

PECUÁRIA DE LEITE NO BRASIL

Cenários e avanços tecnológicos

Duarte Vilela
Reinaldo de Paula Ferreira
Elizabeth Nogueira Fernandes
Fabrício Vieira Juntoli

Editores Técnicos

The logo for Embrapa, featuring the word "Embrapa" in a blue, sans-serif font. The letter "a" is stylized with a green leaf-like shape integrated into its bottom curve. The logo is positioned at the bottom center of the page, above a splash of white milk.

Embrapa

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

PECUÁRIA DE LEITE NO BRASIL

Cenários e avanços tecnológicos

*Duarte Vilela
Reinaldo de Paula Ferreira
Elizabeth Nogueira Fernandes
Fabrício Vieira Juntolli*

Editores Técnicos

Embrapa
Brasília, DF
2016

Exemplares desta publicação podem ser adquiridos na:

Embrapa Pecuária Sudeste
Rod. Washington Luiz, km 234,
Caixa Postal 339
CEP 13560-970 São Carlos, SP
Fone: (16) 3411-5600
Fax: (16) 33615754
www.embrapa.br
www.embrapa.br/fale-conosco/sac

Unidade responsável pelo conteúdo
Embrapa Pecuária Sudeste

Comitê Local de Publicações

Presidente
Alexandre Berndt

Secretária-executiva
Simone Cristina Méo Niciura

Membros
Emilia Maria Pulcinelli Camarnado
Maria Cristina Campanelli Brito
Milena Ambrosio Telles
Mara Angélica Pedrochi

Embrapa Informação Tecnológica
Parque Estação Biológica (PqEB)
Av. W3 Norte (final)
70770-901 Brasília, DF
Fone: (61) 3448-4236
Fax: (61) 3448-2494
www.embrapa.br/livraria
livraria@embrapa.br

Unidade responsável pela edição
Embrapa Informação Tecnológica

Coordenação editorial
Selma Lúcia Lira Beltrão
Lucilene Maria de Andrade
Nilda Maria da Cunha Sette

Normalização bibliográfica
Iara Del Fiaco Rocha
Mara Angélica Pedrochi

Projeto gráfico
Carlos Eduardo Felice Barbeiro

Capa
Paula Cristina Rodrigues Franco

1ª edição
1ª impressão (2016): 2.000 exemplares

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

Pecuária de leite no Brasil : cenários e avanços tecnológicos / Duarte Vilela ...
[et al.], editores técnicos. – Brasília, DF : Embrapa, 2016.
435 p. : il. color. ; 18,5 cm x 25,5 cm.

ISBN 978-85-7035-644-4

1. Pecuária leiteira. 2. Forrageiras e pastagens. 3. Inovações tecnológicas.
4. Transferência de tecnologia. I. Vilela, Duarte. II. Ferreira, Reinaldo de Paula.
III. Fernandes, Elizabeth Nogueira. IV. Juntolli, Fabrício Vieira. V. Embrapa
Pecuária Sudeste.

CDD 636.2142

© Embrapa, 2016

Inovações tecnológicas em sanidade de bovinos leiteiros

Márcia Cristina de Sena Oliveira | Ana Carolina de Souza Chagas | Lea Chapaval | Luiz Francisco Zafalon | Luciana Gatto Brito

INTRODUÇÃO

Várias doenças podem produzir mortalidade e morbidade nos bovinos, reduzindo a produtividade dos rebanhos leiteiros e causando perdas econômicas substanciais. As doenças da produção, tais como a mastite e algumas parasitoses, muitas vezes não resultam na morte dos animais, mas diminuem a quantidade e a qualidade do leite produzido, a fertilidade, a idade para início da reprodução e a conversão alimentar. A produção leiteira em pequena escala nos países em desenvolvimento está sujeita a muitos riscos de doença, porque os pecuaristas muitas vezes possuem conhecimento limitado sobre a prevenção de doenças, gestão e controle dos rebanhos. Além disso, existe ainda pouca disponibilidade ou adequação dos serviços de saúde animal. As diferentes raças de bovinos leiteiros apresentam diferentes graus de adaptação ao ambiente tropical, dependendo de suas características físicas e fisiológicas e do tipo de criação. Os bovinos criados em sistemas intensivos de produção de leite são mais expostos a agentes de doenças transmissíveis, enquanto aqueles criados em sistemas extensivos são mais propensos a infecções ou infestações parasitárias.

CONSIDERAÇÕES SOBRE A MASTITE BOVINA: DIAGNÓSTICO E CONTROLE

MÉTODOS DE DIAGNÓSTICO

A mastite é uma inflamação da glândula mamária, geralmente de origem infecciosa, que pode ocorrer na forma clínica ou subclínica. O controle e tratamento da mastite são grandes desafios para os países produtores de leite por ser uma doença endêmica que afeta diretamente a glândula mamária, reduzindo a quantidade e comprometendo a qualidade do leite. Trabalhos realizados nos Estados Unidos da América, Reino Unido e Brasil relataram elevadas perdas econômicas em razão dessa enfermidade.

A correta identificação das espécies bacterianas que causam a mastite bovina é de importância não apenas no aspecto clínico, mas também no biotecnológico, epidemiológico e em estudos

ambientais. Esses conhecimentos podem ajudar no desenvolvimento de estratégias preventivas, indicando formas de manejo e tratamento do animal durante a lactação, descarte ou servindo de base para a administração do tratamento seletivo no período seco. O alto investimento no tratamento da mastite e o risco de recorrer a terapias inadequadas, ou ainda, desenvolver resistência bacteriana, tornam o diagnóstico preciso necessário.

Existem diversos métodos de diagnóstico das mastites bovinas, tanto fenotípicos como genotípicos, que possibilitam discriminar os microrganismos em gêneros, espécies e estirpes. As análises fenotípicas dependem da expressão de fatores biológicos da célula tais como, produção de enzimas, utilização de nutrientes, produtos finais do metabolismo e susceptibilidade a agentes químicos. Dessas abordagens fisiológicas, poucas são úteis na caracterização de amostras bacterianas, porque as mesmas dependem da expressão de genes regulados de acordo com as condições do meio ambiente, o que torna o uso dessas técnicas limitado. A cultura bacteriana tem grande valor quando aplicada para focar um programa de controle específico, detectar a presença de um patógeno novo ou emergente, avaliar a eficiência do tratamento ou estabelecer padrões de suscetibilidade para auxiliar no desenvolvimento de uma estratégia de tratamento racional. Porém, o sucesso do programa de cultura varia dependendo do tipo de organismo, metodologia de coleta de amostra e procedimentos laboratoriais. As análises genotípicas, por outro lado, detectam variações nas sequências de DNA que tendem a ser bastante estáveis por longos períodos e menos afetadas por condições ambientais. Essas metodologias permitem a identificação acurada de subtipos bacterianos, fontes de infecção e transmissão, bem como o reconhecimento de tipos virulentos e o monitoramento de programas de vacinação.

As células somáticas são as células de defesa do animal originadas do sangue que migram para o úbere e também as células de descamação da glândula mamária. Quando bactérias ou outros tipos de patógenos invadem o úbere de uma vaca, ocorre de imediato uma resposta inflamatória a esta invasão. As células de defesa do sangue são transportadas para dentro da glândula mamária com o objetivo de destruir as bactérias. Com isso, a consequência direta é o aumento do número destas células no leite, ou seja, a elevação da contagem de células somáticas (CCS). Há muitos anos o *California Mastitis Test* (CMT) vem sendo usado como um método para detecção de mastite subclínica em vacas. É um teste rápido e simples que estima a CCS no leite de amostras individuais ou compostas dos quartos mamários de um animal. A CCS eletrônica é um teste mais preciso quando comparado ao CMT, por expressar os resultados de forma quantitativa (número exato de células), enquanto o CMT expressa os resultados de forma qualitativa (resultados divididos por categoria e variação de acordo com a pessoa que está fazendo e interpretando o teste). Entretanto, muitas vezes os resultados de CCS não são obtidos de forma rápida e algumas decisões nas propriedades leiteiras devem ser tomadas de forma imediata. Nesses casos, o CMT é uma ferramenta importante.

