

 MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY	PROCEDIMIENTO	 DILAVE División Laboratorios Veterinarios Dr. Miguel C. Rubino
PR-PAR-01	Determinación de eficacia y poder residual de productos garrapaticidas. Prueba de Establo	Revisión 02

PR-PAR -01

Nombre:	Determinación de eficacia y poder residual de productos garrapaticidas. Prueba de Establo
Fecha edición:	03/2017
Elaborado por:	Ulises Cuore con fecha 6/03/2017
Revisado por:	María A. Solari con fecha 20/03/2017
Aprobado por:	Alvaro Núñez Con fecha 24/03/2017
Motivo modificación:	Adecuación de la prueba a un mayor número de animales, en boxes individuales y tomar la <i>Mediana</i> para determinar la eficacia residual
Documento anexo:	

Documentos relacionados:

No existen relaciones

Descripción:

No hay datos

	PROCEDIMIENTO	
PR-PAR-01	Determinación de eficacia y poder residual de productos garrapaticidas. Prueba de Establo	Revisión 02

1. Alcance de aplicación y objetivo

- De acuerdo a los antecedentes, la disponibilidad de productos garrapaticidas presentan un amplio espectro de comportamiento. (Cuore, 2008)
- El presente procedimiento consiste en describir la técnica empleada para determinar el porcentaje de control de un garrapaticida a ser evaluado durante los 21 días de ciclo parasitario de la garrapata *Rhipicephalus (B) microplus* (eficacia).
- Si el garrapaticida presentado acredita poder residual, se estudiará el efecto sobre larvas infestantes. En caso de productos en base a lactonas macrocíclicas en concentraciones de 3.15% o superior, la eficacia residual deberá cumplir con lo establecido en el decreto 326/2013 del 4 de octubre de 2013.
- Se analizará la reducción en caída de teleoginas, comparando los resultados entre los grupos tratado y testigo, así como la influencia del producto sobre el ciclo reproductivo de aquellos parásitos que sobrevivan en los primeros días posteriores al tratamiento.
- la curva de biodisponibilidad del producto con acción sistémica, será un insumo complementario a los resultados de la prueba biológica. Los diagnósticos estarán a cargo del laboratorio registrante.
- El criterio de aprobación, estará basado en los siguientes indicadores:
 - la eficacia en el ciclo parasitario deberá ser igual o superior al 95%
 - el período de residualidad se determinará restando a la cantidad de días post tratamiento sin caídas de garrapatas los 21 días del ciclo parasitario.
 - los resultados obtenidos deberán confirmar la información técnica (eficacia, residualidad y biodisponibilidad en productos sistémicos) suministrada en el dossier del producto

2. Responsables

Es responsable de la ejecución y supervisión de este ensayo el personal del Departamento de Parasitología, sección de Ectoparásitos del Laboratorio DILAVE “Miguel C. Rubino”.

3. Materiales y equipos

- 3.1 Bovinos (*Bos taurus*) con un peso entre 120 a 250 Kg.
- 3.2 Población de garrapata de referencia sensible (*R. microplus*-cepa Mozo)
- 3.3 Canasto para recolección de garrapatas
- 3.4 Coladores
- 3.5 Papel secante
- 3.6 Cajas de Petri
- 3.7 Etiquetas
- 3.8 Termómetro de máxima y mínima
- 3.9 Cubas para eclosión
- 3.10 Algodón
- 3.11 Espátula
- 3.12 Fuente de luz
- 3.13 Frascos Plásticos

	PROCEDIMIENTO	
PR-PAR-01	Determinación de eficacia y poder residual de productos garrapaticidas. Prueba de Establo	Revisión 02

- 3.14 Probeta 2lt.
- 3.15 Jeringas
- 3.16 Estufa regulada a 27°C y más de 80% de humedad
- 3.17 Balanza de precisión
- 3.18 Balanza para ganado
- 3.19 Freezer (menos 80°C)
- 3.20 Lupa estereoscópica
- 3.21 Planilla
- 3.22 Instalaciones: Boxes de confinamiento, tubo, cepo. Baño inmersión y jaula.
- 3.23 tubos para obtener plasma y o suero
- 3.24 centrífuga refrigerada
- 3.25 tubos para almacenar las muestras de plasma o suero

4. Procedimiento

4.1. Bovinos a utilizar:

Se utilizarán un total de 10 bovinos del mismo sexo, 5 tratados y 5 testigos.

Los bovinos experimentales provendrán del campo de la DILAVE, libres de ectoparásitos y enfermedades infectocontagiosas, sin tratamientos previo con acción ectoparasiticida.

