



20-22 de Octubre 1999  
Puerto Vallarta, Jalisco, México.

✓  
"Control de la Resistencia en Garrapatas  
y Moscas de Importancia Veterinaria  
y Enfermedades que transmiten."

CONASAG INIFAP INFARVET IICA AMPAVE FILASA





UC 5

1954

2

3

4

A  
NEZ

001

00

00

00

00

00

00

00

00

00

00

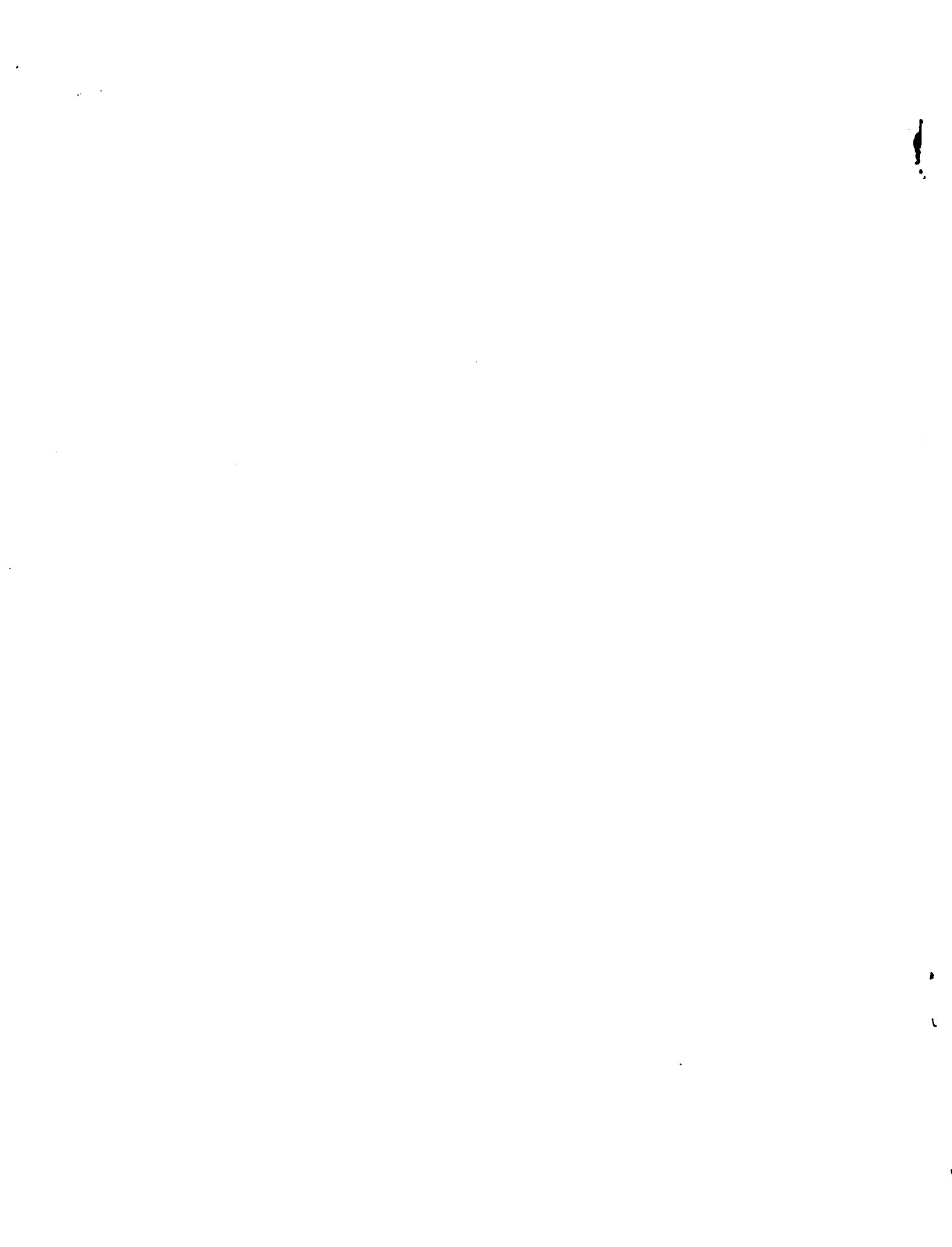
00

00

00

00

LASA





**IICA**

20-22 de Octubre 1999  
Puerto Vallarta, Jalisco, México.



**"Control de la Resistencia en Garrapatas  
y Moscas de Importancia Veterinaria  
y Enfermedades que transmiten."**

**CONASAG INIFAP INFARVET IICA AMPAVE FILASA**





### ¿ Qué es el IICA?

El **Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA)** es el organismo especializado en Agricultura del Sistema Interamericano. Sus orígenes se remontan a 1942, cuando el Consejo Directivo de la Unión Panamericana aprobó la creación del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, con sede en Costa Rica.

La Misión del Instituto es apoyar a los 34 Estados Miembros para lograr la sostenibilidad agropecuaria, en el marco de la integración hemisférica, como contribución al desarrollo rural, a través de acciones de cooperación en las siguientes áreas estratégicas:

- Políticas Socioeconómicas, Comercio e Inversiones
  - Ciencia y Tecnología, Recursos Naturales y Producción Agropecuaria
  - Sanidad Agropecuaria e Inocuidad de Alimentos
  - Desarrollo Rural Sostenible
  - Capacitación y Educación
- Información y Comunicación.

IV  
SEMINARIO  
INTERNACIONAL  
DE  
PARASITOLOGIA  
ANIMAL



PUERTO VALLARTA, JALISCO, MEXICO





**SEDE: HOTEL SHERATON BUGAMBILIAS  
PUERTO VALLARTA, JALISCO, MEXICO.**

**COMITÉ ORGANIZADOR:  
ORGANIZING COMMITTEE:**

**PRESIDENTES:  
HUGO FRAGOSO SANCHEZ  
ZEFERINO GARCIA VAZQUEZ  
ALBERTO GONZALEZ COSSIO**

**TESOREROS:  
LAMBERTO MORA GUTIERREZ  
DAVID OCAMPO A.  
MANUEL CARBONELL R.**

**COMUNICACIÓN Y PRENSA:  
ALFREDO GARCIA BUSTAMANTE  
JOSE LUIS CASTELLANOS HURTADO**

**COMITÉ CIENTIFICO:  
LAMBERTO MORA GUTIERREZ  
CARLOS VEGA Y MURGUIA**

**REGISTRO E INSCRIPCIÓN:  
HUMBERTO RENDON FERNANDEZ  
GUSTAVO VAZQUEZ GOMEZ**

**RELACIONES CON LA INDUSTRIA FARMACEUTICA:  
MARIO PEREZ LEYTON**

**COMUNICACIÓN INTERNACIONAL:  
FERNANDO PARRODI LOPEZ  
ENRIQUE GARCIA SAINZ  
KLEMENS KRIEGER**

**INDUSTRIA PECUARIA:  
ANTONIO GONZALEZ ORIGEL  
ALFREDO GARCIA BUSTAMANTE**

**COMITÉ EDITORIAL:  
GUILLERMO MORALES SANCHEZ  
HUGO FRAGOSO SANCHEZ  
ZEFERINO GARCIA VAZQUEZ.**



**AGRADECIMIENTOS:  
ACKNOWLEDGMENTS:**

**EL COMITÉ ORGANIZADOR EXPRESA EL AGRADECIMIENTO A LAS INSTITUCIONES PATROCINADORAS, QUE CON SU PARTICIPACION Y APOYO ECONOMICO HACEN POSIBLE LA REALIZACION DEL IV SEMINARIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL.**