Estudos compararam algumas técnicas tradicionais, como as baseadas na detecção de células no leite, com outras mais recentes, como a condutividade elétrica, visando a triagem de casos da doença. Porém, os resultados relacionados com a sensibilidade diagnóstica nem sempre são adequados (FOSGATE et al., 2013). Técnicas analíticas podem ser usadas para detecção da mastite por meio do

desenvolvimento de sistemas multissensoriais. Existem relatos avaliando o sistema de “língua eletrônica” baseado em sensores químicos potenciométricos (MOTTRAM et al., 2007).

A detecção de alterações na glândula mamária antes do agravamento de casos da doença é fundamental para a redução de prejuízos causados aos produtores. A proteômica pode ser utilizada para a identificação de proteínas na glândula mamária com mastite, presentes em maior escala que em glândulas sadias. Informações obtidas por meio destas técnicas podem ser aplicadas na descoberta de novos alvos terapêuticos e na pesquisa de novos biomarcadores diagnósticos, porém o uso prático desses novos biomarcadores é um desafio (VIGUIER et al., 2009).

Nos últimos 25 anos, métodos para detecção rápida e para a correta identificação de agentes patogênicos têm sido desenvolvidos para testes clínicos laboratoriais, para a indústria alimentar e para o monitoramento ambiental. Até agora, os métodos de detecção rápidos e bem estudados tais como o *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) e o imunoensaio de fluxo lateral (IFL) reduziram o tempo do ensaio para 10 a 24 horas e a reação em cadeia da polimerase (PCR) para 4 a 6 horas, com limites de detecção que variam entre 10^2 UFC mL⁻¹ a 10^6 UFC mL⁻¹. Entretanto, o custo elevado e a infraestrutura exigida para o funcionamento apropriado desses testes limitaram suas aplicações em larga escala, especialmente em países em vias de desenvolvimento. Nos últimos anos, pesquisas intensivas foram empreendidas para descentralizar tais testes com boa sensibilidade e seletividade, bem como de operacionalização rápida e fácil. A detecção baseada em reconhecimento biológico, conhecida como *biosensing*, consiste em instrumentos analíticos com uma biomolécula com uma superfície reativa na proximidade a um transdutor que converte a ligação de um analito à biomolécula em um sinal mensurável.

Uma plataforma *biosensing* ideal deve cumprir as exigências de miniaturização, rentabilidade e habilidade para a detecção simultânea de analitos múltiplos. O principal foco da pesquisa em tecnologia de *biosensing* está em testes tipo *point of care* (POCT) ou teste laboratorial portátil (TLP). O princípio fundamental do TLP é fornecer resultados mais rapidamente, executando o procedimento de teste em proximidade com o paciente. Além disso, os pacientes podem ser tratados para obtenção de resultados mais precisos, uma vez que os agentes patogênicos foram identificados. A maioria dos imunoensaios do TLP usa técnicas de fluxo lateral (IFL), métodos eletroquímicos, ou versões miniaturizadas dos métodos já usados nos analisadores do laboratório. Tiras de papel imunocromatográficas que unem a cromatografia com imunoensaios convencionais são chamados testes de uma etapa, de baixo custo e rápidos, e facilitam a identificação de vários bioanalitos. Esses testes têm sido desenvolvidos para a detecção qualitativa ou semiquantitativa específica de antígenos, anticorpos, haptenos, tais como resíduos de droga e mesmo oligonucleotídeos através de visualização colorimétrica.

CONTROLE DA MASTITE BOVINA

O rápido e correto diagnóstico da mastite é fundamental para o estabelecimento de estratégias para o seu controle. O conhecimento do tipo de micro-organismo que causa a doença é relevante para a tomada de decisões sobre o tipo de conduta a ser seguida, assim como é de

importância para o reconhecimento e correção das possíveis falhas no manejo dos animais antes, durante e depois da ordenha.

As rotinas de manejo relacionadas com a obtenção de um leite de ótima qualidade a ser enviado ao processamento pela indústria ou pela própria fazenda leiteira são amplamente conhecidas. Cuidados devem ser tomados com relação à higiene do ambiente e o bem-estar animal desde antes da entrada dos animais no local de ordenha até o momento posterior à ordenha, de modo a impedir que micro-organismos invadam a glândula mamária caso o animal se deite em ambientes contaminados.

Durante a ordenha, o manejo deve ocorrer de modo a proporcionar um tempo adequado para a pré-ordenha, que não ultrapasse demasiadamente o limite de um minuto desde a entrada da vaca até o acoplamento das teteiras, visando o aproveitamento da liberação da ocitocina na corrente sanguínea. Antes da colocação das teteiras nos animais, a antissepsia dos tetos pré-ordenha deve ocorrer de maneira que possibilite o contato do produto antisséptico pelo tempo mínimo necessário para inativação das principais bactérias que possam estar presentes. O uso da água para lavagem dos tetos antes da antissepsia pré-ordenha deve ser permitido somente se os tetos se encontrarem com sujeiras visíveis. Quando os tetos se encontram sem sujeira aparente, a ação do higienizante durante a antissepsia antes da retirada do leite é suficiente dentro da rotina da ordenha, evitando riscos de se carrear sujeiras a partir do úbere em direção aos tetos caso a lavagem seja mal efetuada. Em muitas propriedades também pode haver ausência de controle da qualidade da água utilizada para a lavagem dos tetos, tornando-a um meio de transmissão de micro-organismos. Durante a ordenha, os ordenhadores devem estar atentos para evitar a sobre ordenha das vacas que, caso ocorra, aumenta a possibilidade de ocorrência de lesões nos tetos e, conseqüentemente, o aparecimento de casos de mastite. Depois da ordenha, a antissepsia dos tetos deve novamente ocorrer com produtos próprios como, por exemplo, aqueles à base de iodo.

Estes são princípios básicos de ordenha que devem ser seguidos, em conjunto com a regulação adequada do equipamento de ordenha, a correta higiene dos ordenhadores e a manutenção de água de boa qualidade que entrará em contato com as vacas. Essas ações, quando feitas de maneira não preconizada ou mesmo a ausência delas, podem fazer com que a mastite evolua para casos clínicos que são visíveis ao produtor de leite, ou acarrete a elevação da CCS no leite de conjunto da propriedade. Atualmente, a CCS é uma das maneiras de se aferir a qualidade do produto e um dos quesitos utilizados pelos laticínios não só para a efetivação do pagamento do leite por qualidade como também para a tomada de decisão sobre aceitação ou recusa do leite daquela propriedade. O leite com alta CCS está relacionado com a alta frequência de casos de mastite subclínica, que apesar de não serem visíveis ao produtor, ocasionam os maiores prejuízos financeiros.

Dentre as principais formas de tratamento existentes para o combate da mastite em vacas leiteiras, destaca-se o tratamento alopático feito com produtos antimicrobianos. Ele é amplamente usado nas propriedades leiteiras, apesar de muitas vezes acontecer sem o acompanhamento técnico necessário. Ao final da lactação, rotineiramente, preconiza-se o uso de antimicrobianos na secagem das vacas, estando elas com ou sem mastite. O uso da terapia da vaca seca somente em animais

reconhecidamente infectados também poderá ser utilizado, entretanto exige investimentos por parte do produtor em exames diagnósticos para detecção do agente que causa a mastite e para testar a sensibilidade antimicrobiana do agente ao produto a ser usado na terapia. Cresce em níveis mundiais a preocupação com o uso indiscriminado de antibióticos em animais de produção e a rotina de tratar todos os animais à secagem poderá ser uma prática de manejo em desuso no futuro.

Durante a lactação, o tratamento é realizado substancialmente nos casos clínicos da doença. As informações a respeito dos fatores de risco para a mastite clínica são escassas e, segundo Oliveira et al. (2015a), o seu conhecimento é útil para a construção de medidas de controle. Esses autores investigaram oito rebanhos leiteiros em Minas Gerais por meio de um estudo retrospectivo longitudinal durante 65 meses e verificaram que o número de lactações, a raça, as contagens de células em meses anteriores, a época do ano e os casos anteriores de mastite clínica foram fatores que influenciaram a ocorrência de novos casos clínicos.

O uso do tratamento com antibióticos em casos de mastite subclínica na lactação deve ser feito em casos especiais, com decisão conjunta entre produtores e técnicos especializados, principalmente quando o agente etiológico for sensível a esse tipo de tratamento e/ou o produtor estiver com problemas perante o estabelecimento processador devido à baixa qualidade de seu leite por apresentar elevada CCS. Assim, as vantagens financeiras desse tipo de tratamento deverão ser consideradas.

