos compostos por animais *Bos taurus indicus* (10 propriedades de Nelore e uma de Guzerá), três de *Bos t. taurus* (uma de Caracu e duas de Angus) e três de bovinos cruzados. Os responsáveis pelos rebanhos taurinos afirmaram que o principal problema era o carrapato, no caso da raça Angus, e a mosca-dos-chifres, no caso da Caracu. Para os rebanhos de animais cruzados, os dois ectoparasitas eram igualmente difíceis de combater e, para os zebuínos, a mosca-dos-chifres era o principal problema. Os inseticidas do grupo dos piretroides foram os mais usados nos rebanhos estudados (11/17), seguidos da combinação piretroide + fosforado (4/17) e abamectina (2/17). As populações de *H. irritans* mostraram FR entre 0,75 e 6.434,26 para a cipermetrina e, apesar disso, apenas 3,79% das moscas genotipadas (n = 686) apresentavam o alelo mutante para KDR e nenhuma para sKDR. Para o diazinon, os FR variaram entre 1,00 e 103,00 e das 587 moscas testadas, nenhuma apresentou o alelo mutante para resistência. Os testes com os carrapatos mostraram FR entre 1,00 e 718,52. A mutação KDR só foi detectada em 3,6% (com o genótipo heterozigoto SR) e 0,48% (com o genótipo homozigoto RR) das 631 larvas testadas. Podemos concluir que, no estado de São Paulo, existem populações de *H. irritans* e *R. microplus* resistentes aos grupos pesticidas piretroides e organofosforados, sendo predominante nas populações avaliadas a resistência aos piretroides. Os pecuaristas deverão ser instruídos no sentido de resguardar ao máximo esses princípios químicos, uma vez que poderão se tornar ineficientes em um curto período de tempo no controle da maioria das populações de ectoparasitas presentes nos rebanhos bovinos paulistas.

Palavras chave: carrapato, mosca-do-chifre, pesticidas, piretroides, organofosforados, resistência a pesticida.

Resistance to pyrethroid pesticides in populations of *Rhipicephalus microplus* and pyrethroids and organophosphates in *Haematobia irritans* from beef cattle in São Paulo state, Brazil.

Abstract

The growing resistance to pesticides in populations of the tick *Rhipicephalus microplus* and the horn fly *Haematobia irritans* has been harmful to ranchers in Brazil. Phenotypic tests that detect the susceptibility of different populations of these parasites to various pesticides are available and should be used as a criterion for selecting bases with better efficacy. The tests that detect specific mutations due to the use of pyrethroid and organophosphate pesticides have been recently developed and used to monitor the occurrence of high levels of resistance because resistance occurs only in parasites submitted to continuous treatment with specific chemical groups. So this experiment prospect the use of pesticides in beef cattle farms in São Paulo state and the phenotypic and genotypic resistance to cypermethrin and diazinon in ticks and horn flies from these herds. Besides, genotypic tests have been validated for the population of parasites and standardized for use in the routine of the Laboratory of Animal Health at Embrapa Pecuária Sudeste. We have assayed ten populations of horn flies and ticks collected from farms in the state of São Paulo. The flies were subjected to tests with filter papers impregnated with cypermethrin and diazinon while ticks were tested with the Larval Packet Test (LPT) impregnated with cypermethrin. The parasite mortality rates for each dilution of the insecticide were recorded in spreadsheets and analyzed by Probit procedure of Statistical Analysis System (SAS) to obtain the LC50 and LC90 and calculate the Resistance Factor (RF) of parasites populations. The flies that survived to higher concentrations of pesticides were subjected to DNA extraction to search for specific mutations for resistance to cypermethrin (KDR and sKDR)

and diazinon (G262A). Larvae of ticks surviving to the LPT were subjected to DNA extraction and individually tested for the KDR mutation. Of the 17 farms sampled for flies and ticks, 11 had herds composed of *Bos taurus indicus* (10 with Nellore and one with Guzerá breeds), three of *B. t. taurus* (one with Caracu and two with Angus) and three with crossbred cattle. The herds of taurine cattle stated that the tick was the biggest problem in Angus herd, and horn fly in the Caracu herd. For crossbred herds, the two ectoparasites were equally difficult to control; and for zebu herds, the horn fly was the biggest problem. Insecticides of the pyrethroid group were the most used among herds (11/17), followed by a combination of pyrethroid + organophosphate (4/17) and abamectin (2/17). Populations of *H. irritans* showed RF between 0.75 and 6434.26 for cypermethrin and, despite this, only 3.79% of the genotyped flies (n = 686) had the mutant KDR allele, and none had the sKDR allele. For diazinon, the RF ranged from 1.00 to 103.00, and of the 587 flies tested, none had the mutant allele for resistance. The tests with ticks showed RF between 1.00 and 718.52. The KDR mutation was detected in 3.6% (with the heterozygous genotype SR) and 0.48% (with homozygous genotype RR) of 631 tested larvae. We can conclude that there are populations of *H. irritans* and *R. microplus* resistant to pyrethroid and organophosphate pesticide groups in São Paulo state, being the resistance to pyrethroid more prevalent in the evaluated populations. Ranchers should be instructed to protected these chemical principles that may become ineffective in a short period for most populations of parasites present in the beef herds from São Paulo.

Key words: cattle tick, horn fly, pesticides, pyrethroids, organophosphates, pesticide resistance

Introdução

Haematobia irritans, conhecida vulgarmente como mosca-dos-chifres, e o carrapato dos bovinos, *Rhipicephalus microplus*, são artrópodes hematófagos que parasitam os bovinos e provocam irritabilidade, espoliação, além de transmitirem doenças (GRISI et al., 2014). Os criadores de bovinos no Brasil frequentemente combatem as infestações por esses ectoparasitas usando pesticidas de forma intensiva, o que tem determinado a seleção de populações resistentes aos princípios químicos (FURLONG; MARTINS; PRATA, 2004; BARROS, 2004). Vários mecanismos de resistência aos pesticidas têm sido descritos em artrópodes, sendo que os principais são a redução da penetração de moléculas pesticidas pela cutícula do parasita, o aumento da expressão de enzimas detoxificantes e a insensibilização de receptores no sistema nervoso (SCOTT, 1995; FOIL et al., 1997). Mutações específicas associadas à resistência aos pesticidas foram identificadas e podem ser usadas como marcadores moleculares em estudos populacionais, ajudando no estabelecimento de novas alternativas para o controle das pragas pecuárias (SCOTT, 1995).

