

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PAMPA
CAMPUS URUGUAIANA**

MANOEL ROBERTO POITEVIN DA SILVA FILHO

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR
SUPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Área de concentração: Sanidade Animal

**Uruguaiana
2019**

MANOEL ROBERTO POITEVIN DA SILVA FILHO

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR S
UPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária apresentado ao curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Orientador: Professor Dr. Tiago Gallina

**Uruguaiana
2019**

MANOEL ROBERTO POITEVIN DA SILVA FILHO

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO CURRICULAR S
UPERVISIONADO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

Relatório do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária, apresentado ao curso de Medicina Veterinária, Campus Uruguaiana da Universidade Federal do Pampa, como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Medicina Veterinária.

Relatório defendido e aprovado em: 06 de junho de 2019

Banca examinadora

Prof. Dr. Tiago Gallina
Orientador
UNIPAMPA

Prof.^a. Dra. Irina Lubeck
Medicina Veterinária, UNIPAMPA

Prof.^a. Dra. Débora da Cruz Payão Pellegrini
Medicina Veterinária, UNIPAMPA

Dedico essa conquista a Deus, minha família, meus amigos, colegas e professores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter me abençoado nesta caminhada acadêmica, cuja representou um ciclo importante da minha vida.

Meus pais Manoel (*in memoriam*) e Aura, pessoas que foram essenciais para que o meu sonho se realizasse, além de sempre incentivarem o gosto pelos animais e acreditarem sempre no meu sucesso.

Às minhas irmãs Luana e Roberta, meus cunhados Alex e Eduardo, meus sobrinhos Arthur, Lorena, Lara e João Pedro e demais membros da família que sempre acreditaram no meu potencial.

À Nathalia que dividiu comigo todos os dias desta caminhada, sempre se mostrando presente nos bons e maus momentos, pessoa ímpar para que esta conquista hoje se tornasse real.

Aos meus amigos da época de ensino médio e fundamental da escola que estiveram sempre ao meu lado.

Aos meus amigos e colegas de faculdade, em especial a turma XI e a todos do laboratório de parasitologia que garantiram excelentes momentos, mostrando-se sempre prestativos nas mais diversas atividades.

A todos meus professores, que se dedicam diariamente para transmitir ensinamentos dentro da Medicina Veterinária, em especial ao meu orientador, amigo e “tato” Tiago Gallina que nunca mediu esforços para ajudar qualquer pessoa, sempre disposto se mostrando um exemplo tanto de vida como de profissional.

Às pessoas que acreditaram em mim e no meu trabalho me dando oportunidade e liberdade para demonstrar o mesmo.

Ao IPVDF e todos que trabalham na instituição, pela recepção e hospitalidade, em especial José Reck e Rovaina Doyle meus supervisores por serem pessoas impecáveis para ensinar, garantindo uma grande experiência.

“Estamos comprometidos com a ciência para que possamos criar as melhores oportunidades para ajudar as pessoas.”

(Ken Frazier)

RESUMO

O presente relatório tem como objetivo descrever e discutir as atividades desenvolvidas durante a realização do Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária na área de Sanidade Animal, com enfoque em parasitologia em parceria do Laboratório da Parasitologia da Universidade Federal do Pampa com o Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), localizado em Eldorado do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil. O estágio foi realizado no período de 04 de março a 30 de maio de 2019, totalizando a carga horária de 480 horas, sob a orientação do Prof. Dr. Tiago Gallina Corrêa e supervisão dos Médicos Veterinários Tiago Gallina Corrêa, Dr. José Reck e Dra. Rovaina Doyle. Compreendeu atividades relacionadas a provas de resistência para *Rhipicephalus microplus* realizadas a partir do teste de imersão de adultos (TIA) e teste pacote de larvas (TPL), identificação de ovos de helmintos através do teste de flutuação quantitativo (OPG), acompanhamento de projetos de pesquisa intitulados “Leishmaniose visceral- estudo socioepidemiológico em áreas endêmicas e áreas não endêmicas para a enfermidade em municípios do Rio Grande do Sul”, “Eficácia do Fluazuron contra *R. microplus* em diferentes concentrações”, “Investigação de *Borrelia* spp. em pequenos roedores silvestres do Bioma Pampa”

Palavras-Chave: Sanidade animal, parasitologia, *Rhipicephalus microplus*.

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 - Mapa de localização do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor 14
- FIGURA 2 - Grupos de teleóginas prontos para serem submetidos à imersão para avaliação de resistência ou susceptibilidade ao acaricida testado 17
- FIGURA 3- Impregnação de papéis filtro com solução acaricida 18
- FIGURA 4 – Teste de imersão de larvas de *R. microplus* (TIL), Painel(A) Larvas de *R. microplus* sendo alocadas nos pacotes. Painel(B) Pacotes de larvas finalizados para teste de resistência a acaricidas 19
- FIGURA 5 - Larvas de carrapato avaliadas após a finalização do teste em uma amostra 20
- FIGURA 6 - Bovino com alta infestação de carrapatos em propriedade com suspeita de multirresistência 21
- FIGURA 7 - Ovo de helminto da subordem Strongylida(seta) encontrado em uma câmara de McMaster de uma amostra de fezes de um ovino submetida ao teste do OPG 23
- FIGURA 8 - Amostra de fezes de ovino em coprocultura, coleta de larvas de nematódeos por hidrotropismo positivo e termo tropismo. 24
- FIGURA 9 – Ciclo do carrapato *Rhipicephalus microplus*. 28
- FIGURA 10 – Dinâmica populacional do carrapato bovino no Rio Grande do Sul onde F1 = primeira geração, F2 = segunda geração e F3 = terceira geração de carrapatos. 29

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Atividades acompanhadas e desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária no período de 04 de março a 30 de maio 2019

16

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CI	Concentração Inibitória
DD	Dose discriminatória
ECSMV	Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária
Ha	Hectare
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IPVDF	Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor
LPA	Laboratório de Parasitologia Veterinária
OPG	Ovos por grama de fezes
PF	Postura fértil
PPM	Partes por milhão
TIA	Teste de imersão de adultos
TIL	Teste de imersão de larvas
TPB	Tristeza Parasitária Bovina
TPL	Teste do pacote de larvas
Unipampa	Universidade Federal do Pampa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS	14
2.1 Local de estágio	14
2.2 Descrição das atividades desenvolvidas	15
2.2.1 Teste de imersão de adultos (TIA)	16
2.2.2 Teste do pacote de larvas (TPL)	17
2.2.3 Teste de imersão de larvas (TIL)	18
2.2.4 Teste de imersão com Fluazuron	19
2.2.5 Coleta de Carrapatos	20
2.2.6 Técnica de McMaster (contagem de ovos por grama de fezes - OPG) por grama de fezes (OPG)	21
2.2.7 Coprocultura	23
2.2.8 Questionários sobre Leishmaniose Visceral	24
2.2.9 Investigação de <i>Borrelia</i> spp. em pequenos roedores silvestres do Bioma Pampa	25
3 DISCUSSÃO	27
3.1 <i>Rhipicephalus microplus</i> (carrapato dos bovinos)	27
3.1.1 Controle e resistência aos acaricidas	29
3.2 Fluazuron, a molécula mais nova do mercado	31
3.2.1 Aplicações e limitações do teste com Fluazuron em TIA	32
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
5 REFERÊNCIAS	37
6 ANEXOS	42

1 INTRODUÇÃO

No ano de 2014, o Brasil possuía o segundo maior rebanho bovino do mundo com cerca de 212,3 milhões de cabeças, após dois anos, o número de bovinos atingiu a marca de 218,23 milhões de animais tendo um aumento de 1,4% em relação aos anos anteriores, sendo o Rio Grande do Sul detentor do sexto maior rebanho do país com 13 milhões de cabeças (IBGE, 2016). Estes fatores demonstram o crescimento gradual da produção de bovinos, o que implica inevitavelmente no aumento de problemas sanitários, especialmente aqueles relacionados a vetores e doenças zoonóticas, sendo o *Rhipicephalus microplus* (carrapato do boi) um dos principais parasitos (FAO, 2017). Este aumento de parasitismo ocorre pelas taxas de lotação (animal/Ha) (CRUZ et al., 2009). Segundo Farias et al. (2008), outro fator relevante para o crescimento exponencial das infestações no Rio Grande do Sul é a maior exploração de raças europeias utilizadas para a produção de carne e de leite, e que estão criadas em clima subtropical, apresentando uma maior susceptibilidade e favorecimento para a reprodução do parasito.