**AGROFORMULADORA DELTA  
BAYER DE MEXICO, SA DE CV.  
BOHERINGER INGELHEIM  
CONASAG  
DGSA.  
ELY LILLI DE MEXICO S.A. DE C.V.  
FARMATEC S.A. DE C.V.  
FORT DODGE  
GRUPO HOECHST-ROUSSEL  
INDUSTRIA FARMACEUTICA VETERINARIA.  
INIFAP.  
INSTITUTO INTERAMERICANO DE COOPERACION PARA LA  
AGRICULTURA  
LABORATORIOS ARANDA  
LABORATORIOS AVILAB.  
LAPISA  
MERIAL MEXICO.  
OUROFINO DE MEXICO.  
PFIZER DE MEXICO S.A. DE C.V.  
PRONAVIBE  
REVETMEX S.A. DE C.V.  
SALUD Y BIENESTAR ANIMAL, SA DE CV  
VIRBAC DE MEXICO S.A. DE C.V.**



**LISTA DE PONENTES:**

**NOMBRE**

**INSTITUCION**

A. LIEBISCH	UNIVERSIDAD HANNOVER, ALEMANIA
ALBERTO GONZALEZ C.	BAYER, MEXICO
ALFREDO CORONADO	UNIV, CENT. LISANDRO A, VENEZUELA
ALFREDO GARCIA B.	DGSA, MEXICO
ALFREDO VILLAGOMEZ C.	UNIVERSIDAD VERACRUZANA MEXICO
ANDREW CHEN	ARS-USDA, E.U.
ANTONIO CANTU	C.E. ALDAMA INIFAP, MEXICO
ANTONIO MEDELLIN	FAC MED. VET. Y ZOOT. TAM. MEXICO
C. GAXIOLA	FAC. MED. VET. Y ZOOT. UNIVERSIDAD DE SINALOA
CARLOS CORDOVEZ	OURO FINO, BRASIL
CARLOS CRUZ VAZQUEZ	INST. TEC. AGROP. SEP. AGUASCALIENTES, MEXICO
CARLOS VEGA Y MURGIA	INIFAP, MEXICO
CONSUELO ALMAZAN	FAC. MED. VET. Y ZOOT. TAM., MEXICO
EFRAIN BENAVIDES	CORPOICA, COLOMBIA
ELYES ZHIONA	UNIVERSIDAD DE ROHEDE, U.S.A
ENRIQUE GARCIA	BAYER, MEXICO
ESTEFAN MIRANDA	UNIVERSIDAD DE TEXAS A.M.
F. FERNANDEZ	UNIVERSIDAD DE ZULIA VENEZUELA
G. WAGNER	UNIVERSIDAD DE TEXAS A.M.
GRACIELA DIAZ	UNIVERSIDAD DE LA HABANA, CUBA
H. M. HERNANDEZ	INST. NAL. MED. TROP. CUBA
HAIGI HE	ARS-USDA, E.U.
HUGO FRAGOSO	CENAPA/SAGAR, MEXICO
JOHN FURLONG	EMBRAPA, BRASIL
JOHN GEORGE	USDA, ARG
JOHN PRUETT	ARS-USDA, E.U.
K. KRIEGER	BAYER, MEXICO
LUCINA ALDAMA	INST. POLIT. NAL. YAUTEPEC, MORELOS, MEXICO
MANUEL RODRIGUEZ	CEIGB, CUBA
MARIO VALDEZ	CETRO NAL. PARASITAL, CUBA
MARIO VILLARINO	FAC. MED. VET. Y ZOOT UNAM
MIGUEL REDONDO	CEIGB, CUBA
MINERVA SANTAMARIA	DGSA MEXICO
NARA FARIAS	UNIV. FED. DE PELOTAS, BRASIL

PATRICIA HOLMAN	UNIVERSIDAD DE TEXAS A.M.
PETER WILLADSEN	CSIRO, AUSTRALIA
R. A. HUERTA PANIAGUA	COLEGIO POSGRADUADOS MEXICO
RAFAEL DE LA VEGA	LAB. BIOL. Y FAR., HABANA, CUBA
RAQUEL COSIO	UNIVERSIDAD DE TEXAS A.M.
RENATO ANDREOTTI	EMBRAPA, BRASIL
ROBERTO ALVA	MERIAL, USA
RODRIGO ROSARIO	INIFAP MEXICO
RUBEN HERNNADEZ	UNIVERSIDAD DE TEXAS A.M.
SERGIO D RODRIGUEZ C.	INIFAP, MEXICO
SIDNEY E. KUNZ	TEXAS, USA
VICTOR ALVAREZ	MINISTERIO DE AGRIC, COSTA RICA
ZEFERINO GARCIA	INIFAP, MEXICO

## CONTENIDO

ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LA RESISTENCIA A ACARICIDAS EN EL MUNDO. D H Kemp, R V Mckenna, R Thullner, P Willadsen.....	1
SITUACION ACTUAL DE LA GARRAPATA <i>Boophilus microplus</i> (Acari: Ixodidae) EN COSTA RICA. SITUACIÓN DE OTRAS GARRAPATAS. V́ctor Alvarez C.....	11
SITUACION DE LA RESISTENCIA DE LA GARRAPATA <i>Boophilus microplus</i> EN LA REGIÓN SUR DE RIO GRANDE DEL SUR, BRASIL. N.A.da R. Farias.....	25
ESTUDIOS DE RESISTENCIA A ACARICIDAS EN LA GARRAPATA BOVINA <i>Boophilus microplus</i> EN AMERICA CENTRAL. S. Hagen, J. A. Kopp G3mez, A. Liebisch.....	33
ACARICIDAS Y RESISTENCIA EN <i>Boophilus spp</i> EN SUDAFRICA. T. Strydom, R. Peter.....	35
DIAGNOSTICO DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LA GARRAPATA DEL GANADO <i>Boophilus microplus</i> A LOS ACARICIDAS EN EL ESTADO DE MINAS GERAIS, BRAZIL. John Furlong.....	41
SITUACION ACTUAL DE LA CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA GARRAPATA EN MEXICO. Alfredo Garća Bustamante.....	47
CONTROL QUIMICO DE <i>Boophilus microplus</i> EN VENEZUELA: SITUACI3N ACTUAL. Alfredo Coronado.....	51
SITUACION DE LA RESISTENCIA DE LAS GARRAPATAS A LOS ACARICIDAS EN CUBA. USO DE LA LUCHA INTEGRADA COMO ESTRATEGIA. M. Valdez Rodŕguez, L. M3ndez Mellor, A. Alfonso Guerra, H. P3rez Barrios, I. Rodŕguez Salazar, A. Leyva Rodŕguez.....	57
LAS PROTEASAS Y EL CICLO BIOLOGICO DE LAS GARRAPATAS. Judith Mendiola, Mario Vald3s.....	65

PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UNA ACETILCOLINESTERASA DE <i>Boophilus microplus</i> . Andrew C. Chen.....	66
PURIFICACION DE UNA ESTERASA DE LARVAS DE LA CEPA DE <i>Boophilus microplus</i> COATZACOALCOS. John H. Pruett, Robert J. Miller, Robert C. Jamroz, Felix D. Guerrero.....	67
EXPRESION DE GENES DE GARRAPATA EN EL SISTEMA DE BACULOVIRUS. Estefan Miranda-Miranda, Raquel Cossio-Bayugar, John E. George, Suryakant D. Waghela, Gale G. Wagner.....	69
DETECCION DE UNA MUTACION DE PUNTO EN EL GENE DE CANAL DE SODIO DE CEPAS RESISTENTES A PIRETROIDES DE LA GARRAPATA DEL GANADO ( <i>Boophilus microplus</i> ) POR LA REACCION EN CADENA DE POLYMERASA DE UN FRAGMENTO DE RESTRICCION POLIMORFICO (MPPCR-RFLP). Haiqi He, Andrew C. Chen.....	71
LA DETECCION DE UNA MUTACION DE PUNTO DE UN GEN DE ESTERASA EN <i>Boophilus microplus</i> . Ruben Hernandez, Haiqi He, Andrew C. Chen, Suryakant D. Waghela, G. Wayne Ivie, John E. George, G. Gale Wagner.....	73
UN INHIBIDOR DE SERIN PROTEASA DE LARVA NO ALIMENTADA DE <i>Boophilus microplus</i> EN BECERRAS. Renato Andreotti, Claudio A M. Sampaio, Alberto Gómez, Aparecida S. Tanaka.....	75
IDENTIFICACION DE UNA PROTEASA NEUTRA DE INTESTINO DE <i>Boophilus microplus</i> POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA COPOLIMERIZADA CON GELATINA. Hilda María Hernández, Judith Mendiola, Ayme Fernández-Caliene, Mario Valdés.....	87
ESTUDIOS DE EXHIBICION DIFERENCIAL DE RESISTENCIA A ORGANOSFOSFORADOS EN CELULAS DE <i>Boophilus microplus</i> CULTIVADAS. Raquel Cossio-Bayugar, Gale G. Wagner, Patricia Holman.....	95



EXPRESION DIFERENCIAL DE ISOENZIMAS DE ESTERASAS COMO UN MECANISMO DE RESISTENCIA A LOS IXODICIDAS EN LA GARRAPATA DEL GANADO <i>Boophilus microplus</i> . Rodrigo Rosario-Cruz, Zeferino García Vázquez, Ma. del Refugio Tellez-Alanis, John E. George.....	97
ANALISIS DE LA SITUACION ACTUAL MEDIANTE EL MONITOREO DE SUSCEPTIBILIDAD A IXODICIDAS EN <i>Boophilus microplus</i> DE 1993 A 1999 Y MEDIDAS PREVENTIVAS PARA RETARDAR LA RESISTENCIA AL AMITRAZ EN MEXICO. M. Santamaría Vargas, N Soberanes Céspedes, A. Ortiz, Najera; J. Osorio Miranda, F. Martínez Ibañez, R. Franco Bello, H. Frago Sánchez, G. Delabra Vaca, R. Quezada Delgado, I. Giles Hernández y M. Ortiz Estrada.....	103
CONCEPTOS DE MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS APLICADOS AL CONTROL DE GARRAPATAS EN EL GANADO BOVINO EN MEXICO. Huerta- Paniagua R. A., Villagómez-Cortés J. A. S. ....	119
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL CUNDEAMOR ( <i>Momordica charantia</i> L.) (Cucurbitaceae) SOBRE <i>Boophilus microplus</i> (Canestrini). Huerta-Paniagua, R. A, Rodríguez-Hernández C, Villagómez-Cortés, J.A.S.....	120
EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS ACUOSOS DEL NIM ( <i>Azadirachta indica</i> (L.) JUSS.) (Meliaceae) SOBRE <i>Boophilus microplus</i> (Canestrini). Huerta- Paniagua, R. A, Rodríguez-Hernández C. ....	122
SIMULACION DE ROTACION SISTEMATICA DE POTREROS EN LA EVALUACION DE ESTRATEGIAS DEL MANEJO INTEGRADO DE GARRAPATAS (MIG) PARA EL CONTROL DE <i>Boophilus microplus</i> (Acari: Ixodidae) EN VENEZUELA. F. Hernández A., P.D. Teel, W.E. Grant.....	125
PASADO, PRESENTE Y FUTURO DE LA VACUNACION CONTRA GARRAPATAS. Peter Willadsen and David Kemp.....	131

EVALUACION DE LA VACUNA CONTRA LA GARRAPATA Bm 86 (GAVAC) EN GANADO INFECTADO CON <i>Boophilus annulatus</i> . Fragoso S. H, Ortiz, E. M, Rodríguez, M. Delabra, V. G. Redondo, M, Hernández P. V y De la Fuente J. ....	141
POLITICAS PARA EL CONTROL DE RESISTENCIA A PESTICIDAS EN LA INDUSTRIA PECUARIA: CASO MEXICO. Alberto González Cossio.....	149
FUNDAMENTO Y MANEJO PARA RETARDAR LA RESISTENCIA DE <i>Boophilus microplus</i> Y <i>Haematobia irritans</i> EN EL CONTINENTE AMERICANO. Carlos O. Cordovés.....	151
LA EFICACIA DE UNA IVERMECTINA DE LARGA DURACION INYECTABLE (LAI) CONTRA ECTOPARASITOS DEL GANADO. Alva R, Cramer LG, Carvalho LA, Bridi AA, Cox JL, Soll MD.....	171
CONTROL MICROBIOLOGICO DE GARRAPATAS. Elyes Zhioua, Klaus Heyer, Howard Ginsberg, Roger LeBrun.....	177
INFLUENCIA DEL HOSPEDERO EN EL DESARROLLO DE <i>Anocentor nitens</i> . Graciella Díaz, Rafael de la Vega, Gladys Chávez.....	178
METODO DE MUESTREO DE GARRAPATAS PARA PEQUEÑAS GRANJAS LECHERAS. Rafael de la Vega, Andrés Camejo, Graciella Díaz, Israel García.....	179
DINAMICA POBLACIONAL DE <i>Haematobia irritans</i> EN UN HATO DE BOVINOS DE SOTO LA MARINA, TAMAULIPAS, MEXICO. Castillo S. S., Almazán G.C., Medellín L A., Loredo O. J. ....	181
RASGOS BASICOS DE LA INFESTACION POR MOSCAS <i>Stomoxys calcitrans</i> Y <i>Haematobia irritans</i> EN GANADO LECHERO ESTABULADO DE AGUASCALIENTES, MEXICO. Cruz-Vázquez, C, Vitela, M I, Ramos, P.M, García, V Z, Quintero, M M T. ....	183
CONTROL NATURAL DEL COMPLEJO DE MOSCAS DEL ESTABLO EN CUAUTLA, MORELOS, MORELOS. Ma. Elena Valdez E, Lucila Aldana LL, Laura Martinez M, Manuel Morales S. ....	189