Mesmo com agentes de difícil controle como o *Staphylococcus aureus*, condutas poderão ser aplicadas na lactação, como o uso da “terapia estendida”, ou seja, a utilização por 5 a 8 dias de produtos antimicrobianos, período superior ao recomendado normalmente para casos clínicos. O sucesso do tratamento sempre deverá ser testado por meio de informações como a cura bacteriológica, a redução da CCS e a manutenção do animal sadio no restante da lactação, além da ausência de resíduos no leite depois do tratamento. Também deverão ser considerados a capacidade de produção da vaca, a sua idade e o estágio de lactação em que ela se encontra (BARKEMA et al., 2006). Algumas vezes, torna-se vantajoso para produtor antecipar a secagem do animal e tratá-lo com antimicrobianos próprios para animais secos, que apresentam um período de liberação na glândula mamária superior aos antimicrobianos utilizados para a lactação.

O tratamento da mastite, seja de casos clínicos ou subclínicos, deveria sempre ser feito depois da identificação do micro-organismo causador da doença, pois a eficácia da terapia antimicrobiana depende do agente causal da doença. Entretanto, nem sempre o diagnóstico é rápido ou possível de ser realizado, principalmente quando a vaca está acometida clinicamente e a intervenção técnica é necessária rapidamente.

A glândula mamária bovina é um local de difícil ação para os antimicrobianos em virtude do leite apresentar uma composição que muitas vezes prejudica a ação do medicamento. Além disso, nem sempre o antimicrobiano indicado para determinada bactéria é eficaz contra outros tipos de micro-organismos (HONKANEN-BUZALSKI; PYORALA, 2007). Nesse sentido, estudos adicionais relacionados com técnicas que aumentem a efetividade antimicrobiana no interior da glândula mamária, como a nanoencapsulação dos princípios ativos, serão muito úteis para colaborar com

informações para o controle da doença. De qualquer forma, deve-se sempre atentar para a necessidade de obediência aos períodos de carência registrados na bula do produto, durante os quais o leite é considerado impróprio para o consumo humano, devendo ser descartado.

Muitos métodos alternativos são estudados para o tratamento e controle da mastite, de forma a impedir a presença de resíduos de antibióticos no leite ou mesmo pela necessidade de cura da doença não proporcionada pela terapia convencional. Existem, por exemplo, formas de tratamento da mastite subclínica com o uso de substâncias antimicrobianas como a nisina, a lisozima e a utilização da medicina tradicional chinesa. A nisina é um polipeptídeo que pode inibir bactérias gram-positivas. Ervas tradicionais chinesas também podem ser usadas para controlar formas agudas da mastite e, até mesmo, a mastite subclínica (WU; HU, 2007).

Esses métodos alternativos são úteis em propriedades leiteiras que utilizam a produção orgânica do leite, onde o uso de antibióticos convencionais é aceito somente em casos excepcionais. Como exemplo, a qualidade do leite aferida por meio de quesitos relacionados com a presença ou ausência de mastite em propriedades orgânicas parece ser similar à de propriedades não orgânicas, quando consideradas as contagens celulares no leite individual dos animais e a prevalência de bactérias (MULLEN, et al., 2013).

Mais estudos de caráter científico devem ser conduzidos com relação ao controle da mastite por formas não alopáticas, como a homeopatia, por exemplo. Segundo os princípios homeopáticos, as vacas não necessariamente responderão ao tratamento com redução das contagens celulares no leite, às vezes, pelo contrário, poderá haver um aumento dessas células na dependência do período de tempo em que os medicamentos serão oferecidos aos animais. Assim, torna-se questionável o uso de um tipo de tratamento que aumenta a contagem de células somáticas do leite em regiões onde os laticínios pagam pela qualidade, desde que o lucro seja visado pelo produtor orgânico. Talvez, nessas propriedades, uma investigação mais rigorosa dos quadros infecciosos de mastite possa ser feita, a fim de não prejudicar os produtores perante os esquemas de pagamento empregados pelos laticínios.

A vacinação é uma das ferramentas que pode ser utilizada para o controle da mastite. Porém, o ato de vacinar os animais contra a doença não parece ter efeitos positivos quando a vacinação é usada como única medida de controle dentro da propriedade. Estudos demonstram que vacas não vacinadas não apresentaram diferença na ocorrência de casos clínicos quando comparadas com animais vacinados, nem a CCS variou significativamente entre os grupos vacinado e não vacinado. A severidade dos casos clínicos apresentou redução quando os animais foram vacinados, o que pode ter influenciado a maior produção de leite e de sólidos no leite (BRADLEY et al., 2015). Em outro estudo, a vacinação reduziu a proporção de micro-organismos, porém, devido a questões metodológicas do experimento, os autores citam ser possível que suas estimativas de eficácia da vacina possam ter sido superestimadas quando comparadas com a eficácia da vacina em condições de campo. A eficácia vacinal pode variar de acordo com as práticas de manejo em cada propriedade, contudo, alerta-se que a vacinação necessita ser combinada com excelentes procedimentos de ordenha, descarte de vacas reconhecidamente infectadas que transmitam micro-organismos a outras vacas e outros procedimentos que reduzam a incidência e a duração da infecção (SCHUKKEN et al., 2014).

INOVAÇÕES NAS TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO E MONITORAMENTO DAS PRINCIPAIS PARASIToses QUE AFETAM O GADO LEITEIRO

Nas condições tropicais brasileiras, um dos principais parasitas que afetam os bovinos leiteiros são os carrapatos da espécie *Rhipicephalus microplus*. Esses artrópodes causam prejuízos da ordem de milhões de dólares anuais aos pecuaristas no Brasil, em razão da intensa espoliação produzida pelo hematofagismo, transmissão de agentes patogênicos, gastos com acaricidas e medicamentos veterinários (GRISI et al., 2014). Além disso, podem ocorrer problemas de saúde pública e restrições comerciais por conta da presença de resíduos de fármacos no leite e derivados. Entre os agentes patogênicos transmitidos por *R. microplus*, destaca-se os protozoários hemoparasitas *Babesia bovis* e *Babesia bigemina* e a bactéria *Anaplasma marginale*.

As infestações por carrapatos são combatidas principalmente através do uso sistemático de acaricidas, o que tem determinado a seleção de populações resistentes aos princípios químicos usados (FURLONG et al., 2004). Os métodos estratégicos de controle desse parasita tornaram o processo mais racional, porém, poucos produtores os usam de modo eficiente. A resistência aos princípios químicos disponíveis se desenvolveu de forma alarmante, levando à necessidade de se adequar melhor o uso desses acaricidas.

Estudos desenvolvidos em diferentes populações de *R. microplus* demonstram uma grande associação entre diversos fatores fenotípicos analisados, tais como concentrações letais (CL) e fatores de resistência (FR), e a frequência de mutações específicas. Como a detecção da resistência em populações de carrapatos é uma ferramenta importante na preservação das bases químicas ainda disponíveis, a procura por novos métodos de diagnóstico tanto fenotípico como genotípico se tornou prioridade.

Os métodos de diagnóstico da resistência fenotípica aos pesticidas nas populações de carrapatos devem obedecer a certos preceitos definidos pela FAO (2004): devem ser de fácil reprodução, ter baixo custo e ser capazes de detectar a resistência precoce a todos os princípios químicos em uso, de forma rápida. Os testes que detectam a resistência fenotípica aos pesticidas usam fêmeas adultas ou larvas de carrapatos. O chamado teste de imersão de fêmeas adultas (TIA), que foi originalmente descrito por Drummond et al. (1973), é o mais usado no Brasil. Porém, o teste do pacote com larvas (LPT) é considerado pela FAO como o mais eficiente para detectar a resistência, tendo o inconveniente de ser mais demorado (cerca de 6 semanas). Nesse teste, larvas produzidas em laboratório a partir de fêmeas adultas são expostas a papéis de filtro impregnados com as diferentes bases acaricidas a serem testadas. A leitura é feita após 24 horas em condições controladas de temperatura e umidade, sendo contadas todas as larvas mortas e vivas.