Os prejuízos econômicos totalizam mais de 3,4 bilhões de dólares por ano, que se caracterizam por perdas diretas na produção, danos no couro por reações inflamatórias, transmissão de doenças e, de forma indireta, um aumento no custo de mão de obra, instalações, e aquisição de equipamentos e acaricidas para o controle (CATTO et al., 2010; GRISI et al., 2014). Porém, as superpopulações de carrapatos existentes nos rebanhos foram submetidas a uma forte pressão do uso de acaricidas químicos durante anos, o que favoreceu a seleção de indivíduos resistentes às drogas comerciais, tornando cada vez mais difícil seu controle (GONZALES, 2003).

No sentido de compreender esses aspectos relacionados às perdas econômicas, multirresistência a acaricidas nas populações existentes no Estado, e formas de controle, que somados possuem grande importância à saúde animal, o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária (ECSMV) foi realizado em parceria do Laboratório de Parasitologia na Universidade Federal do Pampa e o Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) em Eldorado do Sul, sob supervisão dos Médicos Veterinários Dr. José Reck e Dra. Rovaina Doyle,

envolvendo atividades na área de sanidade, onde foi possível acompanhar experimentos em andamento como o de avaliação da atividade do Fluazuron contra *R. microplus* em diferentes concentrações e provas de resistência pelos testes de imersão de adultos (biocarrapaticidograma ou TIA) e teste de pacote de larvas, além de OPG de ovinos para monitorar parasitismo por helmintos e auxílio projetos de pesquisa denominados “Leishmaniose visceral - estudo socio epidemiológico em áreas endêmicas e não endêmicas para a enfermidade em municípios do Rio Grande do Sul”, “Avaliação do Fluazuron contra o *R. microplus* em diferentes concentrações” “Investigação de *Borrelia* spp. em pequenos roedores silvestres do Bioma Pampa”

Todos esses temas são relevantes e interferem na sanidade animal, e por ser um centro de referência na área, o IPVDF, foi escolhido como local para realização do estágio final. O presente relatório tem como objetivo descrever e discutir as atividades durante o ECSMV realizado no período de 04 de março ao dia 30 de maio de 2019.

2 ATIVIDADES DESENVOLVIDAS

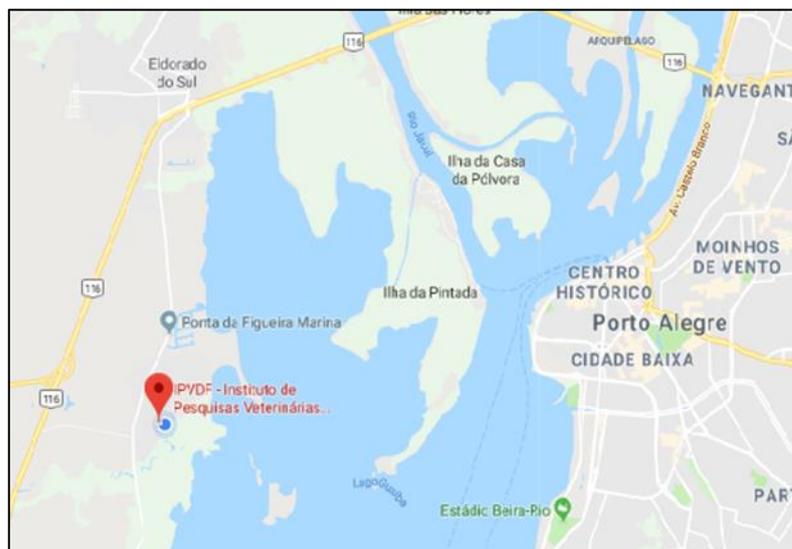
2.1 Local de realização do estágio

O ECSMV foi realizado no Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Pampa em parceria com o Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF) que está localizado na cidade de Eldorado do Sul, no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O IPVDF conta com seis laboratórios onde se desenvolvem diagnósticos e pesquisas relacionadas a Medicina Veterinária.

As ações de pesquisa e diagnósticos realizados visam soluções tecnológicas para a pecuária realizadas nas áreas de Parasitologia, Virologia, Bacteriologia, Biologia Molecular, Histopatologia e Saúde de aves. Laboratório de Parasitologia (LPA) do IPVDF é conduzido atualmente pelos pesquisadores Dr. José Reck e Dra. Rovaina Doyle.

O laboratório tem como o objetivo identificação, diagnóstico e caracterização de parasitos e doenças parasitárias, com atenção voltada a vetores e doenças vetoriais. Nos últimos anos a principal linha de trabalho e pesquisa do LPA é voltada a carrapatos e doenças transmitidas pelos mesmos, pois este parasito é considerado um dos principais problemas de sanidade, tanto causando prejuízos econômicos, transmissão de doenças, diminuição da produção e morte.

FIGURA 1- Mapa de localização do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor



(Fonte: Google maps)

2.2 Descrição das atividades

Durante o período do ECSMV no laboratório de Parasitologia Veterinária da Universidade Federal do Pampa em parceria com o IPVDF foi possível acompanhar e realizar atividades na área de sanidade animal, através de diagnósticos parasitológicos para resistência de *R. microplus*, como teste de imersão de adultos, teste de pacote de larvas, teste de imersão de larvas, coletas de carrapatos, além de identificação de helmintos de ruminantes pelo método de Gordon e Whitlock modificado, técnica de flutuação quantitativa (OPG) e auxílio nos projetos de pesquisa intitulados “Leishmaniose visceral- estudo sócio epidemiológico em áreas endêmicas e não endêmicas para a enfermidade em municípios do Rio Grande do Sul”, “Avaliação do Fluazuron contra o *R. microplus* em diferentes concentrações” e “Investigação de *Borrelia* spp. em pequenos roedores silvestres do Bioma Pampa”. As atividades acompanhadas e/ou realizadas estão quantificadas na Tabela 1.

TABELA 1 - Atividades acompanhadas e desenvolvidas durante o Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária que compreende o período de 11 de março a 30 de maio de 2019.

Atividades	Quantidade*	%
Teste de imersão de adultos	762	43
Teste do pacote de larvas	38	3
Teste de imersão de larvas	38	3
Coleta de carrapatos	4	4
Teste de imersão com fluazuron	2400	16
OPG	80	4
Coprocultura	4	4
Questionários leishmaniose	110	1
Necropsia em roedores	15	16
Extração de DNA	5	6
Total	92	100

* Os “números” expressam as quantidades de animais utilizados ou vezes que se teve contato com a atividade.

Fonte: O autor

2.2.1 Teste de imersão de adultos (TIA)

O teste de imersão de adultos elaborado por Drummond et al. (1973) é um dos testes de eleição para a avaliação do produto com a melhor eficácia para o carrapato bovino, pois possibilita através de ensaios laboratoriais avaliarem a taxa de sensibilidade da população testada frente aos acaricidas. O teste é baseado em expor a população de carrapatos às classes de acaricidas dispostas nos seguintes grupos químicos: Amidínico (amitraz), associações de organofosforados e piretróides (por sua ação sinérgica), Lactonas macrocíclicas (ivermectina), Fenilpirazol (fipronil), Organofosforados, Benzoilfeniluréia (fluazuron) e piretróides sintéticos, mediante ao protocolo de TIA. As fêmeas adultas ingurgitadas (teleóginas) são alocadas em placas de Petri em grupos de 10. Cada grupo é pesado realizando uma média entre os mesmos, sendo em seguida imersas em uma solução específica de cada produto em água destilada por cinco minutos, com exceção do grupo das Lactonas macrocíclicas no qual o tempo de imersão é maior compreendendo 30 minutos (Figura 2).