PRESENCIA DE PARASITOIDES EN LAS MOSCAS DEL ESTABLO EN YAUTEPEC, MORELOS, MEXICO. Ma. Elena Valdez E, Lucila Aldana LL, Laura Martinez M, Manuel Morales S. ....	191
EVALUACION DE LA RESISTENCIA DE LOS MOSQUICIDAS CONTRA LA MOSCA DEL CUERNO ( <i>Haematobia irritans</i> ) EN TAMAULIPAS. Antonio Cantu C., Consuelo Almazan G., Zeferino García V., Sidney Kunz.....	193
NUEVAS PRUEBAS DIAGNOSTICAS; ¿LOS PARASITOS O ANTICUERPO? Patricia J. Holman, David Cruz, G. Gale Wagner.....	195
SITUACION ACTUAL DE LOS HEMOPARASITOS EN EL ESTADO DE TAMAULIPAS, MEXICO. Medellín L.J.A. y Almazán G.C. .....	197
EXPERIENCIAS EN EL DESARROLLO DE UNA VACUNA CONTRA LA BABESIOSIS BOVINA EN MEXICO. C.A. Vega y Murguía, J.V. Figueroa Millán, J.A. Ramos Aragón, E.E. Rojas Ramírez, R. Hernández Ortiz, S. D. Rodríguez Camarillo, G. J. Cantó Alarcón.....	199
DESARROLLO DE LA VACUNA DE <i>ANAPLASMA</i> EN MEXICO. S. D. Rodríguez, M. A. García Ortiz, R. Aboytes Torres, G. J. Cantó Alarcón, N. Santos Cerda.....	211
PREVALENCIA DE <i>Otobius megnini</i> y <i>Anocentor nitens</i> EN EQUINOS DEL LIENZO CHARRO DE BACHIGUALATO Y COLONIA BACHIGUALATO DE CULIACAN, SINALOA, MEXICO. Gaxiola C S M, Borbolla I J E, Quintero M M T, Rentería G R, Aceves L R, Guerrero L A P, Velarde P J L, Zazueta G A O. ....	223
INFESTACIÓN NATURAL DE BOVINOS CON <i>Boophilus microplus</i> EN EL MUNICIPIO DE CULICAN, SINALOA, MEXICO. Gaxiola C. S. M., Quintero M. M. T, Rodríguez M. J, Borbolla I. J. E, Castro del C. N, Rubio R. M.C. ....	225
DERMATITIS AGUDA EN EL CERDO OCASIONADO POR PICADURAS DE INSECTOS. Robert D. Glock; S. C. Henry.....	227

<b>CONSIDERACIONES PARA EL USO ADECUADO DE LOS IXODICIDAS.</b>	
García, E.S.; Clemens, K. y González-Cossio, L. A. ....	235
<b>ENCUESTA SOBRE ACTITUDES Y PRACTICAS DE PRODUCTORES DE GANADO BOVINO EN EL CONTROL DE LA RESISTENCIA DE LA GARRAPATA <i>Boophilus microplus</i> EN EL ESTADO DE CHIAPAS, MEXICO.</b>	
Sánchez Z L M, Mejía E F, Granjeno G, García V Z, George J. ....	237
<b>AISLAMIENTO DE Bm 95 DE LA GARRAPATA DEL GANADO <i>Boophilus microplus</i>: UN ANTIGENO MAS UNIVERSAL PARA EL CONTROL DE LAS INFESTACIONES DE GARRAPATA.</b>	
José C. García-García, Carlos Montero, Miguel Redondo, Milagros Vargas, Mario Canales, Oscar Boue, Manuel Rodríguez, Marisdania Joglar, Héctor Machado, Mario Valdés, Luis Méndez.....	238
<b>RESULTADOS EN MÉXICO DE LA LUCHA INTEGRADA CONTRA LAS GARRAPATAS DEL GENERO <i>Boophilus</i> CON LA UTILIZACIÓN DE LA VACUNA RECOMBINANTE GAVAC.</b>	
Julián Lona, Miguel Redondo, Felipe Avila, Gustavo Vázquez.....	239
<b>RESULTADOS EN CUBA DE LA LUCHA INTEGRADA CONTRA LAS GARRAPATAS <i>Boophilus microplus</i> CON LA UTILIZACIÓN DE LA VACUNA RECOMBINANTE GAVAC.</b>	
Miguel Redondo, Luis Mendez, Emerio Serrano, Mario Valdez, Carlos Montero, Milagro Vargas, Manuel Rodríguez, Ricardo Leonard, Rogelio Oliva, Jorge Artilos.....	240
<b>EL USO DE MOXIDECTIN EN EL CONTROL ESTRATEGICO DE LA GARRAPATA AZUL DEL GANADO EN SUDAFRICA.</b>	
A. Du Plessis, R. J. Peter.....	241
<b>SUSCEPTIBILIDAD A LOS ORGANOFOSFORADOS EN POBLACIONES DE MOSCA DEL CUERNO (<i>Haematobia irritans</i>) RESISTENTES A PIETROIDES Y EL MANEJO DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS.</b>	
Ortíz Estrada Martín, Franco Bello Rubén.....	242

## CONTENT

STRATEGIES FOR TICK CONTROL IN A WORLD OF ACARICIDE RESISTANCE D H Kemp, R V Mckenna, R Thullner, P Willadsen.....	1
CURRENT STATUS OF THE TROPICAL, CATTLE TICK <i>Boophilus microplus</i> (Acari: Ixodidae) IN COSTA RICA. OTHER TICK'S SITUATIONS. V́ctor Alvarez C.....	11
THE SITUATION OF ACARICIDE RESISTANCE IN THE CATTLE TICK <i>Boophilus microplus</i> IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, SOUTHERN BRAZIL. N.A.da R. Farias.....	25
STUDIES ON ACARICIDE RESISTANCE IN THE CATTLE TICK <i>Boophilus microplus</i> IN CENTRAL AMERICA. S. Hagen, J. A. Kopp Ǵmez, A. Liebisch.....	33
ACARICIDES AND <i>Boophilus spp</i> RESISTANCE IN SOUTH AFRICA T. Strydom, R. Peter.....	35
DIAGNOSIS OF THE SUSCEPTIBILITY OF THE CATTLE TICK, <i>Boophilus microplus</i> , TO ACARICIDES IN MINAS GERAIS STATE, BRAZIL.. John Furlong.....	41
CURRENT STATUS OF THE NATIONAL TICK CAMPAING IN MEXICO. Alfredo Garća Bustamante.....	47
CHEMICAL CONTROL OF <i>Boophilus microplus</i> IN VENEZUELA: CURRENT SITUATION. Alfredo Coronado.....	51
ACARICIDE TICK RESISTANCE IN CUBA. USE OF INTEGRATED CONTROL AS STRATEGY. M. Valdez Rodŕguez, L. Ḿndez Mellor, A. Alfonso Guerra, H. Ṕrez Barrios, I. Rodŕguez Salazar, A. Leyva Rodŕguez.....	57
THE PROTEASES AND THE BIOLOGICAL CYCLE OF THE TICKS. Judith Mendiola, Mario Valdés.....	65

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN ACETYLCHOLINESTERASE FROM <i>Boophilus microplus</i> Andrew C. Chen.....	66
PURIFICATION OF A LARVAL ESTERASE FROM THE COATZACOALCOS STRAIN OF <i>Boophilus microplus</i> John H. Pruett, Robert J. Miller, Robert C. Jamroz, Felix D. Guerrero.....	67
CATTLE TICK GENE EXPRESSION IN THE BACULOVIRUS SYSTEM. Estefan Miranda-Miranda, Raquel Cossio-Bayugar, John E. George, Suryakant D. Waghela, Gale G. Wagner.....	69
DETECTION OF A POINT MUTATION IN THE SODIUM CHANNEL GENE FROM PYRETHROID RESISTANT STRAINS OF CATTLE TICK ( <i>Boophilus microplus</i> ) BY MISMATCH-PRIMER MEDIATED POLYMERASE CHAIN REACTION-RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (MPPCR-RFLP). Haiqi He, Andrew C. Chen.....	71
DETECTION OF A POINT MUTATION IN AN ESTERASE GENE IN <i>Boophilus microplus</i> TICKS. Ruben Hernandez, Haiqi He, Andrew C. Chen, Suryakant D. Waghela, G. Wayne Ivie, John E. George, G. Gale Wagner.....	73
A SERINE PROTEINASE INHIBITOR IMMUNOPROTECTION FROM <i>Boophilus microplus</i> UNFED LARVAE IN CALVES. Renato Andreotti, Claudio A M. Sampaio, Alberto Gómez, Aparecida S. Tanaka.....	75
IDENTIFICATION OF NEUTRAL PROTEASE FROM GUT OF <i>Boophilus microplus</i> BY ELECTROPHORESIS COPOLYMERIZED WITH GELATINE POLYACRYLAMIDE. Hilda María Hernández, Judith Mendiola, Ayme Fernández-Caliene, Mario Valdés.....	87
DIFFERENTIAL DISPLAY STUDIES OF ORGANOPHOSPHATE RESISTANCE IN CULTURED <i>Boophilus microplus</i> CELLS. Raquel Cossio-Bayugar, Gale G. Wagner, Patricia Holman.....	95