Os principais mecanismos de resistência aos pesticidas já identificados em vários artrópodes são: a redução da penetração de moléculas pesticidas na cutícula do parasita, o aumento da expressão de enzimas envolvidas em processos de detoxificação e a insensibilização de receptores do sistema

nervoso dos ácaros (SCOTT, 1995). Esses mecanismos são usados como guias na identificação de marcadores moleculares que facilitem o rastreamento das populações resistentes, já que resistência a pesticidas é um fenômeno de origem genética. Indivíduos mutantes que sobrevivem a altas concentrações desses compostos transferem as características de sobrevivência a sua progênie por meio de mutações genéticas.

Em levantamento feito por Mendes et al. (2013), foi verificado que o controle dos carrapatos nos rebanhos brasileiros têm sido feito principalmente com acaricidas à base de cipermetrinas, deltametrinas e, mais recentemente, a associação de cipermetrinas e organofosforados. Assim, serão abordados nesse capítulo os métodos de diagnóstico relativos a esses dois grupos de inseticidas.

Os piretróides são os inseticidas mais usados em todo o mundo e assim a resistência a esse princípio já foi assinalada em diferentes espécies de artrópodes. Esses compostos sintéticos são derivados de neurotoxinas naturais de plantas que atuam ligando-se às proteínas dos canais de sódio, localizados nas membranas dos neurônios dos artrópodes, impedindo seu fechamento e provocando descargas neurais repetitivas (SODERLUNG; BLOOMQUIST, 1989). A abertura permanente dos canais de sódio provoca o bloqueio da transmissão dos impulsos nervosos e rápida ataxia, efeito conhecido como *knockdown*. Assim, a insensibilidade do sistema nervoso dos artrópodes originária do uso intensivo de piretróides ficou conhecida como resistência tipo KDR (*knockdown resistance*). Essa insensibilidade confere resistência também ao diclorodifeniltricloroetano (DDT) e seus análogos (SCOTT, 1995). Duas mutações no canal do sódio em mosca-dos-chifres com altos níveis de resistência à cipermetrina foram descritas por Guerrero et al. (1997): a substituição da leucina por fenilalanina, que foi associada à resistência do tipo KDR e a de metionina por treonina, que foi associada à resistência denominada super-KDR (s-KDR). Essa última mutação foi identificada apenas em indivíduos homocigotos resistentes para KDR, em populações com altos FR aos pesticidas piretróides. Analogamente, He et al. (1999) identificaram uma mutação pontual no segmento S6 do domínio III do gene do canal de sódio em populações de *R. microplus* muito resistentes aos piretróides e ao DDT. Jonsson et al. (2010), na Austrália, identificaram uma mutação no *linker* do domínio S4-S5 do canal do sódio, onde o aminoácido glicina foi substituído por valina em populações de *R. microplus* resistentes a flumetrina.

Um teste para identificação da mutação que confere resistência aos piretróides no carrapato bovino foi desenvolvido por Guerrero et al. (2001). A mutação produz a substituição do aminoácido fenilalanina por isoleucina no segmento S6 da transmembrana do domínio III do canal de sódio em indivíduos com o genótipo resistente. Este teste (Figura 1) torna possível a genotipagem das larvas de carrapato como homocigotas sensíveis (SS), heterocigotas (SR) e homocigotas resistentes (RR) e foi utilizado para avaliar várias populações de carrapatos no Brasil.

Andreotti et al. (2011) não encontraram mutação em três populações de carrapatos resistentes aos piretróides colhidas no estado de Mato Grosso do Sul. No estado de Minas Gerais, Faza et al. (2013) estudaram 587 populações de carrapatos e concluíram que 97,44% delas eram resistentes e 91% dos indivíduos testados apresentavam o gene mutante em heterocigose. No estado de São Paulo, Oliveira et al. (2015b) estudaram dez populações de carrapatos com diferentes graus de resistência aos pesticidas piretróides. Foram genotipadas 631 larvas, sendo encontrada frequência de

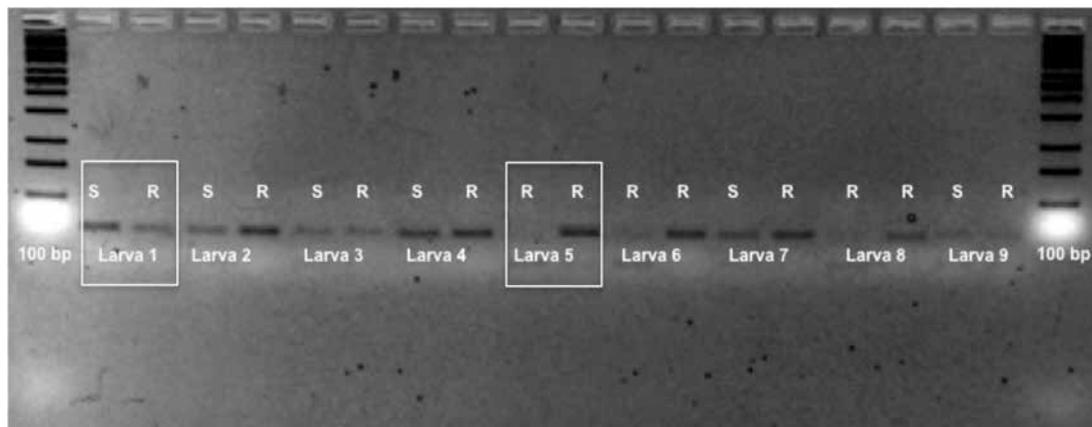


Figura 1. Eletroforese dos produtos de amplificação do gene que codifica o canal do sódio (KDR) em *Rhipicephalus microplus* (68 pb). Padrão de pares de bases (100 pb); S= sensível, R= resistente. Larvas heterozigotas (SR) e homozigotas resistentes (RR) em destaque.

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). A análise genotípica de larvas de carrapatos oriundas de populações colhidas em Rondônia mostraram níveis mais altos de alelos resistentes em homozigose (RR), chegando a 23,2% das amostras analisadas em uma propriedade. Esses testes genotípicos não estão ainda disponíveis para os pecuaristas, sendo usados apenas em levantamentos epidemiológicos efetuados em pesquisas científicas.

Com relação aos inseticidas organofosforados, as esterases parecem ser as principais enzimas que atuam no metabolismo e eliminação desses pesticidas, em especial as acetilcolinesterases (AChEs), fosfotriesterases e carboxilesterases (SOGORB et al., 1996). 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 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. Pontos de mutação no gene que codifica a AChE foram associados à resistência aos organofosforados em diferentes espécies de artrópodes. Alguns estudos foram desenvolvidos com a finalidade de identificar mutações provocadas pelo uso sistemático desses acaricidas, porém nenhum resultado efetivo foi encontrado até o momento, levando à hipótese de que a resistência pode envolver o aumento da transcrição ou da amplificação de genes que codificam enzimas metabolizantes como as AChEs (GUERRERO et al., 2012). O aumento da transcrição ou amplificação dessas enzimas poderá viabilizar o desenvolvimento de provas moleculares quantitativas (qPCR) mais rápidas e com alta acurácia, que tornarão menos trabalhoso e demorado o processo de detecção de cepas de *R. microplus* resistentes aos organofosforados (BRITO et al., 2015).

Com relação aos hemoparasitas, agentes causais da tristeza parasitária bovina (TPB), os métodos de diagnóstico também têm evoluído de forma notável. As babesioses são provocadas por protozoários que se multiplicam exclusivamente no interior de eritrócitos, originando uma enfermidade hemolítica e febril cuja gravidade é dependente de vários fatores relacionados ao parasita e ao hospedeiro. *Anaplasma marginale* também se multiplica nas células vermelhas dos bovinos, produzindo sinais clínicos que se confundem com a babesiose. As perdas ocasionadas por essas doenças são atribuídas ao menor ganho de peso dos animais, decréscimo na produção de leite, infertilidade de touros, abortos, morbidade, mortalidade e gastos com medicamentos e serviços veterinários. Além de todos esses problemas, a ocorrência dos hemoparasitas representa um obstáculo à introdução de animais oriundos de áreas livres de carrapatos, com o propósito de melhorar a produtividade dos rebanhos. O diagnóstico da forma clínica dessas hemoparasitoses é feito, além da avaliação clínica do animal, por meio do exame microscópico de esfregaços de sangue periférico dos animais afetados, técnica considerada regra de ouro. Esse método, além de não ser capaz de detectar animais em fases iniciais da doença e portadores sadios, é demorado e laborioso. Os exames sorológicos que detectam anticorpos específicos contra os hemoparasitas têm sensibilidade e especificidade dependentes, principalmente, do antígeno usado. A técnica imunoenzimática (ELISA) é a mais usada para a pesquisa de anticorpos contra *A. marginale* e *Babesia* spp.