Cipermetrina, deltametrina e, mais recentemente, a associação de cipermetrina e organofosforados, como clorpirifós e diazinon, são os pesticidas mais usados pelos pecuaristas brasileiros (MENDES et al., 2013) para o controle das infestações pelo carrapato dos bovinos. Os piretróides representam 25% de todos os inseticidas usados mundialmente (GEORGHIOU, 1990), e o seu uso em larga escala foi responsável por disseminar a resistência a essa base química em diferentes populações de artrópodes, como mosca doméstica, mosca-das-frutas, baratas, carrapatos e mosca-dos-chifres, entre outros (DONG; SCOTT, 1994; WILLIANSOM et al., 1996; JAMROZ et al., 1998; HE et al., 1999; BARROS et al., 2013; MENDES et al., 2013). Os piretróides são compostos sintéticos derivados de neurotoxinas naturais de plantas, que se ligam seletivamente às proteínas dos canais de sódio, localizadas nas membranas dos neurônios, impedindo seu fechamento. A ação inseticida primária dos piretróides é resultado

de alterações na cinética da inativação do canal de sódio, levando a descargas neurais repetitivas (SODERLUND; BLOOMQUIST, 1989). A abertura permanente desses canais provoca o bloqueio na transmissão dos impulsos nervosos e a rápida ataxia nos artrópodes, efeito conhecido como *knockdown* (JAMROZ, et al., 1998). Assim, a insensibilidade do sistema nervoso de artrópodes aos piretroides ficou conhecida como resistência tipo *Knockdown resistance* (KDR) que confere resistência também ao *Diclorodifeniltricloroetano* (DDT) e a seus análogos (SCOTT, 1995). Guerrero et al. (1997) encontraram duas mutações no canal do sódio em populações da mosca-dos-chifres que apresentaram altos níveis de resistência à cipermetrina e ao cialotrin: a substituição da leucina por fenilalanina, que foi associada à resistência do tipo KDR; e a troca de metionina por treonina, que foi associada à resistência denominada super-KDR (s-KDR), porque foi identificada apenas em moscas com Fator de Resistência (FR) muito alto. Posteriormente Jamroz et al. (1998) identificaram essas mutações em populações de mosca-dos-chifres colhidas no Texas, que eram submetidas a tratamentos intensivos com piretroides. No Brasil, Sabatini et al. (2009) e Barros et al. (2013) encontraram mutações do tipo KDR em populações de moscas oriundas de várias partes do país, embora em baixa proporção.

Trabalhando com o carrapato *R. microplus*, He et al. (1999) identificaram uma mutação de ponto no segmento S6 do domínio III do gene do canal de sódio, em cepas muito resistentes aos piretroides e ao DDT. Um teste para identificação da mutação que confere resistência aos piretroides em populações de *R. microplus* foi desenvolvida por GUERRERO; DAVEY; MILLER (2001). Essa mutação leva à substituição do aminoácido fenilalanina por isoleucina no segmento S6 da transmembrana do domínio III do canal de sódio, em indivíduos com o genótipo resistente.

Com relação aos inseticidas organofosforados, as esterases parecem ser as principais enzimas que atuam no metabolismo e na eliminação desses pesticidas, em especial as acetilcolinesterases (AchEs),

fosfotriesterases e carboxilesterases (SOGORB; PLA; VILANOVA, 1996; SOGORB; VILANOVA, 2002). A acetilcolina é um importante neurotransmissor que se liga temporariamente à proteína associada ao canal de sódio na membrana das células nervosas, promovendo a abertura desse canal e a passagem do impulso nervoso de uma célula à outra. Após a propagação do estímulo nervoso, a acetilcolina deve ser degradada pelas AchEs, evitando-se que as células permaneçam com seus canais de sódio permanentemente abertos. Os inseticidas organofosforados atuam ligando-se fortemente a essas enzimas, impedindo a sua ação (FOURNIER; MUTERO, 1994). Pontos de mutação no gene que codifica a AchE foram associados à resistência aos organofosforados em diferentes insetos (FOURNIER et al., 1993; MUTERO et al., 1994; VONTAS et al., 2002; TEMEYER et al., 2008). Foil; Guerrero; Bendele (2010) descreveram uma técnica de PCR multiplex para a detecção simultânea de resistência do tipo KDR, sKDR e AchE em moscas-dos-chifres.

Tendo em vista o exposto acima, neste experimento os objetivos foram: estudar a resistência fenotípica aos pesticidas piretróides e organofosforados em populações de *H. irritans* e aos pesticidas piretróides em *R. microplus* colhidas em bovinos de corte criados no estado de São Paulo, padronizar e validar os protocolos para detecção molecular das mutações KDR, s-KDR e AchE em moscas-dos-chifres e KDR em carrapatos dos bovinos.

Material e Métodos

Colheita de moscas-dos-chifres

As moscas foram colhidas em bovinos naturalmente infestados criados no estado de São Paulo. Entre os meses de setembro de 2012 e maio de 2014 foram visitadas vinte e duas propriedades diferentes. Para o experimento foram usadas moscas colhidas em dez rebanhos que apresentaram infestações com quantidade de moscas suficientes para execução dos bioensaios: duas do município de São Carlos e

Sertãozinho e uma de cada um dos seguintes municípios: São Manuel, Nova Odessa, Botucatu, Lavínia, Ribeirão Bonito e Colina. Em todas as fazendas visitadas, foi aplicado um questionário (Apêndice A).

Bioensaios com *Haematobia irritans* para detecção da resistência fenotípica aos inseticidas piretroides e organofosforados

A resistência das populações de *H. irritans* aos piretroides e organofosforados foi avaliada por meio de testes com papéis de filtro impregnados com cipermetrina e diazinon em grau técnico (Cypermethrin, analytical standart, Pestanal®, CAS number 67375-30-8; e Diazinon, analytical standard, Pestanal®, CAS number 333-41-5), que foram colocados em placa de Petri, de acordo com método descrito por Sheppard; Hinkle (1987). Foram usadas as seguintes concentrações de cipermetrina: 1,6; 6,4; 25,6; 102,4 e 409,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ e diazinon: 0,0001; 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6; 2,4 e 3,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, sendo todos os ensaios preparados em triplicata. Como controle foi utilizado papel filtro impregnado com acetona, que foi o solvente utilizado para diluir os pesticidas. Todos os bioensaios foram realizados imediatamente após a captura das moscas sobre os bovinos, com auxílio de rede entomológica, colocando-se cerca de 30 moscas por placa.

A mortalidade das moscas nas diferentes concentrações de pesticidas foi verificada após 2 horas de contato dos dípteros com os papéis impregnados. Para isso, as moscas vivas e mortas foram contadas, individualizadas de acordo com a concentração do inseticida, colocadas em microtubos estéreis e armazenados em nitrogênio líquido até a chegada ao laboratório, onde foram congeladas a -80°C até o momento do processamento para obtenção do DNA. Os resultados de mortalidade foram anotados em planilhas e analisados usando o procedimento Probit do programa SAS para a obtenção das CL50 e CL90, de cada população. Os mesmos papéis impregnados com os inseticidas e acetona, foram usados para a execução de testes com a cepa suscetível de referência (USDA- Knipling-Bushland US Livestock

Insects Research Laboratory). Os FR foram calculados dividindo-se a CL50 obtida de cada população pela CL50 da amostra suscetível de referência.