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF ESTERASE ISOZYMES AS A MECHANISM OF RESISTANCE TO IXODICIDES IN THE CATTLE TICK <i>Boophilus microplus</i> . Rodrigo Rosario-Cruz, Zeferino García Vázquez, Ma. del Refugio Tellez-Alanis, John E. George.....	97
ANALYSIS OF THE CURRENT SITUATION BY SURVEYED THE SUSCEPTIBILITY OF <i>Boophilus microplus</i> FROM 1993-1999 AND THE PREVENTIVE ACTIONS TO DELAY THE AMITRAZ RESISTANCE IN MEXICO M. Santamaría Vargas, N Soberanes Céspedes, A. Ortiz, Najera; J. Osorio Miranda, F. Martínez Ibañez, R. Franco Bello, H. Fragozo Sánchez, G. Delabra Vaca, R. Quezada Delgado, I. Giles Hernández y M. Ortiz Estrada.....	103
INTEGRATED MANAGEMENT CONCEPTS OF PESTS APPLIED TO THE CONTROL OF THE CATTLE TICK IN MEXICO. Huerta- Paniagua R. A., Villagómez-Cortés J. A. S. ....	119
EVALUATION OF THE ACTIVITY OF CUNDEAMOR ( <i>Momordica charantia</i> L.) (Cucurbitaceae) ON <i>Boophilus microplus</i> (Canestrini) Huerta-Paniagua, R. A, Rodríguez-Hernández C, Villagómez-Cortés, J.A.S.....	120
EVALUATION OF WATER EXTRACTS ACTIVITY OF NIM ( <i>Azadirachta indica</i> (L.) JUSS.) (Meliaceae) ON <i>Boophilus microplus</i> (Canestrini) Huerta- Paniagua, R. A., Rodríguez-Hernández C. ....	122
SIMULATION OF SYSTEMATICAL ROTATION PASTURES IN THE EVALUATION OF THE INTEGRATED TICKS MANAGEMENT (MIG) FOR THE CONTROL OF <i>Boophilus microplus</i> (Acari: Ixodidae) IN VENEZUELA F. Hernández A., P.D. Teel, W.E. Grant.....	125
PAST, PRESENT AND FUTURE OF VACCINATION AGAINST TICKS Peter Willadsen and David Kemp.....	131
EVALUATION OF THE TICK VACCINE Bm 86 (Gavac) IN INFESTED CATTLE WITH <i>Boophilus annulatus</i> . Fragoso S. H, Ortiz, E. M, Rodríguez, M. Delabra, V. G. Redondo,	

M, Hernández P. V y De la Fuente J. ....	141
<b>POLICY FOR THE CONTROL OF PESTICIDE RESISTANCE IN THE CATTLE INDUSTRY: MEXICAN CASE</b>	
Alberto González Cossio.....	149
<b>FUNDAMENT AND MANAGEMENT FOR RETARD RESISTANT OF <i>Boophilus microplus</i> AND <i>Haematobia irritans</i> IN AMERICAN CONTINENT.</b>	
Carlos O. Cordovés.....	151
<b>THE EFFICACY OF IVERMECTIN LONG-ACTING INJECTION (LAI) AGAINST ECTOPARASITES OF CATTLE.</b>	
Alva R, Cramer LG, Carvalho LA, Bridi AA, Cox JL, Soll MD.....	171
<b>MICROBIAL CONTROL OF TICKS.</b>	
Elyes Zhioua, Klaus Heyer, Howard Ginsberg, Roger LeBrun.....	177
<b>INFLUENCE OF THE HOST IN THE DEVELOPMENT OF <i>Anocentor nitens</i></b>	
Graciella Díaz, Rafael de la Vega, Gladys Chávez.....	178
<b>A TICK SAMPLING METHOD FOR SMALL DAIRY FARMS</b>	
Rafael de la Vega, Andrés Camejo, Graciella Díaz, Israel García.....	179
<b>POPULATION DYNAMICS OF <i>Haematobia irritans</i> IN A BEEF HERD IN SOTO LA MARINA, TAMAULIPAS, MEXICO.</b>	
Castillo S. S., Almazán G.C., Medellín L A., Loredo O. J. ....	181
<b>BASIC CHARACTERISTICS IN <i>Stomoxys calcitrans</i> AND <i>Haematobia irritans</i> FLIES INFESTATION IN CONFINED DAIRY CATTLE IN AGUASCALIENTES, MEXICO.</b>	
Cruz-Vázquez, C, Vitela, M I, Ramos, P.M, García, V Z, Quintero, M M T. ....	183
<b>NATURAL CONTROL OF FLY COMPLEX ON STABLE IN CUAUTLA, MORELOS, MEXICO</b>	
Ma. Elena Valdez E, Lucila Aldana LL, Laura Martinez M, Manuel Morales S. ....	189
<b>PARASITIDS FOUND IN STABLE FLY IN YAUTEPEC, MORELOS, MEXICO.</b>	



Ma. Elena Valdez E, Lucila Aldana LL, Laura Martinez M, Manuel Morales S. ....	191
<b>EVALUATION OF THE RESISTANCE OF THE INSECTICIDES AGAINST THE HORN FLY (<i>Haematobia irritans</i>) IN TAMAULIPAS</b>	
Antonio Cantu C., Consuelo Almazan G., Zeferino García V., Sidney Kunz.....	193
<b>“NEW” DIAGNOSTIC TESTS; PARASITES OR ANTIBODY?</b>	
Patricia J. Holman, David Cruz, G. Gale Wagner.....	195
<b>CURRENT SITUATION OF THE HEMOPARASITES IN THE STATE OF TAMAULIPAS, MEXICO.</b>	
Medellín L.J.A. y Almazán G.C. ....	197
<b>EXPERIENCES ON THE DEVELOPMENT OF A BOVINE BABESIOSIS VACCINE IN MEXICO.</b>	
C.A. Vega y Murguía, J.V. Figueroa Millán, J.A. Ramos Aragón, E.E. Rojas Ramírez, R. Hernández Ortiz, S. D. Rodríguez Camarillo, G. J. Cantó Alarcón.....	199
<b>ANAPLASMA VACCINES DEVELOPED IN MEXICO.</b>	
S. D. Rodríguez, M. A. García Ortiz, R. Aboytes Torres, G. J. Cantó Alarcón, N. Santos Cerda.....	211
<b>PREVALENCE OF <i>Otobius megnini</i> AND <i>Anocentor nitens</i> IN EQUINE OF THE LIENZO CHARRO AND COLONY OF BACHIGUALATO CULIACAN, SINALOA, MEXICO.</b>	
Gaxiola C S M, Borbolla I J E, Quintero M M T, Rentería G R, Aceves L R, Guerrero L A P, Velarde P J L, Zazueta G A O. ....	223
<b>NATURAL TICK INFESTATION OF <i>Boophilus microplus</i> IN CATTLE IN THE MUNICIPALITY OF CULIACAN, SINALOA, MEXICO.</b>	
Gaxiola C. S. M., Quintero M. M. T, Rodríguez M. J, Borbolla I. J. E, Castro del C. N, Rubio R. M.C. ....	225
<b>ACUTE DERMATITIS IN SWINE CAUSED BY INSECT BITES.</b>	
Robert D. Glock; S. C. Henry.....	227
<b>IMPORTANCE OF IXODES TICKS ON WILD RODENTS.</b>	
Quintero T. M.....	229