Após o fim do período de imersão, estas teleóginas são enxugadas e são mantidas por um período de 14 dias em uma estufa com umidade próxima a 80% e temperatura próxima a 27°C. Em seguida é realizada uma avaliação individual para cada grupo, onde se analisa a verificação da inibição da postura (aos sete dias), e após mais sete dias esta é pesada e incubada em tubos de ensaio que permanecem em estufa com as mesmas condições anteriores a fim de permitir a eclosão dos ovos (por mais 28 dias). A eclosão é avaliada visualmente em termos percentuais, considerando intervalos de 5%. Para chegar ao resultado final são realizadas duas equações a fim de quantificar a atividade (eficácia) *in vitro* dos acaricidas (Inibição da postura viável) sobre a população tratada:

-Postura fértil (PF) = (massa de ovos x% eclosão viável) / peso das teleóginas

-Inibição da postura viável (%) = $[1 - (PF \text{ grupo tratado} / PF \text{ grupo controle})] \times 100$.

Todos estes valores são dispostos em um formulário de acompanhamento do teste, em que são anotados os valores referentes a cada fase do processo, no qual se considera um produto químico com total eficácia quando, inibe a postura por morte das teleóginas ou inibe totalmente a eclosão dos ovos, considerando-se 100%. Em qualquer valor abaixo considera-se que haja presença de indivíduos

resistentes a molécula testada na população amostrada. Durante o estágio foram realizados 38 testes, totalizado 762 ensaios.

FIGURA 1- Grupos de teleóginas prontas para serem submetidas ao teste de imersão para avaliação de resistência ou susceptibilidade ao acaricida testado.



Fonte: o autor

2.2.2 Teste do pacote de larvas (TPL)

O TPL é uma técnica que foi desenvolvida por Stone; Haydock (1962) em que se dispõem as larvas em papéis filtro impregnados com os princípios ativos dos produtos acaricidas (Figura 3). Após realizar as diluições dos fármacos em um solvente (tricloroetileno) e um transportador (óleo de oliva), estes são impregnados nos papéis, distribuindo-se um volume de 0,7 ml da solução em cada papel. Os papéis absorvem o produto, e após a secagem, coleta-se, com o auxílio de um pincel, uma porção de aproximadamente 100 larvas infestantes (com 15 a 20 dias pós eclosão) que são distribuídas sobre papéis impregnados. Estes, após dobrados, são selados com um grampo e formam um pacote. Estes pacotes são mantidos em estufa a uma temperatura média de 27°C e uma umidade aproximada a 70% por 24 horas. Passado o tempo, o pacote é aberto e se avalia a eficácia a partir do critério mortalidade de larvas.

O teste tem grande importância para identificação da resistência aos acaricidas, sendo utilizado tanto para diagnóstico como para pesquisa sempre que possível, garantindo uma comparação com os resultados obtidos em TIA e complementado pelo Teste de imersão de larvas (TIL), favorecendo uma confiabilidade maior nos resultados.

FIGURA 3 – Impregnação de papéis filtro com solução acaricida



Fonte: o autor

2.2.3 Teste de imersão de larvas (TIL)

O TIL foi descrito por Shaw no ano de 1996, e avalia a resistência de *R. microplus* a partir de larvas infestantes que são imersas em uma solução acaricida, seguindo protocolos dos testes utilizadas para cada base química. Após a imersão, estas são removidas da solução com o auxílio de um pincel e secas em um papel toalha e alocadas em pacotes de papel filtro fechados por cliques metálicos (Figura 4). Da mesma forma que se procede com o TPL, a mortalidade das larvas é avaliada após 24 horas em temperatura e umidade ideais.

Geralmente este teste é mais utilizado para o diagnóstico de resistência do grupo das Lactonas Macrocíclicas (ivermectina, abamectina, doramectina, moxidectina) uma vez que este teste (TIL) é considerado mais sensível para detecção de resistência a este grupo químico do que o TPL (SABATINI et al., 2001; KLAFKE et al., 2006). Tanto o TIL como TPL são usados no Instituto para pesquisa e avaliação da resistência a acaricidas de teleóginas que chegarem para análise na fase de postura (impróprias para TIA) ou para comparações com o TIA. Esse teste exige um treinamento para a execução, tem um preço de custo elevado (devido, principalmente, ao uso de produtos em grau técnico) e demanda um grande tempo para realizar as técnicas.

FIGURA 4 – – Teste de imersão de larvas de *R. microplus* (TIL), Painel(A) Larvas de *R. microplus* sendo alocadas nos pacotes. Painel(B) Pacotes de larvas finalizados para teste de resistência a acaricidas.



Fonte: o autor

2.2.4 Teste de imersão com Fluazuron

O teste de imersão de adultos com Fluazuron é uma técnica que foi desenvolvida por Graf e colaboradores al. (1994), quatro anos após o surgimento da molécula. Com a difusão dos testes de resistência e de pesquisas realizadas *in vitro*, e a partir de ensaios laboratoriais os resultados da molécula começaram a compor os exames. O teste é realizado com produto em grau técnico diluído em solventes como acetona e triton. Para isso acontecer foi eleita uma dose discriminatória (50 ppm), ou seja, este valor é a menor dose que seria capaz de impedir a eclosão de

carrapatos de uma cepa susceptível, e não evitar a eclosão de carrapatos de uma cepa resistente (RECK et al., 2014).

São necessárias 160 teleóginas que são alocadas em grupos de 20, cada grupo é imerso em uma respectiva concentração (5 ppm, 10 ppm, 20 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 500 ppm e controle) por 5 minutos. Após o término da imersão, as teleóginas são enxugadas e dispostas individualmente em tubos de ensaio identificados e fechados com algodão. As amostras ficam em estufa por um período de 42 dias com temperatura média de 27° e umidade média relativa de 70%.

Para avaliação ao final do período, a eclosão das larvas de cada amostra é avaliada por um estereomicroscópio e o resultado disposto em uma planilha, onde ao final é realizada uma média da eclosão viável e a comparação dos resultados das diferentes concentrações.

FIGURA 5 – Larvas de carrapato avaliadas após a finalização do teste em uma amostra.



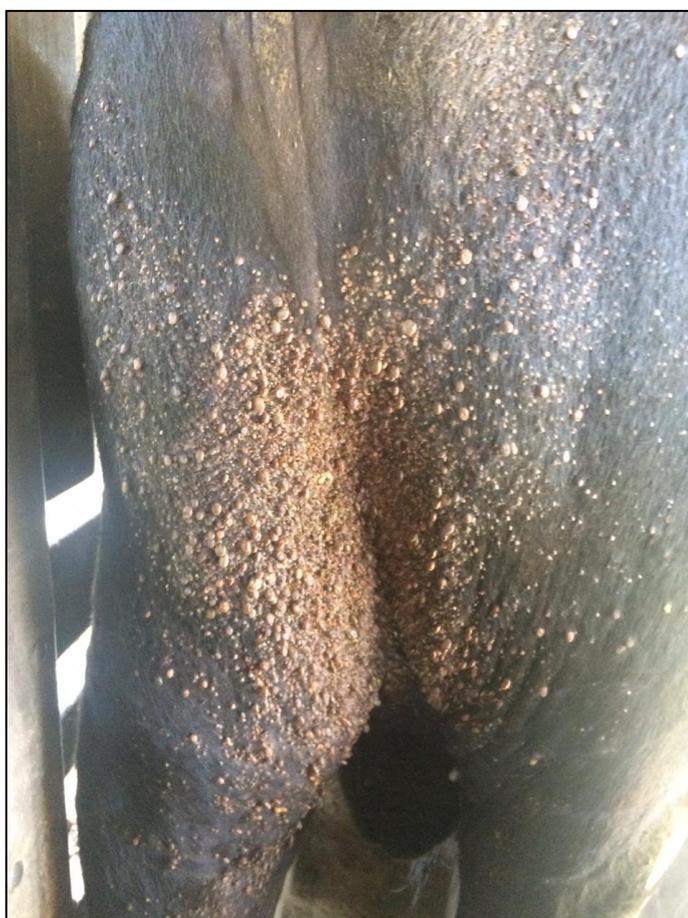
Fonte: o autor

2.2.5 Coleta de Carrapatos

A coleta dos carrapatos é o primeiro passo antes de qualquer teste laboratorial, tanto para o TIA, onde se necessita teleóginas ingurgitadas, quanto para TPL e TIL nos quais se busca fêmeas ingurgitadas para incubá-las para postura.