Extração de DNA das moscas

A extração do DNA das moscas foi feita de acordo com a metodologia descrita por Li et al. (2003), da seguinte maneira: cada mosca foi submetida à sexagem usando uma lupa. As fêmeas tiveram a cabeça cortada e o corpo descartado, para evitar contaminações com DNA oriundo de ovos, enquanto os machos foram mantidos inteiros. As moscas foram colocadas em microtubos de 1,5 ml pré-refrigerados e foram esmagadas como pistilo plástico descartável, previamente refrigerado em nitrogênio líquido por aproximadamente 15 segundos. Foram adicionados 25 μ l do tampão de isolamento de DNA (100 mM de Tris pH=8,3 e 500 mM de KCl). As moscas foram maceradas novamente com o pistilo gelado por mais 15 segundos, e os tubos foram rapidamente centrifugados. Na etapa seguinte, os tubos foram incubados em banho-maria à temperatura de ebulição, por 5 minutos, e resfriados rapidamente em nitrogênio líquido por 30 segundos. As amostras foram mantidas em freezer a -80°C , até o momento da realização das provas moleculares.

Análise genotípica da resistência a piretróides em mosca-dos-chifres

As reações de PCR foram padronizadas seguindo os procedimentos descritos por Guerrero et al. (1998), com pequenas modificações. Foram usados os *primers* FG 130 + FG 138 para a amplificação dos alelos de suscetibilidade e FG 134 + FG 138 para os alelos de resistência para KDR. A amplificação da região flanqueada por esses *primers* corresponde a um fragmento nucleotídico com 285 pb, para ambos os alelos, resistente e sensível. Para s-KDR foram utilizados os *primers* FG 154 para o alelo suscetível e FG 155 para o alelo resistente, que produzem fragmentos com 74 pb. Como controle de ambas as reações, foram usados os *primers* FG 234 e FG 243 que amplificam uma região do gene que codifica a enzima gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) em *H. irritans* e produz fragmentos com 154

pb. Como a mutação s-KDR é rara na natureza, sendo detectada apenas em populações com alta pressão de seleção pelo uso sistemático de piretróides (FOIL; GUERRERO; BENDELE, 2010), s-KDR só foi pesquisada em moscas genotipadas como KDR resistentes. Os *primers* usados com suas respectivas sequências nucleotídicas e tamanho dos fragmentos amplificados são mostrados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequência dos *primers* usados na detecção das mutações KDR e s-KDR e do controle (GAPDH) em *Haematobia irritans*.

Alelos	<i>Primers</i>	Sequência	Fragmento
KDR (S)	FG 130	5' - TAC TGT TGT CAT CCG CAA TC -3'	285 pb
	FG 138	5' - CAA TAT TAC GTT TCA CCC AG -3'	
KDR (R)	FG 134	5' - ACC CAT TGT CCG GCC CA -3'	285 pb
	FG 138	5' - CTT CGT GTA TTC AAA TTG GCA-3'	
S-KDR (S)	FG 154	5' -TAC TGT TGT CAT CCG CAA TT -3'	74 pb
	FG 235	5' - CAA TAT TAC GTT TCA CCC AG -3'	
S-KDR (R)	FG 155	5' - ACC CAT TGT CCG GCC CG -3'	74 pb
	FG 235	5' - CTT CGT GTA TTC AAA TTG GCA-3'	
GAPDH	FG 234	5' -CTT CTT CAT CCG TGT AGC - 3'	154 p
	FG 243	5' -GGC ATG GCT TTC CGT GTC C - 3	

As reações em cadeia da polimerase (PCR) foram preparadas em volume de 20 μ l contendo 10 μ l 2X Taq DNA Polimerase Master Mix Red (Ampliqon, Denmark) (150 mM de Tris-HCl pH 8.5 e 150 mM de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$; 40 mM; 4 mM de MgCl_2 ; 0,4 mM de dNTPs; 0,05 U/ μ l de Taq polimerase e corante vermelho inerte), 0,2 μ l (10 pmol) de cada primer, 1,0 μ l do DNA (diluído a 1:10 em água ultrapura) e 8,2 μ l de água ultrapura (Invitrogen, EUA). As reações de PCR para o alelo resistente (R) e sensível (S) foram feitas para cada mosca, sendo que nas duas reações foram incluídos os *primers* para o GAPDH. Para a amplificação, todas as reações foram incubadas em termociclador Bio-Rad, programado com as seguintes combinações de termociclagem:

96°C por 2 minutos, 35 ciclos a 94°C, 62°C, 72°C, todos por 1 minuto. A extensão final foi a 72°C por 7 minutos, e os produtos de amplificação foram visualizados em géis de agarose a 2% corados com brometo de etídio.

Fragmentos do gene do canal do sódio clonados em plasmídeo p Bluescriptsk+ (amostras RJ18 e SR 352) e oriundos de amostra resistente de mosca colhida na Geórgia, gentilmente cedidas pelo Dr. Felix Guerrero do ARS/USDA, foram usados como controle positivo da reação para presença de mutações do tipo KDR e sKDR.

Análise genotípica da resistência a organofosforados

As reações de PCR para mutação G262A localizada no gene que codifica a enzima AchE foram preparadas do mesmo modo que as descritas para a pesquisa das mutações tipo KDR, usando os primers FG 417 e FG 419, que amplificam somente genótipos suscetíveis, e FG 418 e FG 419, para os genótipos resistentes (Tabela 2) de acordo com Foil; Guerrero; Bendele (2010). A amplificação dos alelos AchE produz um fragmento com cerca de 115 pb.

Tabela 2. Sequência dos primers usados na detecção da mutação G262A no gene que codifica a enzima acetilcolinesterase (AchE) e do gene controle que codifica a proteína gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (GAPDH) em *Haematobia irritans*.

Alelos	Primers	Sequência
AchE (S)	FG 417	5' -GGC ATG ATG CAA TCG GG- 3'
	FG 419	5' -GCA GTA GTG ATG CAT TAC AA- 3'
AchE (R)	FG 418	5' -GGC ATG ATG CAA TCG GC- 3'
	FG 419	5' -GCA GTA GTG ATG CAT TAC AA- 3'
GAPDH	FG 234	5' -CTT CTT CAT CGG TGT AGC - 3'
	FG 243	5' -GGC ATG GCT TTC CGT GTC C - 3'

As condições de amplificação para as duas reações foram: desnaturação inicial a 95°C por 2 minutos seguida de 10 ciclos de desnaturação a 94°C, anelamento a 61°C e extensão a 72°C por 1 minuto, mais 26 ciclos com desnaturação a 92°C, anelamento a 61°C e extensão a 72°C por 1 minuto. A extensão final foi feita a 72°C por 7 minutos. Os produtos de PCR foram analisados nos mesmos tipos de géis usados para KDR e sKDR.

Bioensaios com *Rhipicephalus microplus* para detecção da resistência fenotípica aos inseticidas piretroides

As 10 populações de carrapatos estudadas neste experimento foram colhidas nos seguintes municípios: duas em José Bonifácio e uma em cada município: São Carlos, Santa Rita do Passa Quatro, Avaré, Arandu, Sertãozinho, Pirajuí, Auriflama e Botucatu. Amostras de fêmeas ingurgitadas foram colhidas em bovinos naturalmente infestados por *R. microplus* e enviadas ao Laboratório de Sanidade Animal da Embrapa Pecuária Sudeste, para a realização dos LPT segundo metodologia descrita por Stone; Haydock (1962) modificada por Miller et al. (2003). As larvas de carrapato foram expostas às seguintes concentrações de cipermetrina em grau técnico (Cypermethrin, analytical standart, Pestanal®, CAS number 67375-30-8): 1,6; 6,4; 25,6; 102,4 e 409,6 µg/cm². Os dados de mortalidade/sobrevivência obtidos nos ensaios com as larvas foram usados para determinação das CL50 e FR para cada população estudada também utilizando-se o procedimento Probit do programa SAS. Para o cálculo do fator de resistência das populações, a CL50 de cada população foi dividida pela CL50 da população com o menor valor observado. As larvas vivas e mortas foram contadas, separadas individualmente de acordo com a concentração do pesticida, e congeladas a -80°C até o momento do processamento para obtenção do DNA.