Muitas dificuldades são encontradas nos estudos sobre a dinâmica das infecções pelos hemoparasitas nos carrapatos vetores das babesioses e anaplasmoses. A pesquisa de *Babesia* spp., em esfregaços de hemolinfa e em macerados de ovos e larvas, apresenta como principais limitações a impossibilidade de se diferenciar *B. bovis* e *B. bigemina* a partir da análise morfológica dos esporocinetos e a baixa sensibilidade da técnica. Modernos métodos de diagnóstico molecular tornaram possível a detecção de pequenas quantidades de DNA de qualquer organismo em uma amostra. A reação em cadeia da polimerase (PCR) possibilitou o desenvolvimento de técnicas de diagnóstico mais sensíveis e específicas. Testes baseados em PCR, desenvolvidos para a detecção de *Babesia* spp., têm demonstrado sensibilidade 100 a 1.000 vezes maior que o limiar de detecção da microscopia óptica.

Figuerola et al. (1993) desenvolveram um PCR “multiplex” para detecção de *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* em sangue bovino. A sensibilidade do teste foi de 0,00001% de eritrócitos infectados para *B. bovis* e *B. bigemina* e 0,0001% para *A. marginale*. Estudos conduzidos em colaboração entre os laboratórios da Embrapa Pecuária Sudeste e do departamento de Parasitologia da Unesp–Botucatu empregando a técnica de PCR e “Nested” PCR mostraram que, em bovinos leiteiros criados em área de estabilidade endêmica para as babesioses no estado de São Paulo, as frequências de infecção por *B. bovis* não diferiam das de *B. bigemina* e que a infecção por ambas foi semelhante em bezerros e vacas, sendo que os carrapatos que se alimentavam em bezerros mostraram maiores níveis de infecção por *B. bigemina* (OLIVEIRA et al., 2005; OLIVEIRA-SEQUEIRA et al., 2005). Um protocolo baseado na PCR quantitativa em tempo real (qPCR) foi descrito por Buling et al. (2007), tornando possível o diagnóstico rápido das babesioses bovinas (Figura 2) com a possibilidade de estimar o grau de parasitemia nos animais. Esses testes moleculares representam um grande avanço no desenvolvimento dos estudos epidemiológicos das babesioses, permitindo determinar rapidamente o risco da ocorrência de surtos em rebanhos leiteiros.

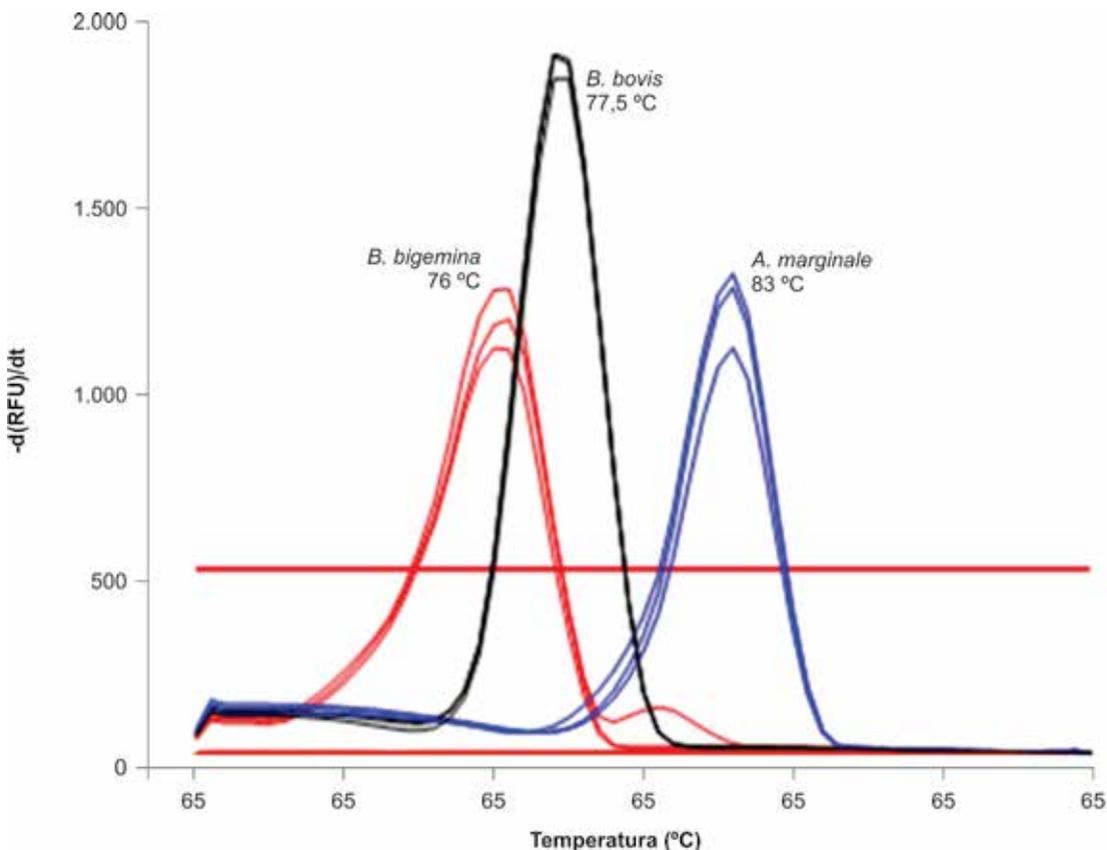


Figura 2. Curva de dissociação para detecção simultânea de *Babesia bovis*, *B. bigemina* (gene mt-cyB) e *Anaplasma marginale* (gene MSP1b).

CONSIDERAÇÕES E PERSPECTIVAS NA PESQUISA DE ANTIPARASITÁRIOS À BASE DE BIOATIVOS VEGETAIS

A PESQUISA DE EXTRATOS VEGETAIS COM ATIVIDADE ACARICIDA

O sucesso na pecuária bovina depende da aplicação de práticas adequadas de manejo nutricional, reprodutivo e sanitário. No manejo sanitário, o controle de parasitas é um grande desafio, uma vez que o agrupamento de animais implica, inevitavelmente, infestação parasitária. O rápido estabelecimento da resistência em parasitas, como o carrapato bovino *R. microplus*, criou um cenário preocupante que tem influenciado o curso da investigação científica na área de manejo animal e parasitologia veterinária. Portanto, a busca de ferramentas para minimizar esse problema tem sido proposta em inúmeros projetos de pesquisa, tais como o uso de antiparasitários à base de extratos

vegetais. A pesquisa por fitoterápicos busca obter parasiticidas biodegradáveis e com menor eliminação de resíduos nos produtos de origem animal e no meio ambiente (CHAGAS et al., 2016).

Algumas famílias botânicas são reconhecidas por apresentar várias atividades biológicas contra diferentes organismos. Além disso, há um número crescente de estudos sobre o uso de óleos essenciais no domínio veterinário, particularmente como agentes de controle de ectoparasitas como piolhos, moscas e carrapatos. Uma possível vantagem do uso de extratos vegetais, como os óleos essenciais, em relação aos tratamentos convencionais, é que os mesmos possuem eficácia ovicida relatada, ação repelente em razão dos seus componentes voláteis e efeito na fecundidade das fêmeas quando as mesmas são expostas a doses subletais (ELLSE; WALL, 2014). Assim, existe a necessidade de investigações mais completas, que não se restrinjam apenas a indicar se um fitoterápico é ou não eficaz contra uma ou outra fase parasitária, mas também buscar estimar o impacto deste extrato ou bioativo em todo o ciclo parasitário, incluindo a infestação da pastagem ao longo do tempo. Além disso, se a avaliação *in vitro* de um extrato vegetal indicar ineficácia, deve-se comparar as substâncias identificadas no extrato com o modo de ação relatado na literatura, pois uma ação indireta, ou seja, não por contato com a cutícula do carrapato e sim pela ingestão, justificaria a continuidade do estudo por meio de experimentos a campo com bovinos (CHAGAS et al., 2012).