Durante o ECSMV houve um experimento para avaliação de uma nova molécula no município de Santana do Livramento. Foi realizada a obtenção de teleóginas dos bovinos a fim de aplicar testes *in vitro* de diagnóstico de resistência, assim como o acompanhamento da eficácia do tratamento experimental carrapatos pós-tratamento. Outra coleta realizada foi em uma propriedade onde havia uma alta infestação e suspeitava-se de multirresistência no município de Eldorado do Sul.

FIGURA 6 – Bovino com alta infestação de carrapatos em propriedade com suspeita de multirresistência.



Fonte: O autor

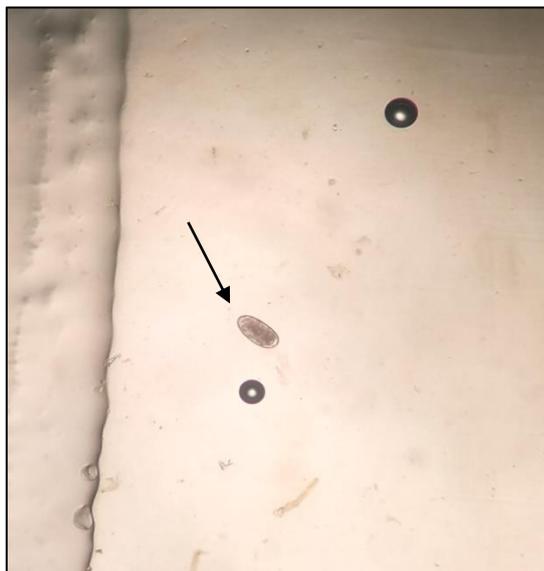
2.2.6 Técnica de McMaster (contagem de ovos por grama de fezes - OPG)

O setor agropecuário corresponde cerca de 14,5% do PIB brasileiro, sendo grande parte devido à produção e comercialização de ruminantes (IBGE, 2016); porém, a produção tem vários entraves, sendo um deles as doenças parasitárias. A

ovinocultura e a caprinocultura são as mais prejudicadas pela ação dos nematódeos gastrointestinais, que causam atrasos na produção e na grande parte dos casos a morte dos animais, cursando com um grande prejuízo econômico aos produtores (GRISI et al., 2014; GIRÃO et al., 1992). Para fins diagnósticos do parasitismo nos rebanhos, o OPG é a técnica mais procurada, se tratando de helmintos, devido à sua facilidade de realização e baixo custo.

A contagem de OPG possibilita ter uma avaliação subjetiva da infestação no animal e do grau de infestação das pastagens (AMARANTE, 2001). Para os testes realizados dentro do IPVDF a técnica se baseia na metodologia descrita por Gordon & Whitlock (1939) modificada. Ao final do estágio foram realizados quatro testes, sendo quatro propriedades com média de 15 amostras. O primeiro passo para realização desta técnica é uma pesagem da amostra a ser testada sendo 2gr para ovinos e 4gr para bovinos. Após a pesagem, a amostra é macerada juntamente a uma solução hipersaturada de açúcar, sendo utilizados 28 mL para ovinos e 26 mL para bovinos. A solução final é distribuída em uma câmara de contagem (câmara de McMaster), onde os ovos e oocistos de parasitas, pela diferença de densidade comparado a solução, flutuam para a superfície da câmara possibilitando a leitura e contagem dos mesmos (Figura 5). Após a contagem, o resultado é calculado a partir do número de ovos encontrados em cada câmara, realizando uma multiplicação com o decimal de 50 para ovinos e 25 para bovinos, obtendo-se como resultado final a estimativa do parasitismo do animal.

FIGURA 7- Ovo de helminto da subordem Strongylida (seta) encontrado em uma câmara de McMaster de uma amostra de fezes de um ovino submetida ao teste do OPG.



Fonte: o autor.

2.2.7 Coprocultura

A técnica de coprocultura realizada para a identificação de larvas de terceiro estágio (L3) a partir de uma amostra de fezes foi descrita por Roberts & O'Sullivan no ano de 1950, com o objetivo de obter maior conhecimento sobre qual gênero de helmintos da família dos tricostrongílídeos estaria presente no animal. Esta técnica é realizada como complemento do diagnóstico da técnica de OPG para identificação dos ovos e oocistos de parasitas gastrointestinais. A técnica pode ser realizada apenas em uma amostra ou com um 'pool' de um grupo de amostras. As amostras de fezes que são dispostas em um recipiente que logo é fechado com um papel laminado com orifícios para garantir a entrada de ar e umidade. Após o fechamento do recipiente a amostra deve permanecer em estufa ou ambiente por um período de 10 dias, garantindo a eclosão dos ovos e a obtenção das larvas infectantes.

Após o período de eclosão, abre-se o recipiente e completa-se com água até formar um menisco superior. Em seguida tampa-se com uma placa de Petri e inverte-se bruscamente evitando que a água derrame. Adiciona-se cerca de 10 ml de água morna (40°C) ao redor do recipiente e inclina-se a placa levemente para facilitar com que as larvas saiam do interior do frasco por ter uma característica de

hidro e termotropismo pelo período de 2 a 4 horas. Em seguida, transfere-se este líquido para um tubo de ensaio que deve permanecer na geladeira por 2 a 3 horas. Com o auxílio de uma pipeta retira-se uma alíquota do tubo, que é alocada sobre uma lâmina adicionando uma gota de lugol para matar as larvas e realizar a observação no microscópio.

Para a identificação das larvas é necessário observação das características morfológicas, sendo elas o tamanho das larvas e da cauda, formato da região anterior, tipos de células intestinais e presença ou não de bainha.

FIGURA 8: Amostra de fezes de ovino em coprocultura para coleta de larvas de nematódeos por hidro e termotropismo positivo



Fonte: o autor.

2.2.8 Questionários sobre Leishmaniose Visceral

A leishmaniose visceral é uma doença vetorial causada por um protozoário do gênero *Leishmania* transmitido por flebotomíneos do gênero *Lutzomyia*. A doença pode ter um ciclo de ocorrência urbano ou silvestre, e caracteriza-se por ser uma enfermidade de curso endêmico em diversos continentes do mundo e em cerca de 54 países, incluindo o Brasil. A doença tem caráter zoonótico, e é considerada negligenciada pela Organização Mundial da Saúde. O primeiro caso registrado no Rio Grande do Sul foi no município de São Borja em um canino, e logo após em um humano, acredita-se que o aparecimento da doença no estado foi motivada por um surto na Argentina no ano de 2008 (MARCONDES, 2013).

O estado do Rio Grande do Sul possui áreas que são consideradas endêmicas e não endêmicas, porém há um conhecimento considerado insuficiente, pelo risco que a doença apresenta. A fim de determinar qual o nível de conhecimento, bem como as atitudes e práticas em relação a prevenção e controle da doença, nas populações, o projeto de pós-graduação acompanhado durante a realização do ESCMV tinha como objetivo aplicar um questionário a moradores das cidades de Uruguaiana e Porto Alegre, onde foram registrados casos humanos, e na cidade de Eldorado do Sul onde não há casos registrados. Outro objetivo é levar a informação a população através de uma conversa explicativa e folheto sobre a leishmaniose. Ao decorrer do projeto foram aplicados 110 questionários na cidade de Uruguaiana, número equivalente a entrega de folhetos (Anexo 3).

2.2.9 Investigação de *Borrelia* spp. em pequenos roedores do Bioma Pampa

Entre os artrópodes vetores de doenças que são consideradas zoonóticas, os carrapatos são considerados o segundo grupo de maior transmissão perdendo apenas para os mosquitos (PAROLA et al., 2001). Os principais patógenos transmitidos por carrapatos são bactérias dos gêneros *Rickettsia* (Febre maculosa) e *Borrelia burgdorferi* (Doença de Lyme).