Extração de DNA dos carrapatos

O DNA das larvas foi obtido a partir de larvas individualizadas, seguindo o mesmo protocolo descrito para as moscas com pequenas adaptações descritas por Guerrero; Davey; Muller (2001). O DNA total extraído foi mantido em freezer a -80°C.

Análise genotípica da resistência a piretroides

Para a realização das provas moleculares, as amostras contendo o DNA foram centrifugadas a 4°C e 20.800 x g por 4 minutos. O DNA proveniente das larvas resistentes aos piretroides avaliadas através dos bioensaios foram submetidas à técnica de PCR de acordo com a metodologia proposta por Guerrero; Davey; Muller (2001), na qual o alvo é o gene do canal de sódio. Foram usados os *primers* FG 227, FG 221 e FG 222 (Tabela 3), para a genotipagem das amostras como homozigotas suscetíveis (SS), heterozigotas (RS) e homozigotas resistentes (RR), e os volumes das reações foram os mesmos usados para as moscas. A amplificação da região flanqueada por esses *primers* corresponde a um fragmento nucleotídico de 68 pb.

Tabela 3. Sequencia de *primers* usados na genotipagem de *Rhipicephalus microplus* em relação à presença de alelos para resistência e suscetibilidade aos pesticidas piretroides.

<i>Primers</i>	Alelos	Sequência
FG 221 + FG 227	KDR (S)	5' - TTA TCT TCG GCT CCT TCT -3'
		5' - TTG TTC ATT GAA ATT GTC GA -3
FG 221 + FG 227	KDR (R)	5' - TTA TCT TCG GCT CCT TCT -3'
		5' - TTG TTC ATT GAA ATT GTC GA -3'

Resultados e discussão

Avaliação dos questionários:

Das 17 propriedades amostradas para moscas e carrapatos, 11 tinham rebanhos compostos por animais *Bos taurus indicus* (10 Nelore e 1 Guzerá), três de *Bos t. taurus* (um Caracu e dois Angus) e três de bovinos cruzados. Os responsáveis pelos rebanhos taurinos afirmaram que o principal problema era o carrapato, no caso do Angus, e a mosca-

dos-chifres, no caso do Caracu. Para os rebanhos de animais cruzados, os dois ectoparasitas eram igualmente difíceis de combater, e para os zebuínos, a mosca-dos-chifres era o principal problema.

De acordo com Honer; Bianchini; Gomes (1990), *H. irritans* exhibe preferência pelo gado europeu, por animais mestiços e por aqueles de pelagem mais escura. Oliveira et al. (2013) trabalharam com rebanhos do estado de São Paulo e verificaram diferenças significativas nas infestações por moscas-dos-chifres em animais Nelore (pelos claros) e cruzados 2/3 *Bos t. taurus* e 1/3 *Bos t. indicus* (pelos escuros), sendo esses últimos os mais infestados. Esses autores verificaram também que os machos apresentaram sempre uma quantidade maior de moscas. Assim, acredita-se que vários fatores, incluindo clima, tipo de manejo, sexo, cor e raça, influenciam os níveis de infestações por *H. irritans* nos rebanhos.

Com relação à suscetibilidade aos carrapatos, rebanhos taurinos apresentam sempre maiores infestações (SILVA et al., 2007; 2010; OLIVEIRA et al., 2013) salvo algumas exceções como o caso do rebanho Caracu, avaliado neste experimento. Os pesticidas do grupo piretroide foram os mais usados nos rebanhos estudados (11/17), seguidos da combinação piretroide + fosforado (4/17) e abamectina (2/17). Além desses pesticidas algumas propriedades usavam também fipronil, diamidinas, ivermectina e fosforados. Estes achados estão de acordo com as observações de Mendes et al. (2013).

Resistência aos pesticidas piretroides nas populações da mosca-dos-chifres

As CL50 e o FR obtidos nos testes com cipermetrina nas dez populações de moscas estão apresentados na Tabela 4. A CL50 da mosca controle sensível foi de 0,338. Entre as amostras de moscas usadas nos bioensaios, a maior CL50 e, conseqüentemente, o maior FR foi encontrado nos parasitas colhidos no rebanho de Sertãozinho 1, e o menor no rebanho de Botucatu.

Tabela 4. Concentração letal 50% (CL50) e fatores de resistência (FR) calculados a partir dos bioensaios com *Haematobia irritans* em testes de contato com papéis impregnados com cipermetrina em grau técnico.

Município	CL50	FR
São Carlos 1	14,03	41,50
São Carlos 2	9,04	26,75
Sertãozinho 1	2.174,78	6.434,26
Sertãozinho 2	35,36	104,62
São Manuel	3,29	9,73
Nova Odessa	23,59	69,79
Botucatu	0,253	0,75
Lavínia	1,26	3,73
Colina	0,275	0,81
Ribeirão Bonito	612,99	1.813,58

Avaliação genotípica para mutação do tipo KDR

Foram selecionadas as moscas que sobreviveram às maiores concentrações de cipermetrina nos bioensaios (409,6; 102,4 e 25,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) para a realização da avaliação genotípica das populações de *H. irritans*, uma vez que se espera que indivíduos fenotipicamente resistentes apresentem a mutação tipo KDR (Tabela 5). Somente em dois rebanhos de São Carlos e nos rebanhos de Sertãozinho e Ribeirão Bonito foram encontradas moscas sobreviventes às maiores concentrações testadas nos bioensaios. Os resultados representativos da PCR para os indivíduos sobreviventes testados para essa mutação estão apresentados na Figura 1. As moscas podem ser classificadas como homozigotas sensíveis (SS), quando amplificam apenas o alelo S, heterozigotas (SR) quando amplificam ambos os alelos e homozigotas resistentes (RR) quando amplificam apenas o alelo R.

Foto: Laboratório de Sanidade Animal/CPPE.