SURVEY ON ATTITUDES AND PRACTICES OF BOVINE PRODUCERS IN THE CONTROL OF <i>Boophilus microplus</i> RESISTANCE TO IXODICIDES IN THE STATE OF CHIAPAS, MEXICO. Sánchez Z L M, Mejía E F, Granjeno G, García V Z, George J. ....	237
ISOLATION OF BM95 FROM THE CATTLE TICK, <i>Boophilus microplus</i> A MORE UNIVERSAL ANTIGEN FOR THE CONTROL OF TICK INFESTATIONS. José C. García-García, Carlos Montero, Miguel Redondo, Milagros Vargas, Mario Canales, Oscar Boue, Manuel Rodríguez, Marisdania Joglar, Héctor Machado, Mario Valdés, Luis Méndez.....	238
RESULTS OF THE INTEGRATED CONTROL IN MEXICO AGAINST THE TICK GENUS <i>Boophilus</i> USING THE RECOMBINANT VACCINE GAVAC Julián Lona, Miguel Redondo, Felipe Avila, Gustavo Vázquez.....	239
RESULTS OF THE INTEGRATED CONTROL IN CUBA AGAINST THE TICK <i>Boophilus microplus</i> USING THE RECOMBINANT VACCINE GAVAC. Miguel Redondo, Luis Mendez, Emerio Serrano, Mario Valdez, Carlos Montero, Milagro Vargas, Manuel Rodríguez, Ricardo Leonard, Rogelio Oliva, Jorge Artilés.....	240
THE USE OF MOXIDECTIN IN THE STRATEGIC CONTROL OF RESISTANT BLUE TICKS IN SOUTH AFRICA A. Du Plessis, R. J. Peter.....	241
SUSCEPTIBILITY TO ORGANOPHOSPHATES IN HORN FLY POPULATIONS ( <i>Haematobia irritans</i> ) RESISTANT TO PYRETHROID AND THE MANAGEMENT OF INSECTICIDE RESISTANCE Ortiz Estrada Martín, Franco Bello Rubén.....	242

## PROLOGO

En los tiempos actuales donde el mundo vive un proceso de mundialización en diferentes procesos comerciales, la producción de alimentos de origen animal no ha quedado al margen, por lo que el proceso establece una mayor competitividad en los sistemas de producción, y limitantes en su comercialización, y uno de los factores más importantes es la salud animal y especial referencia merecen los artrópodos, insectos y hemoparásitos que afectan la ganadería bovina en el mundo.

Actualmente existe una corriente de control integral de enfermedades con objeto de hacer más eficiente y rentables los procesos productivos de carne, por lo que es necesario conocer la biología, epidemiología, farmacología, biotecnología y otras materias afines en forma actualizada e integrada que permitan establecer estrategias generales de control de enfermedades y plagas como son: las garrapatas *Boophilus microplus*, mosca del cuerno *Haematobia irritans* y parasitosis como la babesiosis y anaplasmosis bovina que se encuentran en forma endémica en las regiones tropicales y semitropicales de muchos países, causando pérdidas en la producción, y comercialización.

La generación de conocimientos científicos y nuevas estrategias tecnológicas se han venido desarrollando en diversas partes del mundo y el intercambio de esta información forma la base para lograr una mejor integración del control de las enfermedades parasitarias. El objetivo de la presente reunión es conocer los avances realizados en diversas partes del mundo, en las diversas áreas del conocimiento aplicables al control de estas enfermedades que permitan un desarrollo sostenible y sustentable de la actividad pecuaria en los diferentes países afectados.

Es menester reconocer la calidad científica y temas que abordan los participantes en esta reunión, que, aplicados por profesionistas y productores acorde a las diferentes realidades en el mundo, es seguro que habrán de tener una gran contribución al mejoramiento de la eficiencia productiva, calidad, y rentabilidad de las ganaderías en el mundo.

Zeferino García Vázquez  
Hugo Fragosó Sánchez



**ESTRATEGIAS PARA EL CONTROL DE LA GARRAPATA EN UN MUNDO DE RESISTENCIA A ACARICIDAS.**

**STRATEGIES FOR TICK CONTROL IN A WORLD OF ACARICIDE RESISTANCE**

**D H KEMP\*, R V MCKENNA\*, R THULLNER\*\*, P WILLADSEN \*\***

*\* CSIRO Tropical Agriculture  
Molecular Animal Genetics Centre  
Level 3  
Gehrmann Laboratories  
University of Queensland  
St Lucia Qld 4072  
Australia*

*Phone: 61 7 3214 2467 Fax: 61 7 3214 2480*

*Email: [Peter.Willadsen@tag.csiro.au](mailto:Peter.Willadsen@tag.csiro.au)*

*\*\*Alte Obervolkacherstr. 9 D-97332 Volkach Germany*

I.	Introduction.....	1
II.	Management of amitraz resistance.....	2
III.	Vaccine-acaricide synergies.....	4
IV.	Summary.....	6
V.	Reference.....	6
	Tabla 1.....	8
	Figura 1.....	9
	Figura 2 .....	10

**I. INTRODUCTION**

Development of the resistance of *Boophilus microplus* to acaricides in use in Australia is well known and well documented. Resistance to organophosphates (OP) is very widespread. There is only one (OP) acaricide left in the market and its use is limited. Resistance to synthetic pyrethroids appeared within three to five years of commercial release in the form of at least two resistance patterns: Lamington, a specific flumethrin resistance and Parkhurst, a broad spectrum resistance to such synthetic pyrethroids as cypermethrin, deltamethrin, fenvalerate and including flumethrin. This resistance either spread extremely rapidly or was selected for inadvertently but repeatedly in many localities and, together with concerns about chemical residues, was largely responsible for a decline

in use of synthetic pyrethroids. More recently, the Ultimo strain of tick has appeared, a strain showing broad spectrum synthetic pyrethroid and amidine resistance and some OP resistance.

The responses to this situation have been twofold. Firstly, there has been a dramatic return to the use of amitraz despite some perceived disadvantages. Approximate estimates from market volume would suggest that in excess of 50% of all acaricide treatments made on cattle in Australia for the control of *Boophilus microplus* use amitraz. Secondly, historically, producers when faced with an emerging resistance problem have moved on to another class of chemical or a new treatment. This has also happened in current circumstances. Novel treatments that have become available over recent years include the tick vaccine TickGARD, the tick growth regulator Acatak and a variety of macrocyclic lactone acaricides. Fipronil (Frontline, Topline) products have not yet been registered for cattle tick control in Australia.