A doença de Lyme é uma das doenças mais comuns transmitidas por carrapatos no mundo (STANEK et al., 2003). Os carrapatos transmissores habitam geralmente áreas de floresta e seus arredores, e parasitam roedores tidos como reservatórios da doença. No Brasil há relatos de doenças com os sinais clínicos semelhantes à doença de Lyme. Em 2017, Dall'Agnol e colaboradores demonstraram pela primeira vez no Brasil a presença de *Borrelia* sp. em seu vetor tradicional, carrapatos *Ixodes*, encontrados em roedores no Rio Grande do Sul. Sendo assim o projeto tinha como objetivo identificar a presença de *Borrelia* spp. em roedores a fim de esclarecer informações sobre o ciclo enzoótico do agente.

Os roedores eram coletados em levantamentos ambientais realizados por grupos colaboradores. No laboratório era realizada a necropsia do roedor para coleta de ectoparasitos, e obter amostras de orelha e baço. Estes eram submetidos a uma extração de DNA para ser realizada a detecção molecular de *Borrelia* spp. por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

O trabalho tinha como justificativa contribuir para a saúde pública, identificando os reservatórios da bactéria na região do Bioma Pampa e facilitar a investigação da doença em humanos no país.

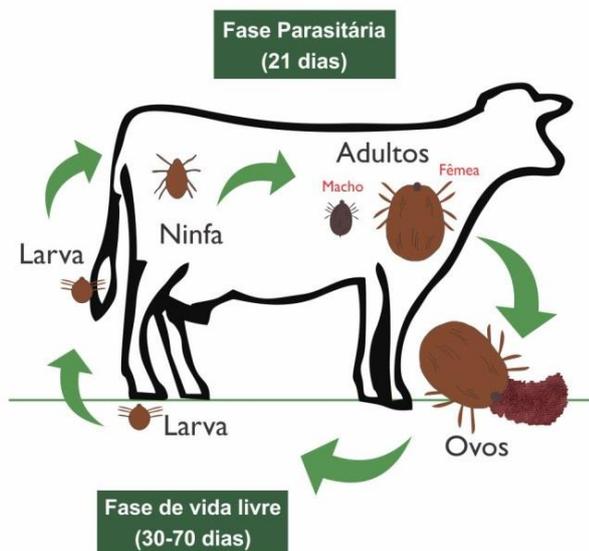
3 DISCUSSÃO

3.1 *Rhipicephalus microplus* (carrapato dos bovinos)

Com o aumento da população mundial, houve a necessidade de ampliação da produção de alimentos de origem animal. Decorrente disso, a intensificação da pecuária e as criações de bovinos aumentaram de forma significativa. Concomitante com estes fatores observou-se um aumento de problemas sanitários nos rebanhos sendo, dentre todas as enfermidades acometem os bovinos, as doenças parasitárias aquelas que possuem maior impacto pela dificuldade de controle (FAO 2017; PERRY & RANDOLPH, 1999). No IPVDF, a demanda tem sido crescente nos últimos anos, especialmente quanto ao diagnóstico da resistência dos carrapatos, da mesma forma que tem acontecido no laboratório de parasitologia da Unipampa. Muito dessas observações foram realizadas em virtude da constante rotina de diagnóstico e pelos laboratórios serem referências no tema para o RS e trabalharem próximos a sistemas de produção de relevância.

O carrapato *R. microplus* é um ectoparasito hematófago, presente em áreas tropicais e subtropicais de todo o mundo, pertencente ao Filo Arthropoda, Classe Arachnida e família Ixodidae. Possui no seu ciclo duas fases de vida: uma parasitária, sobre o hospedeiro que dura aproximadamente 21 dias, e outra de vida livre no meio ambiente, que durando cerca de 30 a 70 dias (FURLONG et al., 2005) (Figura 8). O parasito tem se tornando um dos principais responsáveis por prejuízos econômicos na criação de bovinos, principalmente em raças com origem europeia (CAMILLO et al., 2009). No ecossistema Bioma Pampa, também predominam tais raças descritas, como são vistos nos arquivos laudos de ambos laboratórios, onde verifica-se grande presença de propriedades que criam Aberdeen Angus e Hereford.

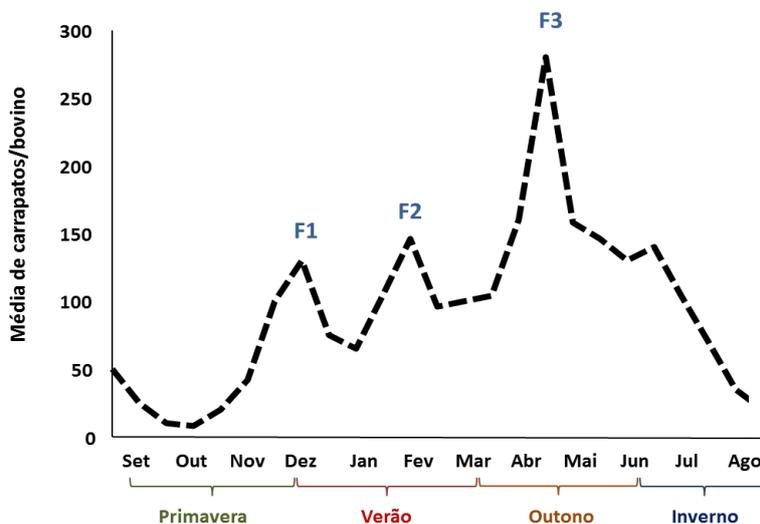
O parasito é causador de grandes perdas relacionadas com a diminuição da produção de leite e carne, danos ao couro, afetando a integridade física do animal, predispondo a ocorrência de miíases, além de transmitir a principal enfermidade infecciosa para a bovinocultura gaúcha denominada o complexo Tristeza Parasitária Bovina (TPB), causada pela infecção isolada ou conjunta pela bactéria *Anaplasma marginale* e os protozoários *Babesia bovis* e *B. bigemina* (CORDOVES, 1997).

Figura 9: Ciclo do carrapato *Rhipicephalus microplus*.

Fonte: Arquivo IPVDF

O carrapato *R. microplus* faz parte das principais reclamações dos proprietários e trabalhadores do meio rural no RS devido à uma grande ocorrência e pela dificuldade de elencar um tratamento associado a estratégias de controle de altas infestações nos rebanhos. As infestações costumam seguir uma dinâmica populacional dividida em três gerações no Rio Grande do Sul. Durante o período do ECSMV, tivemos a oportunidade de presenciar o período da maior presença do parasito nos bovinos, devido à estação e variações sazonais. Portanto, é notório que uma série de fatores podem influenciar na capacidade reprodutiva, como temperatura, umidade, precipitação pluviométrica, e na manutenção do parasito na ocorrência de estações mais atípicas, com invernos menos rígidos, o que favorece o aumento das populações de *R. microplus* em um período que tradicionalmente (inverno) a infestação pelo parasito é menor (Figura 9).

Figura 10: Dinâmica populacional do carrapato bovino no Rio grande do Sul, onde F1= primeira geração, F2= segunda geração e F3= terceira geração de carrapatos.



Fonte: Arquivo IPVDF.

3.1.1- Controle e resistência aos acaricidas

Com o aumento dos prejuízos e problemas causados pelo carrapato, foram desenvolvidas ferramentas para o controle, sendo hoje o uso de acaricidas químicos a principal delas. Ao longo da história, várias substâncias foram utilizadas para reduzir as infestações como fumo, sabão, querosene, enxofre, sempre adicionados a algumas substância para obter uma melhor ação como o óleo mineral. Entretanto estas experiências nunca tiveram um resultado satisfatório (FURLONG et al., 2007). No final do século XIX (por volta do anos 1940), a descoberta do controle por imersão em tanques contendo arsênico foi utilizada , até ser notada que a solução já não diminuía as infestações, concluindo-se que o parasito se tornara resistente. Após a Segunda guerra mundial começaram a surgir outros produtos alternativos de origem orgânica e sintética para o tratamento dos bovinos (GEORGE et al., 2004).

A resistência é uma mudança genético-evolutiva que se estabelece por um estresse ambiental. No caso dos carrapatos são selecionados os mais resistentes a partir das frequentes aplicações de um mesmo princípio ativo ou dosagem excessiva que levam as populações de parasitos a sofrerem transformações para sobreviver aos produtos (KLAFKE, 2008). Essa frequência muitas vezes é estimulada pela má

aplicação dos produtos que tornam a prática de tratamento falha, fazendo com que novamente seja necessária a aplicação, sendo talvez essa a causa mais comum.