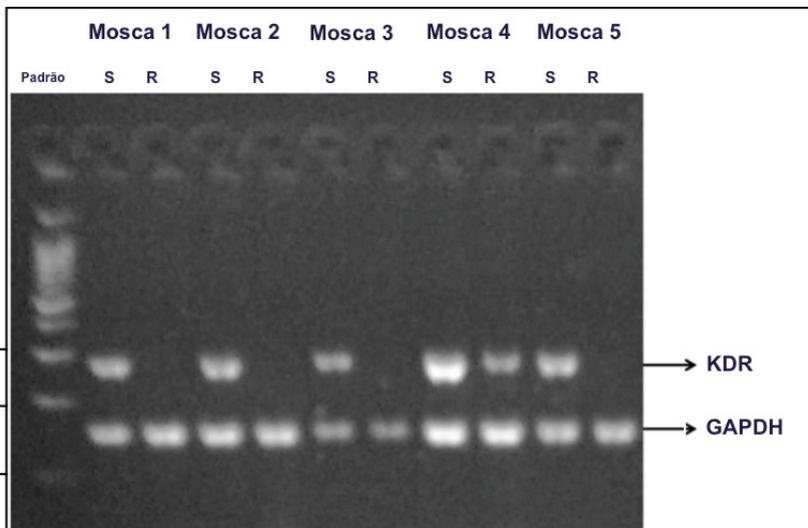


Figura 1. Gel de agarose a 2% corado com brometo de etídio contendo os produtos de amplificação dos alelos KDR em *Haematobia irritans* (285 pb), sendo: padrão de 100 pares de bases; S = alelo sensível, R = alelo resistente, GAPDH = gene controle da reação (154 pb). Moscas 1, 2, 3 e 5 são homocigotas sensíveis (SS) e a mosca 4 é heterocigota (SR).

Foram genotipadas 686 moscas, sendo que 96,20% apresentaram-se homocigotas sensíveis (SS) e 3,79% heterocigotas (SR) para a mutação KDR (Tabela 5). As moscas colhidas no rebanho Caracu de Sertãozinho apresentaram as maiores frequências de indivíduos heterocigotos para esta mutação. Não foram encontradas moscas com o genótipo homocigoto resistente (RR).

Tabela 5. Avaliação genotípica para a mutação KDR nas diferentes populações da mosca-dos-chifres colhidas nos diferentes Municípios de São Paulo, sendo os genótipos: SS = homocigoto sensível, SR = heterocigoto.

Local	Frequência do genótipo (%) e número de moscas (n)	
	SS	SR
São Carlos 1	99,2 (246)	0,80 (2)
São Carlos 2	100 (27)	-
Sertãozinho 1	81,7 (94)	18,3 (21)
Setãozinho 2	100 (25)	-
Lavínia	100 (31)	-
São Manuel	88,5 (23)	11,5 (3)
Colina	100 (40)	-
Ribeirão Bonito	100 (71)	-
Botucatu	100 (47)	-
Nova Odessa	100 (56)	-
Total	96,20 (660)	3,79 (26)

Pôde-se observar baixa frequência de alelos de resistência do tipo KDR nas populações de moscas-dos-chifres estudadas. Estes achados corroboram as observações de Sabatini et al. (2009) e Barros et al. (2013), mas, no entanto, diferem dos resultados encontrados por Brito et al. (2013) que trabalharam com populações de moscas colhidas em rebanhos leiteiros do estado de Rondônia. Este estado tem se caracterizado pela rápida expansão da pecuária e, associado a isso, apresenta características climáticas muito favoráveis ao desenvolvimento dos carrapatos. O uso intensivo de carrapaticidas em rebanhos mestiços *Bos t. taurus* x *Bos t. indicus* naquela região pode ser considerada uma das causas determinantes para o surgimento rápido das mutações do tipo KDR e sKDR, sendo esta última ligada a altos níveis de resistência aos pesticidas piretróides, conforme mecanismo descrito por Williamson et al. (1996).

Resistência aos pesticidas organofosforados nas populações da mosca-dos-chifres

As CL50 e o FR para diazinon obtidos a partir dos bioensaios, nas dez populações de moscas, estão apresentados na Tabela 6. A CL50 obtida com moscas da colônia de referência sensível, estabelecida no Laboratório de Insetos do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), foi 2,509. Este valor foi mais alto que o observado para a maioria das populações testadas em nosso experimento, indicando que a cepa americana, após décadas de criação sem contato com inseticidas, possui ainda forte memória para resistência ao diazinon. Assim, para o cálculo dos FR, usamos como controle sensível, a população com a menor CL50 entre as testadas, que foi aquela oriunda de São Manuel (0,03). O maior FR para o diazinon foi encontrado para os parasitas colhidos no rebanho de Ribeirão Bonito.

A análise dos FR das populações da mosca-dos-chifres avaliadas no estado de São Paulo indica que essas populações não foram submetidas a tratamentos intensivos com organofosforados. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por Brito et al. (2014) no estado de Rondônia. Populações de *H. irritans* suscetíveis ao diazinon foram reportadas em outros estados brasileiros nas regiões Sul (RS), Sudeste (ES, MG, RJ), Centro-Oeste (GO, DF, MS, MT), Nordeste (AL, BA, MA, PI, SE) e Norte (RR, TO), e a CL50 das populações variou entre 0,1 e 1,2 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (BARROS et al., 2012). No Chile, Oyarzún; Li; Figueroa (2011) avaliaram oito rebanhos bovinos e também identificaram populações suscetíveis aos pesticidas organofosforados, sendo que em cinco populações todas as moscas morreram nos bioensaios.

A alta susceptibilidade de *H. irritans* aos inseticidas organofosforados parece estar associada ao baixo uso de formulações com esse princípio no controle das populações dos ectoparasitas que infestam os bovinos, principalmente para o controle da mosca-dos-chifres em rebanhos de corte. Vale ressaltar que o uso contínuo de um princípio ativo, como o organofosforado, pode levar rapidamente ao surgimento de resistência à base química, caso não sejam estabelecidos critérios e

práticas de manejo adequadas. Entre essas práticas pode-se citar o uso de bioensaios para escolha do melhor princípio químico a ser usado no controle parasitário dos rebanhos e o descanso das pastagens com altas infestações. Barros et al. (2001) realizaram estudo na Louisiana, EUA, e verificaram o desenvolvimento da resistência ao diazinon em populações de mosca-dos-chifres após quatro anos de uso contínuo de organofosforados.

Tabela 6. Resultados da concentração letal 50% (CL50) e dos fatores de resistência (FR) calculados a partir dos bioensaios com *Haematobia irritans* em testes de contato com papéis impregnados com diazinon em grau técnico.

Município	CL50	FR
São Carlos 1	0,40	13,3
São Carlos 2	0,22	7,33
Sertãozinho 1	0,08	2,66
Sertãozinho 2	0,96	32,00
São Manuel	0,03	1,00
Nova Odessa	0,04	1,33
Botucatu	0,22	7,33
Lavínia	0,27	9,00
Colina	0,27	9,00
Ribeirão Bonito	3,09	103,00

Os resultados obtidos mostraram que o FR encontrado para as populações de mosca-dos-chifres estudadas variou entre 1,00 e 103,00. Estes resultados indicam que esse pesticida pode ser usado nas estratégias de controle das populações da mosca-dos-chifres. Contudo, como já comentado anteriormente, o controle de ectoparasitas nos rebanhos bovinos ainda ocorre de forma indiscriminada e sem critérios técnicos adequados. Como forma de prolongar a eficácia dos inseticidas organofosforados é recomendado que o uso dos brincos impregnados com esse princípio ativo seja utilizado somente em condições de altas infestações (acima de 300 moscas/bovino), sendo também recomendada a rotação anual da base inseticida utilizada para o controle das populações da mosca.