4.2. Instalaciones:

Los grupos experimentales permanecerán separados en boxes techados y con buena ventilación. El piso es de cemento con declive, cubierto por un enrejado de madera para permitir recoger las garrapatas y evitar así el pisoteo.

4.3. Protocolo de ingreso:

Los bovinos que ingresan a la prueba de establo deben estar identificados individualmente (caravanas) y se vacunan contra Carbunclo, Clostridiosis y se los desparasita con Levamisol o Benzimidazol

4.4. Infestación:

A partir de 25 días previos al tratamiento y con una frecuencia de 2 veces por semana, se infestan 10 bovinos raza Hereford con 100 mg de larvas de la cepa Mozo de *Rhipicephalus (B.) microplus* (2000 larvas aproximadamente). La infestación de las larvas se realiza por aplicación dorsal, en caso de ser un producto *pour-on* la infestación se hará en la zona ventral.

En esta etapa los animales pueden ser mantenidos a campo (libre de garrapata) hasta 15 días posteriores a la primera infestación.

Las infestaciones artificiales postratamiento se realizarán con una frecuencia semanal, a razón de 100 mg larvas/animal en los casos que se necesite estudiar la acción sobre larvas infestantes (poder residual) hasta recuperar la primera garrapata ingurgitada de cada animal individualmente.

Las larvas infestantes se aplicarán en la zona ventral del animal, por considerarse una zona de predilección del parásito, evitando el lamido y en caso del *pour on* por ser la zona más distal a la aplicación del producto.

4.5. Formación de grupos:

La semana anterior al tratamiento los animales se alojaron en boxes individuales, registrando la caída de garrapatas durante tres días previos al tratamiento.

El día del tratamiento los animales de prueba son pesados y se formaron lotes pareados por

	PROCEDIMIENTO	
PR-PAR-01	Determinación de eficacia y poder residual de productos garrapaticidas. Prueba de Establo	Revisión 02

peso, uno para el grupo control y el otro para el grupo tratado, posteriormente son ubicados en sus respectivos boxes.

4.6. Tratamiento:

Para poder realizar el tratamiento, durante 3 días previos tanto el grupo control como el grupo a ser tratado deben tener una buena caída de garrapatas teleoginas, preferentemente 50 o más por animal.

El tratamiento se realiza de acuerdo a las especificaciones del fabricante y ante la presencia de un representante de la firma solicitante el cual deberá aplicar el producto en caso de inyectables o *pour-on*.

En caso de *pour-on* o inyectable la dosis aplicada no será por rango de peso sino el cálculo de los mg de producto de acuerdo a los kg de peso vivo. En caso de inmersión los animales permanecerán sumergidos durante 15 segundos, mojando bien la cabeza por lo menos 3 veces.

4.7. Recolección:

Desde el día -3 y durante todo el desarrollo de la prueba, se recogen diariamente las teleoginas caídas en ambos grupos. Se lleva un registro del número de garrapatas caídas clasificadas en cadáveres, chicas y normales, las garrapatas vivas se pesan y se seleccionan 20 en igual proporción (chicas/normales) de cada box las cuales se incuban en estufa a 27° C y 80-90% de humedad para estudiar su comportamiento reproductivo en relación al grupo testigo. Esto se realizará de acuerdo al siguiente procedimiento:

- Registro del número total de ejemplares (excluyendo los ejemplares dañados).
- Registro del peso total, cálculo del promedio.
- Colocar diariamente 20 ejemplares seleccionadas al azar en cajas de Petri plásticas (previamente pesada), con el registro de la fecha de caída, a incubar a 27°C y 80-90% de humedad.
- Luego de 14 días de incubación, desde la caída de la teleogina, se eliminan los cadáveres.
- Registro de postura, se pesa la masa de huevos y se mantiene en estufa (27°C y 80% de humedad) por 25 días.
- Registro de % de eclosión.
- Aplicación de fórmulas para determinar la performance de reproducción.

4.8. Muestreo de plasma/suero:

En productos de acción sistémica, previo al tratamiento y cada 7 días, se obtiene y procesa el plasma/suero.

4.9. Expresión de resultados

Se realizará en estudio de eficacia basado en la caída y en el comportamiento reproductivo en los periodos siguientes.