Para aprovação de fármacos efetivos para o controle do parasito, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento no Brasil exige uma eficácia mínima de 95% para registro de um produto carrapaticida. Desse modo, considera-se que todo acaricida deveria apresentar esse valor de eficácia, e valores abaixo desta porcentagem poderiam ser potencialmente associados a resistência (PEREIRA, 2008). Porém, há uma dificuldade no estabelecimento de um valor indicativo de resistência em testes de imersão de adultos, sendo muitas vezes considerado que se existe ao menos um indivíduo sobrevivente à aplicação, pode indicar que a população já possui resistência ao fármaco. Os testes que melhor avaliam essas condições foram o TIL e TPL, que apesar de mais trabalhosos, são mais sensíveis.

Os grupos químicos disponíveis atualmente no mercado são distribuídos da seguinte forma: Organofosforados (como clorpirifós) que surgiram em 1946 (KLAFE, 2008), Amidínicos (amitraz) sintetizado na Inglaterra no ano de 1969 (ANDRADE, 2013), Piretróides que surgiram nos anos 80, originalmente extraídos de vegetais e hoje produzidos sinteticamente (Cipermetrina, Deltametrina), apresentando baixa toxicidade em mamíferos (SANTOS, 2007), Lactonas macrocíclicas que são divididas em dois grandes grupos que são as avermectinas (ivermectina, abamectina, eprinomectina e doramectina) e as milbemicinas (moxidectina) (BRITO 2015), Fenilpirazol (fipronil) e Benzoilfeniluréia (fluazuron). O benzoilfeniluréia é o princípio mais novo em comercialização, que age bloqueando o desenvolvimento das formas jovens do parasito por impedirem a formação da quitina (FURLONG, 2007). A partir dos anos de 1990, também surgiram no mercado as associações de organofosforados e piretróides, que se tornaram populares pelo fato de apresentarem efeito sinérgico, ou seja, apresentam alta eficácia mesmo frente a populações resistentes a ambos.

Com o passar do tempo, os problemas começaram a se agravar e cada molécula lançada servia como um escape para o tratamento dos animais. Atrelado às grandes infestações, a facilidade de compra dos fármacos, o uso indiscriminado com excesso de aplicações de forma errônea, foram selecionadas populações de parasitos resistentes e em pouco tempo se notava a ineficácia do produto químico. Segundo Brito (2015), no país os relatos apresentados sobre a resistência do *R. microplus* aos acaricidas de controle se agravou a partir do ano de 2010, afirmação

esta confirmada pelos dados existentes nos arquivos dos testes de resistência realizados no IPVDF, nos últimos 30 anos, desde que o Instituto atua nessa área como sua principal linha de pesquisa.

Além das demais resistências a bases disponíveis para uso, existem resultados importantes em nível mundial desenvolvidos dentro da instituição. A primeira foram amostras de cepas de campo, resistentes a lactonas macrocíclicas que foram detectadas por estudos realizados por Martins e colaboradores (2001). Anos após a descoberta, Klafke e colaboradores (2012) em condições laboratoriais com cepas sensíveis e de campo, padronizaram testes que permitiram constatar que a resistência à ivermectina está amplamente distribuída. Recentemente um estudo realizado por Reck e colaboradores (2014), detectou a resistência do carrapato bovino a um dos princípios ativos mais inovadores, estudados e distribuídos no mercado, o fluazuron.

3.2 Fluazuron, a molécula mais nova do mercado

Lançado no ano de 1994, o Fluazuron é um fármaco de ação sistêmica, composto químico derivado das benzoilfeniluréias, regulador do crescimento a partir da inibição de uma enzima que media a síntese de quitina (componente da cutícula do ácaro). O fluazuron impede que o parasito se desenvolva no estágio seguinte durante o período em que se encontra no hospedeiro, assim como inibe o desenvolvimento dos embriões oriundos de fêmeas tratadas (GRAF et al., 1994). Com a instauração da resistência aos acaricidas, houve uma necessidade do uso de alternativas de tratamento que diferissem daquelas existentes no mercado. Com o surgimento deste novo ingrediente ativo (IA), concomitante com o aumento da procura do mesmo para ser usado no tratamento dos bovinos, houve uma grande adesão ao uso desta molécula, o que justifica atualmente as frequentes solicitações de teste da susceptibilidade do fluazuron realizados no IPVDF.

Atualmente, existem muitas empresas que fabricam produtos com esta base pura ou em associações com outros compostos que estão extremamente difundidos no controle do parasito de forma rotineira. Porém, como ocorreu com as demais drogas existentes, a frequência de utilização nos rebanhos bovinos, pressionou a seleção de indivíduos resistentes. A partir de relatos e suspeita de produtores rurais, Reck e colaboradores (2014) relataram o primeiro caso de resistência ao fluazuron,

concomitante com a descoberta de uma cepa com multirresistência a todas as classes de acaricidas existentes no mercado.

Após ser notada a resistência a campo, o trabalho supracitado realizou um experimento com a finalidade de confirmar esta resistência. Foram separados grupos de animais infestados com larvas da cepa multirresistente. Destes animais, dois grupos foram separados onde o primeiro grupo não recebeu nenhum tratamento (controle) e um grupo que recebeu o tratamento com fluazuron comercial na formulação pour-on. Outros dois grupos de animais foram infestados com uma cepa oriunda da unidade experimental da FEPAGRO São Gabriel nunca expostas ao Fluazuron. Da mesma forma um grupo se manteve sem tratamento, e o outro tratado. Para a obtenção dos resultados foram contadas e coletadas teleóginas do lado esquerdo dos animais conforme um protocolo estabelecido por WHARTON & UTECH (1970), e foi avaliado também o sistema reprodutor das fêmeas conforme estabelecido por (HOLDSWORTH et al., 2006).

Após a realização de todas as avaliações, houve uma compilação dos dados e obteve-se os seguintes resultados: o produto se mostrou eficiente no controle da linhagem sensível e resistente na linhagem Jaguar.. A resistência foi confirmada nos testes *in vitro*. Os testes *in vitro* foram realizados através de TIA com (0,05 ppm, 0,5 ppm, 5 ppm, 50 ppm e 500 ppm) de Fluazuron grau técnico. Para a realização do teste foi seguido o protocolo proposto por Graf e colaboradores (1994) com modificações. Adicionalmente, foi realizada alimentação artificial conforme descrita por Pohl e colaboradores (2011), os tratamentos incluíram: sangue, sangue + fluazuron solução (concentrações finais 2,5 ppm, 5 ppm e 10 ppm), e sangue + veículo (0,02% de Triton X-100 em 1% de acetona em desmineralizada água estéril). Os resultados da alimentação artificial confirmaram os resultados do TIA indicando existir uma população resistente.

3.2.1- Aplicações e limitações do teste com Fluazuron em TIA

Por ser um produto atual e de conhecimento comum, alcançou uma grande extensão nas propriedades rurais visando combater o parasito. Além da Elanco, outras empresas consolidaram a fabricação do produto, fazendo com que o mesmo se tornasse amplamente difundido no mercado. Em razão destas questões notou-se que com a ascensão da procura pelos testes de resistência, o fluazuron era um dos

mais solicitadas pelos remetentes de carrapatos. Porém, conforme os testes eram finalizados foi possível verificar que os resultados de eficácia do produto eram cada vez menores, conforme registros existentes e testes em andamento no IPVDF, o Laboratório de Parasitologia da Unipampa, também realizador da TIA com Fluazuron (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, EUA) se iguala e demonstra baixos índices de eficácia.

Com a emissão dos laudos com alto índice de resultados negativos, houve um interesse por parte de algumas empresas que se sentiram prejudicadas e que contestaram os resultados apresentados alegando não haver um teste de diagnóstico de resistência ao fluazuron padronizado.

O processo de execução do TIA para Fluazuron segue o seguinte protocolo adaptado Reck e colaboradores (2014), onde uma parte de fluazuron é diluído em triton-x a 2% em acetona técnica (Merck, Darmstand, Alemanha), a fim de produzir uma solução a 5% com um valor de 50.000 ppm, esta foi diluída em água estéril na proporção de 1:100 a fim de chegar a uma concentração de 0,005% (500ppm) a 0,2% de Triton-x e 1% de acetona.