Dessa forma, os extratos vegetais têm sido investigados na tentativa de se incrementar as opções de carrapaticidas disponíveis para os produtores, existindo ainda a possibilidade de associação de moléculas sintéticas com moléculas naturais, que possam potencializar a ação das primeiras. Além disso, os bioativos isolados e identificados podem servir como ponto de partida para a produção de substâncias semissintéticas e sintéticas. Sua obtenção ocorre em nível laboratorial, em maior volume, com produção monitorada por meios analíticos conforme resultados recém-adquiridos de nosso grupo de pesquisa (dados não publicados). Nesta linha de pensamento, outro exemplo foi um estudo realizado avaliando óleos essenciais quimicamente modificados de *Cymbopogon* spp. e *Corymbia citriodora* em *R. microplus*, buscando-se obter substâncias com ação similar a juvenoides. O citronelal presente nos dois óleos foi quantificado e convertido em *N*-butilcitronelilamina e em *N*-prop-2-inilcitronelilamina, análogos de juvenoides. A modificação química otimizou o efeito dos óleos nos carrapatos *in vitro*, mas não no teste *in vivo*, onde se comparou a eficácia do óleo original em relação ao óleo modificado na contagem de fêmeas ingurgitadas. Acredita-se que tal resultado foi obtido devido à baixa estabilidade das aminas em condições de campo. Esse estudo foi considerado pioneiro em *R. microplus* e esse conceito expande o horizonte para a pesquisa de substâncias quimicamente modificadas para o controle parasitário, além de demonstrar os desafios de se desenvolver formulações eficazes (CHAGAS et al., 2014).

A maior parte dos testes *in vitro* que têm sido utilizados para verificar a atividade biológica dos fitoterápicos foi inicialmente desenvolvida para detectar a resistência dos parasitas aos grupos químicos de carrapaticidas comerciais. Dessa forma, o efeito de um extrato vegetal pode ser subestimado e até ignorado se o método de avaliação selecionado desconsiderar alguns fatores que podem influenciar os resultados, tais como a solubilidade ou um efeito indireto sobre o parasita alvo. Apesar dessas deficiências, o desenvolvimento de estratégias menos dependentes de testes *in vivo* é de grande importância em virtude das preocupações pertinentes ao uso de animais em experimentos científicos.

As técnicas mais tradicionalmente utilizadas para levantamento de atividade biológica *in vitro* de extratos vegetais no carrapato *R. microplus* são o teste do pacote de larvas ou do papel impregnado (FAO, 1971; STONE; HAYDOCK, 1962), o teste de imersão de larvas (SHAW, 1966) e o teste de imersão de fêmeas ingurgitadas (DRUMMOND et al., 1973). Entretanto, como óleos essenciais são ricos em monoterpenos extremamente voláteis, adaptou-se e validou-se o teste de repelência na Embrapa Pecuária Sudeste (CHAGAS; RABELO, 2012), levando-se em consideração o geotropismo das larvas, ou seja, o comportamento de se deslocarem para a extremidade superior das gramíneas. Essa metodologia é de extrema importância na identificação de substâncias que possam ser incorporadas a formulações carrapaticidas, causando repelência à fase de larva e impedindo sua fixação no bovino. Isso se mostra muito vantajoso já que repele o parasita antes que o mesmo se estabeleça e inicie o repasto sanguíneo, evitando a transmissão da TPB e os prejuízos advindos do parasitismo. Nessa técnica, a partir da contagem das larvas presentes em cada área de hastes de madeira impregnadas com o extrato vegetal, é possível obter a relação entre o número total de larvas inseridas no teste e o total de larvas em cada área. Esses dados devem ser obrigatoriamente comparados com aqueles de um grupo controle composto de água destilada e outro de solvente utilizado na mesma concentração (Figura 3).

Atualmente, existem vários projetos de pesquisa em andamento, nos quais diferentes biomas brasileiros têm sido investigados. Pode-se citar o projeto da Embrapa Verdevet: Avaliação de Tecnologias para a Melhoria da Saúde Animal e Redução do Uso de Drogas Veterinárias na Produção de Bovinos de Leite. Espécies vegetais foram definidas, autorizações de coleta e remessa adquiridas e extratos têm sido produzidos para *screening* laboratorial e identificação das espécies com maior potencial acaricida. Frações mais purificadas dos melhores candidatos têm sido produzidas para novos testes *in vitro*, além de estudo fitoquímico para levantamento dos bioativos de melhor potencial.

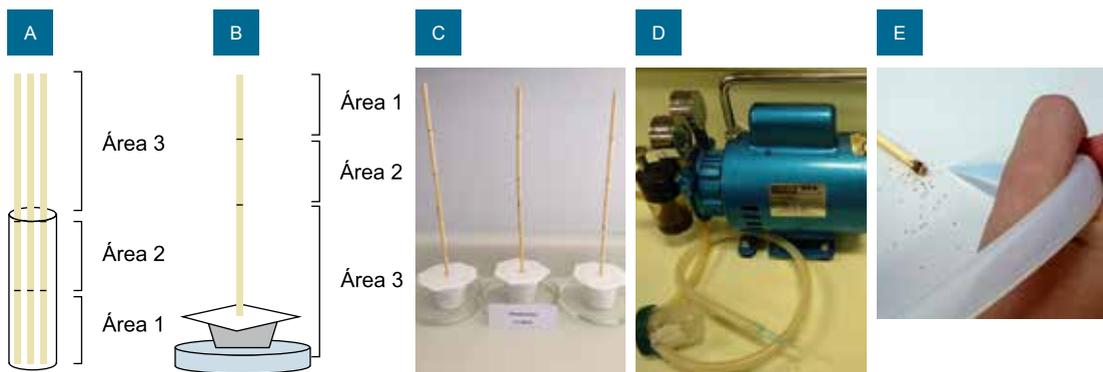


Figura 3. Esquema das hastes de madeira com as áreas 1 e 2 imersas em tubo tipo Falcon de 15 mL com o extrato vegetal (A); esquema da inversão das hastes e suas respectivas áreas (B); inserção das hastes em base de gesso com papel filtro. Aproximadamente 100 larvas do carrapato dos bovinos são colocadas em cada haste, rente ao papel filtro, em três repetições (C); bomba de vácuo adaptada com borracha e ponteira na extremidade (D); e contagem das larvas de *R. (B.) microplus* presentes em cada área (E).

Fonte: adaptado de Chagas e Rabelo (2012).

Na escolha do melhor candidato, leva-se em consideração a facilidade de cultivo da espécie vegetal, o rendimento do óleo essencial ou da fração pretendida e, ainda, a presença de um constituinte ou bioativo que possa ser facilmente obtido de forma comercial, ou cuja rota de síntese não seja muito laboriosa e de custo elevado, além de ser desejável que este bioativo e/ou seus metabólitos possam ser monitorados analiticamente em tecidos, sangue, carne e leite. Entre os resultados mais recentemente obtidos por nosso grupo de pesquisa, pode-se citar um levantamento feito com 11 óleos essenciais extraídos de plantas cultivadas no Bioma Amazônia (Figura 4).

O óleo de *Curcuma longa* (açafrão) obteve o melhor desempenho nos testes com o carrapato *R. microplus* (CL50 de 10,24 mg mL⁻¹ e 0,54 mg mL⁻¹ contra fêmeas ingurgitadas e larvas, respectivamente), apresentando eficácia de 71% sobre as fêmeas e 100% sobre as larvas nas concentrações de 6,25 mg mL⁻¹ a 25,0 mg mL⁻¹. De acordo com o estudo dos constituintes do óleo essencial, a presença de sesquiterpenos α , β e ar-turmerona (62% no total) pode estar relacionada com o efeito de *C. longa*. O potencial dos isolados de turmerona indica a necessidade de continuidade do estudo, que deve incluir a avaliação da toxicidade aos hospedeiros. Essa nova informação, quando combinada aos resultados já adquiridos, pode fornecer uma forte fundamentação para a concepção de ensaios pré-clínicos e clínicos para avaliar o seu potencial uso em formulações para o controle do carrapato bovino (CHAGAS et al., 2016).