Neither of these responses is ideal. Amitraz resistance, though it was first reported in Australia in 1982, spread very slowly. It was our expectation that an increased use of amitraz was likely to lead to an escalation in reports of amitraz resistance. To some extent this appears to have taken place. Between 1982 and the mid-1990s, the appearance of new cases of amitraz resistance was rare. Over recent years, there has been an acceleration, and now there are over fifty apparently independent reports. The majority of these are of Ultimo phenotype, namely with broad spectrum SP and amitraz resistance. Products such as the macrocyclic lactones are effective but expensive and the cost is a deterrent for many producers. Products such as Acatak are again effective, but with significant disadvantages for some markets. There is still a relatively extended withholding period for calves and the treatment cannot be used on milking dairy cattle in Australia.

There is in Australia no program, State or National, for the control of resistant ticks. Movement of tick infested cattle in known tick infested areas is not restricted by more than a warning to farmers of the consequences of introducing resistant ticks. There is a National Registration Authority that provides a thorough registration process for new acaricides. There is an effective acaricide resistance testing service that advises farmers on alternative acaricides able to control resistant ticks. Such advice is available from state agricultural extension services as well, and from commercial companies too. Nevertheless, responsibility for resistance control devolves to the farmer. It is also unfortunate that in Australia, little funding is available for research into management of acaricide resistance. Researchers in CSIRO, State Government Departments and Universities to do what they can to assist the farmers in solving their tick problems but resources are limited.

The following work describes two different responses to the issue of managing acaricide resistance.

## II. MANAGEMENT OF AMITRAZ RESISTANCE

In Australia the frequency with which resistance to amitraz has appeared in new geographic locations has been low. This contrasts with resistance to synthetic pyrethroids. The conventional explanation of this is that the generation of resistance to amitraz, for example by mutation in the target and subsequent selection of a resistant genotype, was a rare and perhaps unique event in Australia. It is also assumed that the generation of full amitraz resistance is likely to arise by the selection of these relatively rare heterozygous ticks through ongoing acaricide usage. These will then interbreed to give rise to highly resistant homozygous ticks. Supporting evidence for this model is lacking, and there are unanswered questions and alternative possibilities. The rarity of amitraz resistance may be because it is a polygenic trait. There is some evidence suggestive of this. Firstly, resistance is routinely diagnosed using a larval packet test. Probit analysis using the larval packet test is very satisfactory for organophosphate and synthetic pyrethroid resistance, but is far less satisfactory for amitraz when non-linear responses are usually seen. Secondly, emerging amitraz resistance as diagnosed using the packet test is, in our experience, frequently unstable. Analysis of successive field samples from properties in which amitraz resistance is suspected frequently gives inconsistent results. Thirdly, it is known that amitraz itself seems to have at least two effects on tick larvae. It induces hyperactivity and detachment from the host (Stone *et al.*, 1974); it also produces larval mortality. The concentrations of amitraz at which these effects are seen differ by several orders of magnitude. These three factors may suggest that resistance is not necessarily a single gene effect.

There are further questions, both practical and theoretical. Given that amitraz causes both mortality and hyperactivity leading to tick dispersal, are these in fact related? If not, which, if either, of these two characteristics would be the better indicator of emerging field resistance? More critically, it is not known whether heterozygous amitraz resistant ticks have a selective advantage on chemical treatment, that is, whether they show any significantly enhanced level of survival. If resistance is fully recessive, this may go far to explaining the low incidence of amitraz resistance over many years. Taken together, these doubts make it difficult to accurately diagnose and respond to emerging amitraz resistance. We have therefore attempted to clarify some of these issues.

The tick strains used in this work were Yeerongpilly, a fully susceptible strain of *Boophilus microplus* used in the laboratory for many years and Ulam and Ultimo, both amitraz resistant strains which have been selected repeatedly with amitraz, and are assumed to be homozygous for amitraz resistance. Heterozygous ticks were prepared by culturing Yeerongpilly, Ulam and Ultimo ticks separately on individual cattle and then carrying out a controlled mating on a third animal using both males and females as sources of the resistant genes. Larval packet tests were performed by using standard methods (FAO, 1984). Dispersal tests were performed as described elsewhere (Thullner *et al.*, manuscript in preparation).

Larval packet tests suggested that heterozygous ticks showed a dose mortality pattern intermediate between the fully susceptible and the fully resistant ticks, that is suggesting that resistance was semi-dominant. Larval dispersal tests suggested that the heterozygous ticks were indistinguishable from the fully susceptible ticks and very different from the fully resistant (Figure 1). This underlines the complexity of amitraz resistance and made it essential to perform infestation trials on cattle.

Two trials were carried out and the results are summarised in Table 1. In the first trial, all animals were infested with 1,000 larvae on six separate days and on day 23 after the initial infestation, the groups of cattle infested with Ulam, Yeerongpilly and hybrid ticks were treated with 0.025% commercial Tactic EC (amitraz) using a hand held power spray unit (90 psi) to thoroughly wet the animals using a recommended spray regime. The result showed that equivalent numbers of ticks from all three strains are matured on cattle prior to amitraz treatment. As expected, after treatment with amitraz the recovery of the fully susceptible Yeerongpilly ticks was extremely low, while the recovery of Ulam ticks was approximately 15 fold higher. The recovery of hybrid heterozygous ticks, while lower than for the Ulam strain (homozygous ticks), was still some 10 fold higher than for the fully susceptible strain of ticks and quite sufficient to give a selective advantage to the hybrid (heterozygote) ticks. The result was confirmed in a further trial, also reported in Table 1. In this trial the hybrids were between Yeerongpilly susceptible and the resistant Ultimo strain. Here an additional question was asked, namely whether a doubling in the concentration of amitraz would be sufficient to control the heterozygotes. The amitraz was applied with a power driven hand held spray, as before. The conclusions from this trial were similar. The survival of heterozygous ticks, though proportionally less than in the previous trial, was still significant and well in excess of the survival of the fully susceptible ticks. Doubling the concentration of amitraz improved this situation only slightly, both for the heterozygous and for the homozygous susceptible ticks. As an additional comment, it is interesting that despite the use of an experienced and well trained operator, there was significant survival even of fully susceptible ticks using a hand spray and both the recommended and double the recommended concentration of chemical. In both trials there was 98.1% control of susceptible ticks at the recommended concentration which is just above the percent control (98%) accepted by the Australian National Registration Authority. (For these calculations in trial 1, the untreated hybrids were used as the controls)

It has been proposed that one resistance avoidance strategy would be to increase acaricide concentrations to kill resistant heterozygous ticks in the population (Sutherst and Commins, 1979, Kunz and Kemp, 1994). However, in the case of amitraz, it is considered that further increases in the concentration of amitraz could lead to significant side effects in cattle (as well increases in costs). Therefore, in practical terms, the use of amitraz in the presence of heterozygous resistant ticks is likely to effectively select these ticks in the population and thus enhance the probability of generating a high level of homozygous resistance. Increasing the concentration within realistic limits will be of little advantage in the case of amitraz. The dominance of resistance to other acaricides needs to be determined so that the possibility of dose increase for resistance avoidance can be checked.



Another key question which remains is whether or not heterozygous or homozygous resistant ticks are biologically competitive with fully susceptible ticks in the absence of chemical selection pressure. In view of the importance of amitraz in the control of *Boophilus microplus* as a low cost, low residue acaricide, this is an important question to answer. A negative answer could mean that prompt withdrawal of amitraz treatment on properties where resistance was emerging would allow its re-use after a limited number of generations.

### III. VACCINE ACARICIDE SYNERGIES

The joint use of vaccine and acaricide has been part of the implementation of tick control through vaccination in Australia since first commercial release of the product TickGARD. Since the most striking effect of the vaccine is on the engorgement and egg laying of adult ticks, there is a time delay between vaccination and a reduction in the population of larval ticks in the field and the numbers of ticks on the animals. For that reason, if cattle are heavily tick-infested or heavy larval infestations exist in the field prior to vaccination, it has always been recommended that treatment of an acaricide could be used to provide short term control, before the longer term control through vaccination became effective.