Para chegar a uma dose discriminatória (DD) e garantir a confiabilidade para o teste, foram realizados testes pareados com diferentes concentrações de fluazuron na mesma população de teleóginas 50 ppm, 5 ppm, 0,5 ppm e 0,05 ppm foram testados nas cepas Jaguar (multirresistente) e POA (sensível). O resultado obtido a partir destas exposições demonstraram que as cepas Jaguar foram resistentes nas doses de 0,05 a 500 ppm, e a cepa POA obteve um resultado de 100% de eficácia de 50 a 500 ppm, tendo em vista que nas concentrações 5 ppm, 0,5 ppm e 0,05 ppm houve alguma porcentagem de eclosão.

Dadas as conclusões finais, determinou-se uma dose discriminatória para a realização de TIA com o princípio ativo de 50 ppm, esta por apresentar uma eficácia de 100% na cepa sensível e ter indivíduos sem alteração nas cepa resistente. Entretanto, dados analisados deixaram explícita a grande diferença entre populações de campo de *R. microplus* frente a exposição ao fluazuron. De fato, apesar dos dados apresentados no trabalho ao descrever o primeiro caso de resistência ao fluazuron indicarem que 50 ppm possa ser utilizado como dose discriminatória (DD), o trabalho não foi realizado com intuito da determinação de uma dose discriminatória para o TIA. Para isso, foi necessária a análise de várias amostras de campo, principalmente aqueles de histórico conhecido. Com a oferta do

teste nos Laboratórios do IPVDF e da UNIPAMPA foi possível juntar uma maior quantidade de dados. Ao mesmo tempo, a investigação de novos casos de resistência ao fluazuron motivou descontentamentos por parte da indústria farmacêutica.

Então, a partir da discrepância de posicionamentos e do teste não ter sido ainda validado em um número grande de populações, os resultados e as provas para a droga foram suspensos dos laudos com os demais produtos acaricidas e passaram a ser realizados apenas para fins de pesquisa. Cabe ressaltar aqui, que a finalidade de um teste com produto técnico utilizando DD é demonstrar a presença de alguma resistência nos indivíduos testados, e não a percentagem de eficácia como os demais produtos testados, não sendo considerado como correspondente aos testes realizados a campo, pois é realizado com produto técnico e não na formulação disponível para aquisição nos centros comerciais. Desde então todas as amostras recebidas estão sendo testadas novamente com diferentes doses na tentativa de validar uma DD ou se há outras formas de análise.

Estão sendo discutidas algumas maneiras de solucionar o problema que vem sendo enfrentado, e dentre todas uma que vem recebendo uma maior aceitação e é a de que devem ser realizados por uma comparação de concentração inibitória (CI_{50}) das populações de campos com as populações resistente e susceptível.

A CI_{50} é a concentração necessária para inibir 50% da eclosão das larvas de fêmeas tratadas, e assim como DL_{50} ou CL_{50} é uma medida de potência usual em toxicologia para que certa substância iniba uma função biológica ou bioquímica específica, ou seja, é uma medida quantitativa que determina quanto de um fármaco necessário para inibir qualquer processo fisiológico em metade da população exposta. Com o valor estimado em ppm de cada uma das cepas é possível identificar uma faixa de valores de concentração que categorize com mais eficiência em um grande grupo de populações existentes. Durante o ECSMV foram realizados diversos testes com diversas concentrações a fim de padronização de uma nova DD e determinação de CI_{50} . A análise desses dados ainda está em andamento no IPVDF e no Laboratório de Parasitologia da UNIPAMPA e os resultados devem permitir a validação de uma nova técnica de diagnóstico a ser oferecida a médicos veterinários e produtores rurais.

Durante a realização do estágio foi possível realizar os testes e avaliar os resultados, acompanhando a manifestação de diversas cepas de campo frente ao

tratamento empregado, a fim de verificar a existência de indivíduos resistentes em 15 populações distintas, totalizando 2400 ensaios.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O desenvolvimento do presente trabalho possibilitou análises relacionadas sanidade animal aplicado à parasitologia, tendo ênfase a resistência do carrapato bovino. Com a experiência obtida durante a execução do ECSMV, ficou evidente o desafio que representa o controle do carrapato bovino.

É notável que a demanda por testes de resistência TIA, TPL, TIL, aumentaram no período do verão e do outono, acreditando-se que as infestações aumentam com a prática de tratamentos errôneos e ineficácia do controle do parasito. Os testes realizados demonstraram que uma grande proporção das propriedades rurais independente do município, possuem multirresistência a acaricidas levando em consideração a ineficácia de mais de uma base química na população de carrapatos testada.

Por levantamentos realizados no instituto anteriormente e os acompanhados no decorrer do estágio se conclui que as populações estão cada vez mais tolerantes as drogas, e consecutivamente com manejos e tratamentos errôneos as infestações aumentam. Porém, mesmo com a emissão de laudos com os resultados existe grande dificuldade de interpretação, sendo necessários mais treinamentos e informativos recorrentes sobre o assunto. Com o surgimento destas dúvidas, novos casos, e debates realizados no interior do laboratório foi possível aprimorar o conhecimento e ter novas experiências.

Neste sentido foi de extrema valia e importância a realização do ECSMV no laboratório de parasitologia do IPVDF, visto que além da troca de informações, e aprendizado obtido, o conhecimento da rotina de um centro de diagnóstico, inovação e de pesquisa que é referência internacional na área de sanidade animal e zoonose.

REFERÊNCIAS

AMARANTE, A. F. T. Controle de endoparasitoses dos ovinos. In: **A produção animal na visão dos brasileiros**. Piracicaba: FEALQ, 2001, p.461-73.

ANDRADE, J. M.; et al. Amitraz – Análise comparativa entre as bulas do fármaco e a literatura consultada. In: **XIII JORNADA DE ENSINO, PESQUISA E EXTENSÃO – JEPEX**, p.3. Recife, PE, 2013.

BRITO, L. G; et al. Diagnóstico de resistência às bases carrapaticidas em populações do carrapato dos bovinos. In: Veríssimo, C. J. **Resistência e Controle do Carrapato-do-boi**. Nova Odessa, SP: Instituto de Zootecnia, 2015, p. 135.

CAMILLO, G. et al. Eficiência in vitro de acaricidas sobre carrapatos de bovinos no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. **Ciência Rural**, v.39, n.2, p.490-495, 2009.

CATTO, J. B.; ANDREOTTI, R.; KOLLER, W. W. Atualização sobre o controle estratégico do carrapato - do- boi. Comunicado Técnico, Campo Grande, MS, **Embrapa Gado de Corte**, v. 123, n 1, p 6, 2010.

CORDOVÉS, C.O. **Carrapato: controle ou erradicação**, Porto Alegre: Guaíba Agropecuária, p. 197, 1997.

CRUZ, G. M.; et al. Desempenho de bezerros da raça Nelore e cruzados desmamados recebendo concentrado em pastagem adubada de *Cynodon dactylon* cv. Coastcross. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Brasília, v.38, n.1, p.139-148, 2009.

DALL'AGNOL B.; et. al.. *Borrelia burgdorferi* sensu lato in *Ixodes longiscutatus* ticks from Brazilian Pampa. **Ticks Tick Borne Disease**. p. 928-932,2017.

DRUMMOND et al. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: Laboratory Tests of Insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, Issue 1, p. 130–133. February 1973,

FAO, 2004. Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants – Guidelines, Module 1 – Ticks: Acaricide Resistance: Diagnosis, Management and Prevention. Food and Agriculture Organization. Animal Production and Health Division. P. 25-77.

FAO, 2017. Disponível em: <http://www.fao.org/brasil/noticias/detail-events/en/c/901168/> . Acessado em 23/05/2019

FARIAS, N. A.; RUAS, J. L.; SANTOS, T. R. B. dos. Análise da eficácia de acaricidas sobre o carrapato *Boophilus microplus*, durante a última década, na região sul do Rio Grande do Sul. **Ciência Rural**, Santa Maria, RS, v. 38, n. 6, p. 1700-1704, set. 2008.