Portanto, diversos aspectos devem ser levados em consideração em relação à utilização de extratos vegetais e seus compostos no controle de parasitas: extração, conservação, estudo fitoquímico, metodologia laboratorial a ser utilizada, determinação da concentração letal in vitro, toxicidade para o hospedeiro, dose efetiva in vivo, período residual, estabilidade da(s) substância(s), possibilidade de síntese ou modificação química para maior estabilidade, resíduos/metabólitos gerados e custos (CHAGAS, 2015).

DESAFIOS A SEREM SUPERADOS PARA O AVANÇO NA OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES ACARICIDAS

Acredita-se que o uso de extratos vegetais para controle parasitário possa retardar o desenvolvimento da resistência, já que os mesmos consistem de uma série de substâncias que podem agir de maneira diferente, dificultando a defesa e a sobrevivência do parasita (ATHANASIADOU et al., 2007). Se a substância ativa for isolada e usada extensivamente, nada impedirá o rápido desenvolvimento da resistência parasitária se ela possuir um único mecanismo de ação. Por outro lado, uma formulação desenvolvida à base de somente um bioativo pode ter sua qualidade muito mais facilmente controlada, além das questões residuais serem de fácil monitoramento. O que poderia ser considerado um dilema, classificamos como diferentes aplicações da fitoterapia.

A divergência dos resultados de eficácia obtidos in vitro em relação aos obtidos in vivo pode ser atribuída a fatores-chave relacionados, por exemplo, à volatilidade dos bioativos de um óleo essencial, ou ainda, à inexistência de uma formulação adequada que fixe o acarapaticida-teste na



Fotos: Francisco Ceilo Maia Chaves

Figura 4. Espécies vegetais utilizadas na obtenção de óleos essenciais: *Croton cajucara* [morfotipo branco (A) e vermelho (B)], *C. sacaquinha* – sacaquinha (C), *Curcuma longa* – açafrão (D), *Lippia alba* – erva-cidreira-brasileira (E), *L. gracilis* (F), *L. organoides* – sálvia-de-marajó (G), *L. sidoides* – alecrim-pimenta (H), *Mentha arvensis* – hortelã-japonesa (I), *M. piperita* – hortelã-pimenta (J), *Zingiber officinale* – gengibre (K).

Fonte: Chaves et al. (2016).

pele do bovino e aumente seu período residual (Figura 5). É importante concentrar esforços em estudos para determinar os adjuvantes mais apropriados a serem associados a moléculas vegetais e desenvolver formulações-modelo que possam ser adaptadas de acordo com a natureza do extrato ou do bioativo vegetal (CHAGAS, 2015).

Fotos: Ana Carolina de Souza Chagas



Figura 5. Concentrado emulsionado produzido na Embrapa Pecuária Sudeste, aspergido em bovino carrapateado e efeito nos carrapatos obtidos dos animais tratados em relação aos do animal controle.

Atualmente, nossas pesquisas estão focadas no isolamento de novas substâncias acaricidas de origem vegetal, sua síntese e inclusão em formulações seguras e com controle de qualidade, para que possam ser adquiridas pelos produtores e usadas na rotina das fazendas. Recomenda-se fortemente que formulações caseiras e produtos sem autorização no Ministério da Agricultura não sejam aplicados em bovinos. Existe risco de intoxicação do animal, aborto, aumento da carga parasitária devido à ausência de efeito na infestação pelo carrapato e, ainda, prejuízos com a compra de produtos ditos fitoterápicos, mas sem comprovação de eficácia em testes exigidos para sua comercialização. O controle biológico do carrapato por meio da utilização de fungos entomopatogênicos (*Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana*) e de nematoides entomopatogênicos (*Steinernema glaseri* e *Heterorhabditis baujardi*) tem sido pesquisado já há várias décadas; entretanto, apesar de bons resultados terem sido obtidos in vitro, os testes a campo indicam baixa eficácia. Alguns grupos de pesquisa têm tentado elevar a eficácia de vacinas no controle do carrapato bovino, além de reduzir a variabilidade de sua resposta, número de doses e custo. Atualmente, as vacinas disponíveis comercialmente não têm sido utilizadas por conta, principalmente, desses problemas. Em nossa opinião, este é um campo promissor que talvez gere bons resultados em longo prazo.

É essencial que os produtores entendam que os antiparasitários (quer sejam sintéticos ou de origem natural) não devem ser adotados como a única alternativa para o controle dos parasitas. Os antiparasitários devem ser entendidos como uma das ferramentas disponíveis a serem usadas em associação ao controle integrado de parasitas, incorporando o conceito de uso racional de antiparasitários. Deve-se realizar o teste de sensibilidade dos carrapatos a carrapaticidas para direcionar os

tratamentos na propriedade, identificar animais mais susceptíveis para descarte e os mais resistentes, como reprodutores/matrizes, fornecer alimentação adequada por categoria animal e sempre ter controle dos animais tratados, do medicamento utilizado e da data do tratamento. Informações técnicas quanto às épocas adequadas para o tratamento carrapaticida, técnica correta de aplicação do banho carrapaticida e manejo dos grupos químicos estão amplamente disponíveis. Somente com o uso racional e controlado de carrapaticidas, sejam eles sintéticos ou naturais, é possível desacelerar o estabelecimento da resistência aos carrapaticidas e reduzir o risco da presença de resíduos em produtos de origem animal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A sanidade dos rebanhos é fundamental para a melhoria da qualidade e quantidade do leite produzido pelos rebanhos brasileiros. Assim, nesse capítulo abordamos de forma simples, algumas inovações tecnológicas que foram desenvolvidas ou aplicadas em pesquisas nessa área, na Embrapa Pecuária Sudeste. Novos protocolos para o controle da mastite bovina são de importância estratégica para os sistemas de produção de leite. Do mesmo modo, o diagnóstico precoce dessa doença poderá ser feita de modo rápido no futuro próximo, usando-se os testes laboratoriais portáteis. Esses testes permitirão a rápida intervenção nos casos de mastite, evitando o agravamento da infecção e os prejuízos advindos dela. O uso contínuo de acaricidas para o controle das infestações pelo carrapato bovino disseminou a resistência e deixou produtores praticamente sem opções de tratamento. O manejo adequado dos princípios carrapaticidas disponíveis deve ser feito de forma criteriosa, usando modernas técnicas moleculares que detectam de forma precoce a ocorrência de mutações genéticas nos carrapatos, provocadas pelo uso sistemático de pesticidas. Paralelamente trabalhos científicos têm mostrado que os extratos de várias plantas, que contém substâncias inseticidas, poderão ser usados em breve no controle dos carrapatos, reduzindo os prejuízos para os produtores e os resíduos tóxicos no leite. Por fim, novas metodologias de diagnóstico molecular para *B. bovis*, *B. bigemina* e *A. marginale* tornaram possível entender melhor a epidemiologia dessas doenças, e são fundamentais principalmente na previsão da ocorrência de surtos.

REFERÊNCIAS

- ANDREOTTI, R.; GUERRERO, F. D.; SOARES, M. A.; BARROS, J. C.; MILLER, R. J.; LÉON, A. P. de 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, 2011.
- ATHANASIADOU, S.; GITHIORI, J.; KYRIAZAKIS, I. Medicinal plants for helminth parasite control: facts and fiction. **Animal**, v. 1, p. 1392-400, Oct. 2007.
- BARKEMA, H. W.; SCHUKKEN, Y. H.; ZADOKS, R. N. Invited review: the role of cow, pathogen, and treatment regimen in the therapeutic success of bovine *Staphylococcus aureus* mastitis. **Journal of Dairy Science**, v. 89, n. 6, p. 1877-1895, 2006.
- BRADLEY, J.; BREEN, J. E.; PAYNE, B.; WHITE, V.; GREEN, M. J. An investigation of the efficacy of a polyvalent mastitis vaccine using different vaccination regimens under field conditions in the United Kingdom. **Journal of Dairy Science**, v. 98, n. 3, p. 1706-1720, 2015.