Ciclo parasitario	Observaciones
1 - 7 días postratamiento	Acción sobre estadios adultos
8 - 14 días postratamiento	Acción sobre ninfas y estadios de muda.
15 - 22 días postratamiento	Acción sobre larvas parasitarias y estados de muda
1 - 22 días postratamiento	Acción global sobre el ciclo parasitario.
Poder residual	
22 – “X” días postratamiento	Acción sobre larvas infestantes Su constatación implica mantener los bovinos en

 MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY	PROCEDIMIENTO	 DILAVE División Laboratorios Veterinarios Dr. Miguel C. Rubino
PR-PAR-01	Determinación de eficacia y poder residual de productos garrapaticidas. Prueba de Establo	Revisión 02

	observación hasta que caiga la primer teleogina posterior a los 21 días del ciclo parasitario pos tratamiento
--	--

4.10. Criterios para la aprobación:

El comportamiento del garrapaticida en la prueba de establo, debe confirmar la información que se brinda por parte de la firma interesada en el dossier del producto, en cuanto a su eficacia, residualidad y biodisponibilidad en productos de acción sistémica. Esta información debe estar complementada con trabajos científicos imparciales que avalen las características del principio activo.

- Ciclo parasitario: El porcentaje de control para la aprobación de un garrapaticida debe ser igual o superior a 95% en los 21 días del ciclo parasitario. En caso de principios activos de interés en la campaña, se permite una flexibilización en que el porcentaje de eficacia medido sobre el ciclo parasitario sea inferior al 95%, pero que presente una eficacia residual que amerite su uso.
- Poder o eficacia residual: Es el período posterior a los 21 días del ciclo parasitario en el cual no se registra caída de teleoginas. Cuando se produzca la caída de las primeras teleoginas, se da por finalizada la prueba de establo. El período residual se fija restando a la cantidad de días post tratamiento sin caídas de garrapatas, los 21 días del ciclo parasitario.
- Frecuencia de aplicación: En caso de utilizar acaricidas que no posean poder residual para la erradicación del *R. microplus*, el criterio es de aplicarlos cada 21 días. Ante las nuevas formulaciones con poder residual, en caso de erradicación, se le restan los 21 días del ciclo parasitario a los efectos de minimizar los riesgos de escape de estadios parasitarios.

De acuerdo a lo anterior, los productos se categorizarán según la siguiente estandarización que establece la frecuencia de aplicación en predios que deben erradicar el *R. microplus*:

- Productos de aplicación cada 21 días sin poder residual, (Ejemplos: baños de inmersión, lactonas macrocíclicas 0,5%, 1%, piretroides sintéticos *pour on*).
- Productos de aplicación cada 35 días, con poder residual mínimo de 35 días posteriores al tratamiento una vez descontado el ciclo parasitario de 21 días (Ejemplo fipronil *pour on* 1%, fluazuron 2,5%).
- Productos de aplicación cada 45 días, con poder residual mínimo de 45 días posteriores al tratamiento una vez descontado el ciclo parasitario de 21 días (Ejemplo lactonas macrocíclicas 3,15%).
Lactonas macrocíclicas con una concentración superior a 3,15% podrán registrarse como garrapaticidas si presentan una ventaja comparativa, a tales efectos la residualidad deberá ser mayor a 65 días con un período de espera máximo para la faena de 130 días de acuerdo a lo establecido en el decreto 326/2013 del 4 de octubre de 2013.
- Para determinar los días de eficacia residual, para garrapaticidas que estén formulados con esta finalidad, se tomará el valor de la *mediana* de la prueba de establo de los 5 animales tratados, debiendo cumplir con un mínimo de 35 o 45 días para los principios activos de los puntos b y c, respectivamente.

Los productos comerciales deben presentar en su etiqueta la frecuencia en la cual deben ser usados en casos de erradicación. Esta información la determina la autoridad sanitaria en base al resultado de la prueba oficial de eficacia.

Productos cuya aplicación sea de forma epicutánea (*pour on*, caravanas) considerados novedosos (nuevas moléculas, combinación de principios activos) deberán complementar el registro oficial con una prueba de campo de acuerdo a lo establecido en el procedimiento

 MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY	PROCEDIMIENTO	 DILAVE División Laboratorios Veterinarios Dr. Miguel C. Rubino
PR-PAR-01	Determinación de eficacia y poder residual de productos garrapaticidas. Prueba de Establo	Revisión 02

técnico “Estudio de eficacia a campo de los garrapaticidas de aplicación y/o distribución *epicutánea*” protocolo Departamento de Parasitología PR-PAR-03.

En caso de presentarse una nueva formulación o principio activo, cuya frecuencia de aplicación no esté contemplada en esta categorización, se podrá ajustar la misma de acuerdo a los resultados obtenidos.

4.11. Calculos:

Con los datos obtenidos se aplican las siguientes fórmulas para evaluar la eficacia del producto.

Porcentaje de sobrevivencia de hembras ingurgitadas (P.S.) Roulston, W. J, y col 1968

$$P.S. = \frac{A \times D}{B \times C} \times 100$$

A= Promedio de teleoginas caídas de los testigos, por vacuno y por día durante los tres días pre tratamiento.

B= Promedio de teleoginas caídas de los tratados, por vacuno y por día durante los tres días pre tratamiento.