FURLONG, J; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras. **Comunicado Técnico, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**, Embrapa, Juiz de fora, MG, v. 36, n. 7, dez. 2003.

GEORGE, J. E.; POUND, J. M.; DAVEY, R. B. Chemical control of ticks on cattle and the resistance of these parasites to acaricides. **Veterinary Parasitology**. v. 129, p. 353- 366, 2004.

GIRÃO, E. S.; MEDEIROS, L. P.; GIRÃO, R. N. Ocorrência e distribuição estacional de helmintos gastrointestinais de caprinos no município de Teresina, Piauí. **Ciência Rural**, v. 22: p. 197-202, 1992.

GONZALES, J. C. **O controle do carrapato do boi**. 3. ed. Passo Fundo: Universidade de Passo Fundo. p. 128, 2003.

GOOGLE. Google maps. Disponível em:

<https://www.google.com/maps/place/IPVDF++Instituto+de+Pesquisas+Veterin%C3%A1rias+Desid%C3%A9rio+Finamor/@30.0498587,51.3138647,17z/data=!3m1!4b1!4m5!3m4!1s0x95197db479d5f1bd:0x890502ae2cf8c2c0!8m2!3d-30.0498634!4d-51.311676>. Acessado em: 03/04/2019.

GORDON, H. M.; WHITLOCK, H. V. A new technique for counting nematode eggs in sheep faeces. **Journal of Scientific and Industrial Research**. v. 12, p. 50-52, 1939.

GRAF, J.F., et al.; Systemic tick (Ixodidae) control with fluazuron. **Proceedings of Acarology IX**, v.1, Columbus, USA, p. 481–482, 1994.

GRISI, L., et al.; Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v.23, Jaboticabal, BR, 2014.

HOLDSWORTH, P. A., et al. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. **Veterinary Parasitology**, ed. 136, p. 29–43, 2006.

IBGE, Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Produção da pecuária mundial**. 44 ed. Rio de Janeiro, RJ, Brasil, p 14-20, 2016.

IBGE; **Rebanho bovino brasileiro cresce e chega a 212,3 milhões de cabeças de gado**; Disponível em: < <http://www.brasil.gov.br/economia-e-emprego/2015/10/rebanhobovinobrasileiro-cresce-e-chega-a-212-3-milhoes-de-cabecas-de-gado>; 2014>Acesso em: 10 abr. 2019.

KLAFKE, G. A., 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, n.3, p. 386-390, 2006.

KLAFKE, G.M., et al.; Applicability of in vitro bioassays for the diagnosis of ivermectin

resistance in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, ed. 184 (2–4), p. 212–220, 2012.

KLAFKE, G. M. Resistência de *R. (B.) microplus* contra os carrapaticidas. In: PEREIRA, M. C.; LABRUNA.; M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência***. 1^oed. SP: MedVetLivros, 2008, p. 81-105, 2008.

MAPA – **Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento**. Disponível em:<http://www.agricultura.gov.br/animal>. Acessado em março de 2019.

Marcondes, M., Rossi, C.; Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 50 (5), p. 341-352, 2013.

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

PAROLA, P.; RAOULT, D. Ticks and tick-borne bacterial diseases in humans: An emerging infectious threat. **Clinical Infectious Diseases**, v. 32, p. 897-928, 2001.

PEREIRA, M. C.; LABRUNA.; M. B.; SZABÓ, M. P. J.; KLAFKE, G. M. ***Rhipicephalus (Boophilus) microplus: Biologia, Controle e Resistência***. 1^oed. SP: MedVetLivros, 2008, p. 15- 53, 2008.

Perry B.D. & Randolph T.F. 1999. Improving the assessment of the economic impact of parasitic diseases and their control in production animals. **Veterinary Parasitology**, ed.84, p.145-168.

POHL, P.C., et al.; ABC transporter efflux pumps: a defense mechanism against ivermectin in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Int. Journal Parasitology**, ed. 41, p. 1323–1333, 2001.

RECK, J. et al. First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. **Veterinary parasitology**, Eldorado, RS, v. 201, p. 128-136, 2014.

ROBERTS, F. H. S.; O'SULLIVAN, J. P. Methods for egg counts and larval cultures for strongyles infesting the gastrointestinal tract of cattle. **Australian Agriculture Records**, v. 1, p. 99-102, 1950.

SABATINI, G. A. et al.; Tests to determine LC50 and discriminating doses for macrocyclic lactones against the cattle tick, *Boophilus microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 95, n. 1, p. 53-62, 2001.

SANTOS, M. A. T.; AREAS, M. A.; REYES, F. G. R. **Piretróides - Uma visão geral. Alimentos e Nutrição Araraquara**, Araraquara, v.18, n.3, p. 339-349, 2007.

STANEK, G.; STRLE, F. Lyme Borreliosis. **The Lancet**, v. 362, p.1639-1647, 2003.

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

SHAW, R. D.; Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum.—**Bulletin of Entomology Research**. V. 56, p. 389–405, 1966.

WHARTON, R. H., UTECH, K. B. W.; The relation between engorgement and dropping of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Ixodidae) to the assessment of tick numbers on cattle. **Australian Journal of Entomology Society**. 9, p.171–182, 1970.

ANEXO 1 - Certificado de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária realizado no Instituto de pesquisas veterinárias Desidério Finamor.



ATESTADO

Atestamos para os devidos fins que MANOEL ROBERTO POITEVIN DA SILVA FILHO, acadêmico de Medicina Veterinária da Universidade Federal do Pampa (UNIPAMPA), realizou estágio curricular no Laboratório de Parasitologia do Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF), órgão de referência em saúde animal do Governo do Estado do Rio Grande do Sul. O estágio foi realizado no período de 04 de março a 30 de maio de 2019, compreendendo um total de 480 horas, envolvendo treinamento em técnicas de diagnóstico parasitológico de enfermidades de animais e participação em projetos de pesquisa.

Dr. José Reck

Médico veterinário, PhD

Responsável técnico

Laboratório de Referência em Parasitologia

Instituto de Pesquisas Veterinárias Desidério Finamor (IPVDF)

Eldorado do Sul, 30 de maio de 2019.

ANEXO 2 - Certificado de Estágio Curricular Supervisionado em Medicina Veterinária realizado no Laboratório de Parasitologia da UNIPAMPA



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO



ATESTADO

Atesto, para os devidos fins, que Manoel Roberto Poitevin Filho, acadêmico do Curso de Medicina Veterinária, realizou estágio curricular junto ao laboratório de parasitologia no período de 04 de maio março a 30 de maio de 2019, compreendendo um total de 480 horas. As atividades ocorreram dentro deste laboratório e no laboratório de parasitologia do IPVDF em Eldorado do Sul como instituição apoiadora.

Uruguaiana, 30 de maio de 2019.

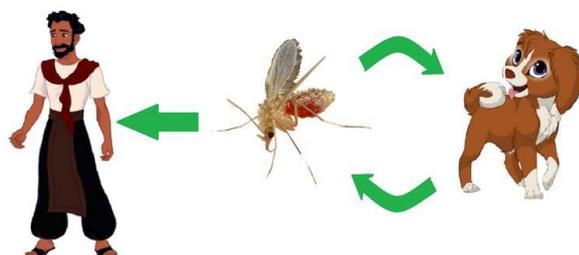
Assinatura manuscrita de Tiago Gallina Corrêa em tinta preta.

Tiago Gallina
Professor Adjunto da Unipampa Uruguaiana

ANEXO 3 – Folheto sobre leishmaniose visceral canina



LEISHMANIOSE VISCERAL



Prevenção e controle:

- Evitar o acúmulo de lixo no pátio
- Usar repelente
- Colocar tela nas portas e janelas
- Usar coleira com repelente nos cães

O cão é o principal reservatório da doença

Ao ser picado por um inseto contaminado, o cão contrai a doença.

E quando o inseto sadio, pica um cão contaminado, este inseto contrai a doença e transmite para outros cães e para o homem.

Causada por um protozoário chamado *Leishmania*

O inseto que transmite a Leishmaniose, (*Lutzomyia longipalpis*) é conhecido como mosquito-palha e se reproduz em matéria orgânica.

Qualquer dúvida:
(51) 3481-3711