Quinhentas e oitenta e sete (587) moscas sobreviventes ao bioensaio foram testadas para a mutação G262A, sendo que todos os indivíduos apresentaram genótipo homozigoto sensível (SS). Resultados representativos das reações de PCR para os indivíduos sobreviventes testados para o gene que codifica a enzima AchE estão apresentados na Figura 2.

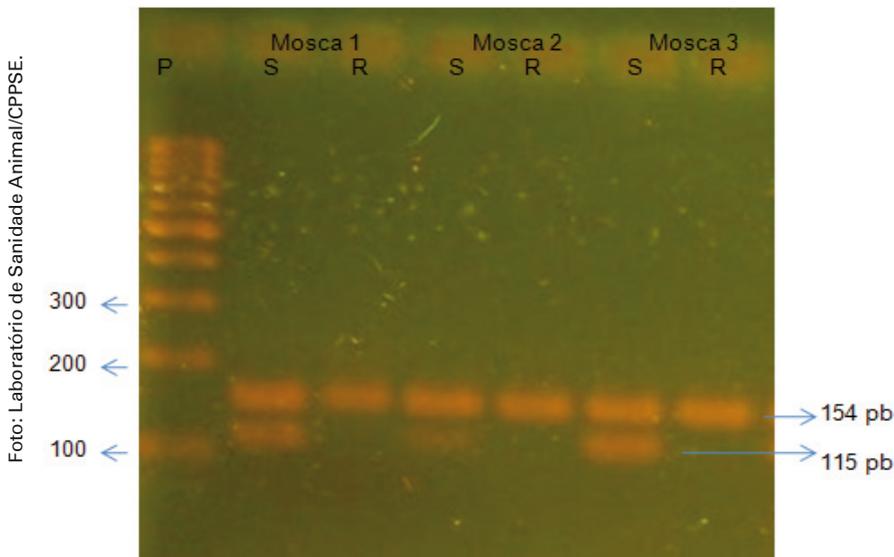


Figura 2. Eletroforese dos produtos de amplificação do gene que codifica a enzima acetilcolinesterase (AChE) em *Haematobia irritans* (115 pb). P= padrão de pares de bases; S= sensível, R= resistente, GAPDH= controle da reação (154 pb). Moscas 1 a 6 são homozigotas sensíveis a pesticidas fosforados (SS).

Resistência a pesticidas piretroides nas populações de carrapatos dos bovinos

As taxas de mortalidade das larvas encontradas nos testes LPT foram usadas para determinação das CL50. Os FR foram calculados dividindo-se a CL50 de cada população pela CL50 da população de maior sensibilidade, já que não houve a possibilidade de testar com uma população sensível de referência. Os resultados das CL50 e FR, para as larvas estudadas nos rebanhos dos diferentes municípios estão

apresentados na Tabela 7. A maior CL50 e, conseqüentemente, o maior FR foi encontrado no rebanho do município de São Carlos (FR 718,52) enquanto que o menor valor foi verificado no rebanho de Botucatu (FR 1,00), sendo essa a população utilizada como população sensível para o cálculo do FR.

Tabela 7. Resultados da concentração letais 50% (CL50) e do Fator de resistência (FR) nos testes de pacote com larvas de *Rhipicephalus microplus* (LPT) em papéis impregnados com cipermetrina.

Município	CL50	FR
Botucatu	0,46	1,00
Pirajuí	0,66	1,43
Arandu 1	1,33	2,89
Arandu 2	2,03	4,41
José Bonifácio 1	1,36	2,96
José Bonifácio 2	14,93	32,46
Avaré	2,39	5,20
Santa Rita do Passa Quatro	6,74	14,65
Auriflama	7,07	15,37
São Carlos	330,52	718,52

Segundo Bianchi; Barré; Messad (2003), populações de *R. microplus* com fatores de resistência menores que três, entre três e cinco, entre cinco e cinquenta e maiores do que 50 são suscetíveis, tolerantes, resistentes e super-resistentes aos pesticidas piretróides, respectivamente. A partir da classificação proposta por Bianchi; Barré; Messad (2003), Mendes; Lima; Prado (2007) propuseram a seguinte classificação para resistência a deltametrina ou cipermetrina: amostras com fatores de resistência menores ou iguais a 2,4 são suscetíveis, entre 2,5 e 5,4 são resistentes nível I, entre 5,5 e 50 são resistentes nível II e maiores que 50 são resistentes nível III. Com base nesses últimos critérios podem ser classificadas como sensíveis apenas as populações colhidas em Botucatu e Pirajuí. As populações de moscas oriundas de Avaré, José Bonifácio 1 e Arandu 1 e 2 mostraram os FR entre 2,5 e 5,4, níveis considerados como resistentes no nível I. José

Bonifácio 2, Santa Rita do Passa Quatro e Auriflama apresentaram moscas com FR entre 5,5 e 50, que podem ser consideradas resistentes no nível II, e a população de carrapatos de São Carlos, cujo FR = 718,52, tem resistência em nível III.

As genotipagens feitas nas larvas sobreviventes aos testes fenotípicos mostraram o alelo sensível e resistente com o tamanho esperado de pares de bases (Figura 3).

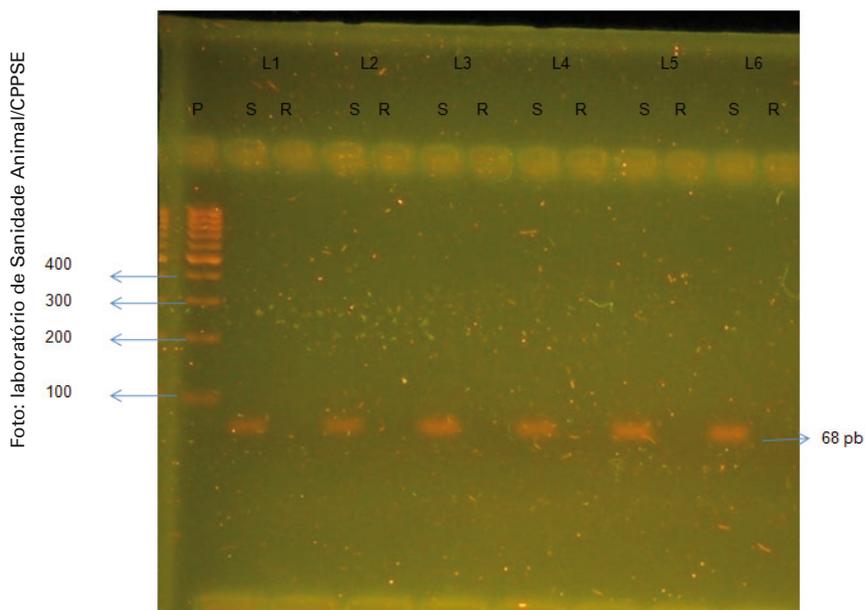


Figura 3. Eletroforese dos produtos de amplificação do gene que codifica a o canal do sódio (KDR) em *Rhipicephalus microplus* (68 pb). P = padrão de pares de bases; S = sensível, R = resistente. Todas as larvas são homozigotas sensíveis para o alelo KDR.