C= Promedio de teleoginas caídas en un día determinado de los testigos.

D= Promedio de teleoginas caídas en un día determinado de los tratados.

Reproducción estimada (R.E.) Índice de reproducción (I.R.) Porcentaje de control (%C)
Drummond, R.O. 1967

$$R.E. = \frac{\text{Gramos de huevos}}{\text{Peso total de hembras incubadas}} \times \% \text{ de Eclosión}$$

Índice de reproducción (I.R.).

$$I.R. = \frac{\text{Número de teleoginas caída}}{\text{Eclosión}} \times \frac{\text{grs. de huevos}}{\text{Número teleoginas incubadas}} \times 20.000 \times \% \text{ de}$$

Porcentaje de control (% C).

$$\% C = \frac{\sum I.R. \text{ de testigos} - \sum I.R. \text{ de tratados}}{\sum I.R. \text{ de testigos}} \times 100$$

4.12. Análisis estadístico

	PROCEDIMIENTO	
PR-PAR-01	Determinación de eficacia y poder residual de productos garrapaticidas. Prueba de Establo	Revisión 02

4.12.1 Análisis estadísticos de las diferencias de IR.

Con los resultados de IR (correspondientes a los días de caída posterior al tratamiento, se construirán dos tablas con las diferencias de IR, para cada par de animales (tratado y testigo). A los datos se les aplicará un test de *Student* para determinar si la media de las diferencias es distinta de cero.

Confirmado que la media de las diferencias no es cero, se construirá un intervalo de confianza al 95%.

4.12.2 Análisis estadísticos de los porcentajes de control (%C).

Con los (%C) para los cinco pares de animales (tratado y testigo), se estimará la media y se construirá un intervalo de confianza al 95%.

4.12.3 El poder residual se estimará con la mediana de los cinco bovinos tratados de acuerdo a lo establecido en criterios de aprobación (4.10).

5. Referencias:

Cuore, U.; Cardozo, H.; Trelles, A.; Nari, A. & Solari, M.A. 2008. Características de los garrapaticidas utilizados en Uruguay. Eficacia y poder residual. *Veterinaria* (Montevideo) 43 (169) 15-24.

Drummond, R.O., Graham, O.H., Ernest, S.E. & Trevino, J.L. (1967) Evaluation of insecticides for the control of *Boophilus annulatus* (Say) and *Boophilus microplus* (Canestrini) [Acarina: Ixodidae] on cattle, pp 493-498. In: Proc. 2nd Int. Congr. Acarol., 652 pp.

Roulston, W.J., Wilson, J. T. (1964) Chemical control of the cattle *Boophilus microplus* (can) Bulletin of Entomology 55: 617-635.

Roulston, W. J. ; Stone, B.F.; Wilson, J.T. & White, L.I. (1968) Chemical control of an organophosphorous and carbamate resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) from Queensland. Bull. Ent. Res. 58, 379-392.

REGISTRO: Se lleva registro diario de los parámetros antes mencionados. Se adjunta planilla.

NOTA: La exigencia de los estudios de biodisponibilidad, hasta que no estén disponibles en el laboratorio oficial no revisten carácter obligatorio

 MINISTERIO DE GANADERÍA AGRICULTURA Y PESCA REPÚBLICA ORIENTAL DEL URUGUAY	PROCEDIMIENTO	 DILAVE División Laboratorios Veterinarios Dr. Miguel C. Rubino
PR-PAR-01	Determinación de eficacia y poder residual de productos garrapaticidas. Prueba de Establo	Revisión 02

PRUEBA DE EFICACIA A ESTABLO

Laboratorio:

Producto:

Fecha:

GRUPO TESTIGO Caravana:

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
DÍA	FECHA	HEMBRAS CAIDAS					— X	PESO TOTAL HEMBRAS CAIDAS	— X	HEMBRAS INCUBADAS NOR/CHICA	PESO HEMBRAS INCUBADAS	GRAMOS	— X	%	VALOR A	VALOR C	R.E	I.R
		CADAVERES	CHICAS	NORMALES	TOTALES	TOT.SIN CADAV.	HEM. CAIDAS	CAIDAS	PESO HEM.	HEM. CAIDAS	CAIDAS	HUEVOS	Gr. HUEVOS	ECLOSION				
-3																		
-2																		
-1																		
1																		
2																		
3																		
4																		
5																		
6																		
7																		
8																		
9																		
10																		
11																		
12																		
13																		
14																		
15																		
16																		
17																		
18																		
19																		
20																		
21																		
22																		
23																		
24																		
25																		
26																		
27																		
28																		
29																		
30																		
31																		

IR	día 1+7	día 8+14	día 15+22	día 1+22