- BRITO, L. G.; BARBIERI, F. da S.; FUNES-HUACCA, M. E.; NÉRY, L. de O.; SILVA, R. R. da; SANTOS, A. P. L. dos; GONÇALVES, A. E.; RABELO, M. D.; OLIVEIRA, M. C. de S. **Identificação de alvos moleculares para o diagnóstico quantitativo da resistência a pesticidas organofosforados em populações do carrapato-dos-bovinos**. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2015. 18 p. (Embrapa Rondônia. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 74).
- BULING, A.; CRIADO-FORNELIO, A.; ASENZOB, G.; BENITEZC, D.; BARBA-CARRETEROD, J. C.; FLORIN-CHRISTENSENB, M. A. quantitative PCR assay for the detection and quantification of *Babesia bovis* and *B. bigemina*. **Veterinary Parasitology**, v. 147, p. 16-25, 2007.
- CHAGAS, A. C. S. Medicinal plant extracts and nematode control. **Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources - CAB Review**, v. 10, p. 1-8, Aug. 2015.
- CHAGAS, A. C. S.; DOMINGUES, L. F.; FANTATTO, R. R.; GIGLIOTI, R.; OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA, D. H.; MANO, R. A.; JACOB, R. G. *In vitro* and *in vivo* acaricide action of juvenoid analogs produced from the chemical modification of *Cymbopogon* spp. and *Corymbia citriodora* essential oil on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 205, p. 277-284, Sep. 2014.
- CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. DE S.; GIGLIOTI, R.; SANTANA, R. C. M.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; CHAVES, F. C. M. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, p. 427-432, Apr. 2016.
- CHAGAS, A. C. S.; OLIVEIRA, M. C. de S.; RODRIGUES, R. A. F.; FOGLIO, M. A.; MAGALHÃES, P. M. de. **Parecer sobre a atividade antiparasitária de *Artemisia annua* sobre *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* em laboratório e a campo**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2012. 7 p. (Embrapa Pecuária Sudeste. Circular Técnica, 69).
- CHAGAS, A. C. S.; RABELO, M. D. **Método para detecção de substâncias com atividade repelente sobre larvas do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***: revisão e recomendações. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2012. (Embrapa Pecuária Sudeste. Documentos, 106).
- DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. **Journal of Economic Entomology**, v. 66, n. 1, p. 130-133, 1973.
- ELLSE, L.; WALL, R. The use of essential oils in veterinary ectoparasite control: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 233-243, 2014.
- FAO. **Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants**: module 1. Ticks: acaricide resistance: diagnosis, management and prevention. Rome: 2004. p. 25-77.
- FAO. Recommended methods for the detection and measurement of resistance of agricultural pests to pesticides: tentative methods for larvae of cattle tick *Boophilus* spp. FAO method n.7. **FAO Plant Protection Bulletin**, v. 19, n. 1, p. 15-18, 1971.
- FAZA, A. P.; PINTO, I. S.; FONSECA, I.; ANTUNES, G. R.; MONTEIRO, C. M.; DAEMON, E.; MUNIZ, M. DE S.; MARTINS, M. F.; FURLONG, J.; PRATA, M. C. 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, 2013.
- FIGUEROA, J. V.; CHIEVES, L. P.; JOHNSON, G. S.; BUENING, G. M. Multiplex polymerase chain reaction based assay for the detection of *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale* DNA in bovine blood. **Veterinary Parasitology**, v. 50, n. 1-2, p. 69-81, 1993.
- FOSGATE, G. T.; PETZER, I. M.; KARZIS, J. Sensitivity and specificity of a hand-held milk electrical conductivity meter compared to the California mastitis test for mastitis in dairy cattle. **The Veterinary Journal**, v. 196, n. 1, p. 98-102, 2013.
- FURLONG, J.; MARTINS, J. R. S.; PRATA, M. C. A. Controle estratégico do carrapato dos bovinos. **A Hora Veterinária**, v. 23, n. 137, p. 53-56, 2004.
- GRISI, L.; LEITE, R. C.; MARTINS, J. R. de S.; BARROS, A. T. M. de; ANDREOTTI, R.; CANÇADO, P. H. D.; LEÓN, A. A. P. de; PEREIRA, J. B.; VILLELA, H. S. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 23, n. 2, p. 150-156, 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). **J. Med. Entomol.**, v. 38, n. 1, p. 44-50, 2001.
- GUERRERO, F. D.; JAMROZ, R. C.; KAMMLAH, D.; KUNZ, S. E. Toxicological and molecular characterization of pyrethroid resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of kdr and super-kdr point mutations. **Insect Biochemistry Molecular Biology**, v. 27, n. 8-9, p. 745-755, 1997.

GUERRERO, F. D.; LOVIS, L.; MARTINS, J. R. Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus microplus*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 21, n. 1, p. 1-6, 2012.

HE, H.; CHEN, A. C.; DAVEY, R. B.; IVIE, G. W.; GEORGE, J. E. 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. 11, p. 558-561, 1999.

HONKANEN-BUZALSKI, T.; PYORALA, S. Mastitis therapy with special reference to antimicrobial resistance. In: Animal health: management and control of infectious and production diseases. **IDF Bulletin**, n. 416, p. 48-49, 2007.

JONSSON, N. N.; CUTULLÈ, C.; CORLEY, S. W.; SEDDON, J. M. Identification of a mutation in the para-sodium channel gene of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* associated with resistance to flumethrin but not to cypermethrin. **International Journal for Parasitology**, v. 40, n. 14, p. 1659-1664, 2010.

MENDES, M. C.; DUARTE, F. C.; MARTINS, J. R.; KLAFKE, G. M.; FIORINI, L. C. DE; BARROS, A. T. Characterization of the pyrethroid resistance profile of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* populations from the states of Rio Grande do Sul and Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**, v. 22, n. 3, p. 379-384, 2013.

MOTTRAM, T.; RUDNITSKAYA, A.; LEGIN, A.; FITZPATRICK, J. L.; ECKERSALL, P. D. Evaluation of a novel chemical sensor system to detect clinical mastitis in bovine milk. **Biosensors and Bioelectronics**, v. 22, n. 11, p. 2689-2693, 2007.

MULLEN, K. A. E.; SPARKS, L. G.; LYMAN, R. L.; WASHBURN, S. P.; ANDERSON, K. L. Comparisons of milk quality on North Carolina organic and conventional dairies. **Journal of Dairy Science**, v. 96, n. 10, p. 6753-6762, 2013.

OLIVEIRA, C. S. F.; HOGEVEENC, H.; BOTELHOD, A. M.; MAIAD, P. V.; COELHO, S. G.; HADDAD, J. P. A. Cow-specific risk factors for clinical mastitis in Brazilian dairy cattle. **Preventive Veterinary Medicine**, v. 121, n. 3-4, p. 297-305, 2015a.

OLIVEIRA, M. C. S.; BRITO, L. G.; BARBIERI, F. da S.; GONÇALVES, T. C.; TANAKA, E.; GIGLIOTTI, R.; BILHASSI, T. B.; SANTANA, R. C. M.; NÉO, T. A.; CHAGAS, A. C. de S.; RABELO, M. D. **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**. São Carlos, SP: Embrapa Pecuária Sudeste, 2015b. 34 p. (Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento, 38).

OLIVEIRA, M. C. S.; OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; ARAUJO JR., J. P.; AMARANTE, A. F. T.; OLIVEIRA, H. N. *Babesia* spp. infection in *Boophilus microplus* engorged female and eggs in São Paulo State, Brazil. **Veterinary Parasitology**, v. 130, n. 1-2, p. 61-67, 2005.

OLIVEIRA-SEQUEIRA, T. C. G.; OLIVEIRA, M. C. S.; ARAUJO JR., J. P.; AMARANTE, A. F. T. PCR-based detection of *Babesia bovis* and *Babesia bigemina* in their natural host *Boophilus microplus* and cattle. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 1, p. 105-111, 2005.

SCHUKKEN, Y. H.; BRONZO, V.; LOCATELLI, C.; POLLERA, C.; ROTA, N.; CASULA, A.; TESTA, F.; SCACCABAROZZI, L.; MARCH, R.; ZALDUENDO, D.; GUIX, R.; MORONI, P. Efficacy of vaccination on *Staphylococcus aureus* and coagulase-negative staphylococci intramammary infection dynamics in 2 dairy herds. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 8, p. 5250-5264, 2014.

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

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

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

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

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.

VIGUIER, C.; ARORA, S.; GILMARTIN, N.; WELBECK, K.; O'KENNEDY, R. Mastitis detection: current trends and future perspectives. **Trends in Biotechnology**, v. 27, n. 8, p. 486-493, 2009.

WU, J. Q.; HU, S. H. New perspectives in mastitis prevention. In: Animal health: management and control of infectious and production diseases. **IDF Bulletin**, v. 416, p. 50-53, 2007.