Foram genotipadas, no total, 631 larvas de carrapatos sobreviventes nas maiores diluições do pesticida (409,6; 102,4 e 25,6 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) e encontrou-se frequência de 95,9% (n = 605) de larvas com alelos homozigotos sensíveis (SS), 3,6% (n = 23) de larvas com alelos heterozigotos (SR) e 0,48% (n = 3) de larvas com alelos homozigotos resistentes (RR).

Tabela 5. Frequência (%) e número total de larvas de *R. microplus* de acordo com o local e o genótipo das larvas testadas para o alelo KDR: SS (homozigotas sensíveis), SR (heterozigotas), RR (homozigotas resistentes).

Local	Frequência total dos genótipos (%) e número de larvas (n)		
	¹ SS	² SR	³ RR
Botucatu- SP	8,24 (52)	1,27(8)	0
Pirajuí-SP	4,12 (26)	0,32(2)	0
Arandu 1-SP	6,97 (44)	0	0,16 (1)
José Bonifácio – SP	19,02 (120)	0,63(4)	0
Arandu 2-SP	4,44 (28)	0,32(2)	0
Avaré-SP	6,02 (38)	0	0
Uruguaiana – RS	12,52 (79)	0	0
Santa Rita do Passa Quatro-SP	9,51 (60)	0	0
Auriflama-SP	15,53 (98)	1,11 (7)	0,32 (2)
São Carlos- SP	9,51 (60)	0	0
Total	95,88 (605)	3,65 (23)	0,48(3)

¹ - homozigoto sensível; ² - heterozigoto; ³ - homozigoto resistente

A partir da comparação dos resultados dos FR com a frequência dos genótipos dos variados locais é possível observar que apesar da localidade de São Carlos ter apresentado o maior FR não foram identificadas larvas com o alelo R para a mutação estudada e que em Botucatu, com FR menor, foram detectadas oito larvas com o alelo R. Já os resultados da localidade de Auriflama foram mais coerentes com o FR, pois foram encontrados nove larvas com o alelo resistente para mutação KDR, dos quais dois eram RR e sete SR. A maioria das larvas (95,88%) estudadas foi homozigota sensível, enquanto menos de 5% da população foi heterozigota ou homozigota resistente para mutação. Em relação às concentrações testadas, foram encontradas larvas vivas com o genótipo SR nas seguintes concentrações ($\mu\text{g}/\text{cm}^2$) de piretroide nos bioensaios e localidades: 25,6; 102,4 e 409,6 em Auriflama; 6,4, 25,6 e 102,4 em José Bonifácio; e 1,6 em Pirajuí. O genótipo RR somente foi encontrado em larvas sobreviventes às concentrações mais

baixas do piretroide: 1,6 e 6,4 em Auriflama e 25,6 em Arandu 1. As análises estatísticas, mostraram diferenças significativas ($P < 0,001$) nas frequências dos genótipos em relação às diferentes concentrações de cipermetrina.

Ainda são poucos os estudos que utilizaram métodos moleculares para avaliar a resistência a pesticidas nas populações brasileiras do carrapato dos bovinos. No estudo epidemiológico conduzido por Andreotti et al. (2011), não foi evidenciada a presença da mutação tipo kdr em três populações de carrapatos fenotipicamente identificadas como resistentes aos piretroides no Mato Grosso do Sul. Faza et al. (2013) também realizaram a pesquisa de alelos tipo kdr em larvas de *R. microplus* provenientes de 587 populações do estado de Minas Gerais. Esses autores identificaram que 91,9% das populações avaliadas eram heterozigotas (SR), demonstrando que a maioria das populações apresentaram o alelo que confere a resistência a pesticidas piretroides.

Conclusões

Podemos concluir que, no estado de São Paulo, existe resistência aos pesticidas piretroides e organofosforados em populações de *H. irritans* e *R. microplus*, sendo que a resistência provocada pelos piretroides foi mais frequente. Os pecuaristas deverão ser instruídos no sentido de preservar esses princípios químicos, que poderão se tornar ineficientes em um curto período de tempo, para a maioria das populações de parasitas presentes nos rebanhos paulistas.

Referências

- ANDREOTTI, R. et al. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.20, n.2, p.127-133, abr./jun. 2011.
- BARROS, A. T. et al. Horn fly (Diptera: Muscidae) resistance to organophosphate insecticides. **Veterinary Parasitology**, v.96, n.3, p. 243-256, abr. 2001.
- BARROS, A. T. M et al. Susceptibility of the hornfly, *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae), to insecticides in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.21, n.2, p.125-132, abr./jun. 2012.
- BARROS, A.T. M.; SCHUMAKER, T.T.S.; KOLLER, W.W.; KLAFKE, G.M.; ALBUQUERQUE, T.A.; GONZALEZ, R. Mechanisms of pyrethroid resistance in *Haematobia irritans* (Muscidae) from Mato Grosso do Sul state, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n.1, p.136-142, jan./mar. 2013.
- BARROS, A. T. M. Situação da resistência da *Haematobia irritans* no Brasil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.13, suplemento 1, 2004.
- BIANCHI, M.W.; BARRÉ, N.; MESSAD, S. Factores related to cattle level resistance to acaricides in *Boophilus microplus* tick populations in New Caledonia. **Veterinary Parasitology**, v.112, n.1-2, p.75-89, 2003.
- BRITO, L. G. et al. **Avaliação da susceptibilidade de populações da mosca-dos-chifres a pesticidas organofosforados em rebanhos de corte no Estado de Rondônia, Brasil**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2014. 4 p. (Embrapa Rondônia. Comunicado Técnico, 390).
- BRITO, L. G. et al. **Otimização e validação do diagnóstico molecular da resistência a pesticidas piretróides em populações brasileiras da mosca-dos-chifres**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2013. 7 p. (Embrapa Rondônia. Circular Técnica, 130).
- DONG, K. E.; SCOTT, J. G. Linkage of kdr-Type resistance and the para-Homologous sodium channel gene in German cockroaches (*Blattella germanica*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.24, n.7, p. 647-654, jul. 1994.

FAZA, A. P. et al. A new approach to characterization of the resistance of populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) to organophosphate and pyrethroid in the state of Minas Gerais, Brazil. **Experimental Parasitology**, v.134, n.4, p.519-523, aug. 2013.

FOIL, L. D. et al. Studies on horn fly control with insecticide ear tags and resistance management. **Louisiana Cattleman**, v.30, n.4, p.37-50, 1997.

FOIL, L. D.; GUERRERO, F. D.; BENDELE, K. G. Detection of target site resistance to pyrethroids and organophosphates in the horn fly using multiplex polymerase chain reaction. **Journal of Medical Entomology**, v.47, n.5, p.855-861, sep. 2010.

FOURNIER, D.; MUTERO, A. Modification of acetylcholinesterase as a mechanism of resistance to insecticides. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, v.108, n.1, p.19-31, may 1994.

FOURNIER, D. et al. *Drosophila* acetyl cholinesterase: mechanisms of resistance to organophosphates. **Chemico-Biological Interactions**, v.87, n.1-3, p.233-238, jun. 1993.

FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, ano 23, n.137, p.53-56, 2004.

GEORGHIOU, G. P. Overview of insecticide resistance. In: GREEN, M. B.; LEBARON, H. M.; MÖBERG, W. K. (eds.). **Managing resistance to agrochemicals: from fundamental research to practical strategies**. Washington, DC: American Chemical Society, 1990. p.18-41. (ACS Symposium Series, 421).

GRISI, L. et al. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, n.2, p.150-156, abr./jun. 2014.

GUERRERO, F. D.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J. Use of an allele-specific polymerase chain reaction assay to genotype pyrethroid resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Journal of Medical Entomology**, v.38, n.1, p.44-50, jan. 2001.

GUERRERO, F. D. et al. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of kdr and super-kdr point mutations. **Insect biochemistry and molecular biology**, v.27 n.8/9, p.745-755, aug. 1997.

GUERRERO, F. D.; KUNZ, S. E.; KAMMLAH, D. Screening of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) populations for pyrethroid resistance-associated sodium channel gene mutations by using a polymerase chain reaction assay. **Journal of Medical Entomology**, v.35, n. 5, p.710-715, sep. 1998.

HE, H. et al. Identification of a point mutation in the para-sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.261, n.3, p.558-561, aug. 1999.

HONER, M. R.; BIANCHIN, I.; GOMES, A. **Mosca-dos-chifres: histórico, biologia e controle**. Campo Grande, MS: Embrapa-CNPGC, 1990. 34 p. (Embrapa-CNPGC. Documentos, 45).

JAMROZ, R. C. et al. Role of the kdr and super-kdr sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*). **Insect Biochemistry and Molecular Biology**, v.28, n.12, p.1031-1037, dec. 1998.

LI, A. Y. et al. Survey of resistance to permethrin and diazinon and the use of a multiplex polymerase chain reaction assay to detect resistance alleles in the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.). **Journal of Medical Entomology**, v.40, n.6, p.942-949, nov. 2003.

MENDES, M. C. et al. Characterization of the pyrethroid resistance profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations from the states of Rio Grande do Sul and Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.22, n.3, p.379-384, jul./set. 2013.

MENDES, M. C.; LIMA, C. K. P.; PRADO, A. P. Determinação da frequência de realização de bioensaios para o monitoramento da resistência do carrapato *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v.74, n.2, p.87-93, abr./jun. 2007.

MILLER, R. J. et al. Use of a modified-Larval Pocket Test (LPT) to measure amitraz susceptibility in *Boophilus microplus* in Brazil, New Caledonia, and Uruguay, and a comparison of the modified-LPT to a modified-Shaw technique for amitraz testing in *B. microplus*. In: V INTERNATIONAL SEMINAR IN ANIMAL PARASITOLOGY. **World Situation of Parasite Resistance in Veterinary Medicine, SENASA-ICA-INIFAP-INFARVET-UADY-FAO-AMPAVE**. Merida, Mexico: [s.n.], 2003. p.118–123.

MUTERO, A. et al. Resistance-associated point mutations in insecticide-insensitive acetylcholinesterase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.91, n.13, p.5922–5926, jun. 1994.

OLIVEIRA, M. C. S. et al. Resistance of beef cattle of two genetic groups to ectoparasites and gastrointestinal nematodes in the state of São Paulo, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v.197, n.1-2, p.168-175, oct. 2013.

OYARZÚN M. P.; LI, A. Y.; FIGUEROA, C. C. High levels of insecticide resistance in introduced horn fly (Diptera: Muscidae) populations and implications for management. **Journal of Economic Entomology**, v.104, n.1, p.258-265, feb. 2011.

SABATINI, G. A. et al. Knockdown resistance in pyrethroid-resistant hornfly (Diptera: Muscidae) populations in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.18, n.3, p.8-14, jul./set. 2009.

SAS Institute 2002–2003. Version 9.1. Cary, U.S.A.: SAS, 2003.

SCOTT, J. A. The molecular genetics of resistance: resistance as a response to stress. **The Florida Entomologist**, v.78, n.3, p.399-414, sep. 1995.

SHEPPARD, D. C.; HINKLE, N. C. A field procedure using disposable materials to evaluate horn fly insecticide resistance. **Journal of Agricultural Entomology**, v.4, n.1, p. 87-89, 1987.

SILVA, A. M. et al. Artificial infestation of *Boophilus microplus* in beef cattle heifers of four genetic groups. **Genetics and Molecular Biology**, v.30, n.4, p.1150-1155, 2007.

SILVA, A. M. et AL. Infestação natural de fêmeas bovinas de corte por ectoparasitas na Região Sudeste do Brasil. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.39, n.7, p.1477–1482, jul. 2010.

SODERLUND, D. M.; BLOOMQUIST, J. R. Neurotoxic actions of pyrethroids insecticides. **Annual Review of Entomology**, v.34, p.77-96, 1989.

SOGORB, M.A.; PLA, A.; VILANOVA, E. La esterasas que hidrolizan compuestos organofosforados: un mecanismo eficaz de detoxificación. **Revista de Toxicología**, v.13, n.1, p.43-48, 1996.

SOGORB, M. A.; Vilanova, E. Enzymes involved in the detoxification of organophosphorus, carbamate and pyrethroid insecticides through hydrolysis. **Toxicology Letters**, v.128, n.1-3, p.215-228, mar. 2002.

STONE, B. F.; HAYDOCK, K. P. A method for measuring the acaricide-susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). **Bulletin of Entomological Research**, v.53, n.3, p.563-578, 1962.

TEMEYER, K. B. et al. Acetylcholinesterase mutation in diazinon-resistant *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae). **Veterinary of Parasitology**, v.154, n.3-4, p.300-310, jul. 2008.

VONTAS, J. G. et al. Resistance-associated point mutations of organophosphate in sensitive acetylcholinesterase, in the olive fruit fly *Bactrocera oleae*. **Insect Molecular Biology**, v.11, n.4, p.329-336, aug. 2002.

WILLIAMSON, M. S. et al. Identification of mutations in the housefly para-type sodium channel gene associated with knockdown resistance (kdr) to pyrethroid insecticides. **Molecular Genetics and Genomics**, v.252, p.51-60, 1996.

Apêndice A

Questionário

Parte 1. Identificação da propriedade e contato

1. Município:
2. Localização geográfica:
3. Endereço:
4. Nome do proprietário:
5. Técnico para contato:
6. Tipo de exploração do rebanho:

Parte 2: Questões referentes ao manejo de bases pesticidas e problemas com infestações de ectoparasitas no rebanho

1. Quando foi realizado o último tratamento para o controle de ectoparasitas no rebanho ?
2. Qual a base pesticida utilizada para tratar os animais ?
3. Com que frequência os animais são tratados para o controle de ectoparasitas ?
4. Os tratamentos para o controle de ectoparasitas se destinam ao controle de carrapatos ou de moscas ?
5. Qual o maior problema em relação a infestação por ectoparasitas no rebanho ?
6. Em que época ocorrem as maiores infestações por mosca-dos-chifres no rebanho ?