Far more interesting in a scientific sense is the idea of synergy, that is, that the effect of combining two different treatments such as acaricide and vaccine could be greater than the sum of the individual effects. It is possible to imagine that an acaricide could be more effective just because of a general "weakening" effect of the vaccine on engorging ticks and vice versa. That is, synergy might arise despite the lack of any obvious causal relationship in the modes of action of vaccine and acaricide. More specifically and more interestingly, it is easy to imagine a direct mechanism by which vaccination could increase acaricide efficacy. It has long been known that the gut of ticks is not an impermeable barrier. It is known for example, that haemolytic antibodies will cross the midgut epithelium of *Ixodes ricinus* (Brossard and Rais, 1984) and that antibodies specific for *Theileria sergenti* will cross the digestive tract of both *Ornithodoros* and *Haemaphysalis* ticks (Fujisaki, Kamio and Kitaoka, 1984). It is further known that the passage of bovine immunoglobulin and albumin across the gut of ticks is enormously enhanced in ticks feeding on vaccinated cattle (Tracey-Patte, Kemp and Johnston, 1987). In fact, the enhanced leakage of bovine serum albumin and of dyes conjugated to bovine serum albumin has been used as an *in vitro* measure of vaccine induced gut damage (Kemp, Pearson, Gough and Willadsen, 1989). This enhanced permeability of the gut may well lead to the delivery of higher effective concentrations of acaricide to the target within the tick, particularly in the case of acaricides that are in blood or are bound to blood protein. Another explanation, though less plausible, is that an acaricide may render tick gut cells more susceptible to attack by cells from the vaccinated host. Ivermectin has been shown to enhance the effects of neutrophil attack on microfilariae (Zahner *et al.* 1997).

The occurrence of such synergy is not axiomatic however; even an additive effect may not occur. One of the effects of the tick vaccine is to reduce feeding and to reduce the

volume of blood taken up. The same is seen with some acaricides. Therefore it is entirely possible that combined acaricide and vaccine treatments could be antagonistic.

The interest in investigating such effects is twofold. Firstly, cattle producers are likely to combine chemical and vaccine treatments regardless of the specific recommendations made for product usage. Secondly, some of the newer acaricides, in particular some of the macrocyclic lactones, while highly effective have relatively short periods of protection and are quite expensive. Synergistic effects between two treatments may well increase the cost effectiveness of both of them.

Two trials have been performed. In the first, groups of seven cattle were heavily infested with *Boophilus microplus* larvae from the field and from artificial infestations using a standard protocol. There was an approximately 10 fold reduction in the number of ticks engorging on cattle treated with Cydectin pour-on that had also been vaccinated, relative to the group treated with Cydectin alone. When the additional effects of the combined treatments on egg laying were taken into account, the difference resulting from vaccination was increased to 20 fold. The results are shown in Figure 2. The effective protection period was extended from approximately 15 days to 39 days. The second trial, which was conducted with Dectomax pour-on, was consistent with this result (Figure 2) though it was conducted with only 3 animals per group. Between 5 and 35 days post treatment, the egg production in the group vaccinated with TickGARD was 12.5% of that of the controls; for the group treated with Dectomax pour-on, 4.7% while for the group receiving both treatments the egg production was reduced to 0.9%. While the result is consistent with either an additive or a synergistic response, the results with tick numbers are more suggestive of real synergy. Between 20 and 40 days post-treatment, tick yield on TickGARD vaccinated cattle was 36% relative to controls, an expected result given that the major effect is on tick weights and egg laying. The yield from Dectomax-treated cattle was 9.3%. A simple additive effect might suggest the combined acaricide and vaccine treatments would reduce tick numbers to 4.6%. In fact, the reduction was to a yield of only 0.7%.

This experiment was biased against showing the maximum effect of vaccination, since the booster vaccination and acaricide treatment were given on the same day; a procedure however that is likely to be adopted by a cattle producer. In the same trial, groups of three vaccinated and non-vaccinated cattle were treated with half strength Acatrak (fluazuron) and fipronil, in an attempt to detect additive or synergistic effects. There was no significant difference in the yield of ticks or eggs, or in the duration of protection. There was no indication of synergy with the vaccine. Although the data is limited, the results suggest that the benefits of combined acaricide and vaccine treatments will be seen selectively and must be investigated on a case by case basis.

Combining vaccine with acaricides has the potential to reduce the number of acaricide treatments needed for seasonal control of ticks and hence to reduce the risk of selection for resistance. Alternatively, synergy of vaccine and acaricide may also provide opportunities

for reducing acaricide concentrations and reducing withholding periods prior to sale of livestock.

#### IV. SUMMARY

In Australia, the repeated emergence of amitraz resistant ticks poses a problem for the farmer, both in terms of delaying that resistance, if possible, and in finding alternative, acceptable means of tick control. The results presented here show that resistance is, indeed, likely to arise through selection of ticks heterozygous for the resistance mechanism. The extent to which such ticks persist in the field in the absence of ongoing amitraz usage is an important question to which we currently have no answer. It is further shown that joint usage of tick vaccine and some macrocyclic lactone acaricides has the potential to lead to greatly enhanced efficacy and hence, perhaps, greater cost effectiveness.

#### V. REFERENCES

- Brossard, M. and Rais. O. (1984) Passage of hemolysins through the midgut epithelium of female *Ixodes ricinus*. L. fed on rabbits infested or reinfested with ticks. *Experientia* 40, 561-563.
- FAO (1984) Ticks and Tick-Borne Disease Control. A practical Field Manual Vol. 1, Chapter 5, Acaricide Resistance, pp 246-299.
- Fujisaki, K., Kamio, T., and Kitaoka, S. (1984) Passage of host serum components, including antibodies specific for *Theileria sergenti*, across the digestive tract of argasid and ixodid ticks. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 78, 449-450.
- Kemp, D.H. *et al.* (1989) Vaccination against *Boophilus microplus*: Localization of antigens on tick gut cells and their interaction with the host immune system. *Exp. Appl. Acarology* 7, 43-58.
- Kunz, S.E. and Kemp, D.H. (1994) Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev. sci. tech. Off. Int Epiz.* 13, 1249-1286.
- Stone, B.F., Atkinson, P.W. and Knowles, C.O. (1974) Formamidine structure and detachment of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 4, 407-416.
- Sutherst, R.W. and Comins, H.N. (1979) The management of acaricide resistance in the cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) in Australia. *Bull. Entomol. Res.* 69, 519-540.
- Tracey-Patte, P.D., Kemp, D.H., and Johnston, L.A.Y. (1987) *Boophilus microplus*: passage of bovine immunoglobulins and albumin across the gut of cattle ticks feeding on normal or vaccinated cattle. *Res. Vet. Sci.* 43, 287-290.
- Zahner, H., Schmidtchen, D., and Mutasa, J.A. (1997) Ivermectin-induced killing of microfilariae *in-vitro* by neutrophils mediated by NO. *Exp. Parasitol.* 86, 110-117.

**Table 1.** Efficacy of amitraz treatment on susceptible, resistant and heterozygous ticks

<b>Group</b>	<b>Tick no. Before amitraz</b>	<b>Tick no. after amitraz</b>
<b>Trial 1</b>		
Yeerongpilly plus amitraz	1654	19 (98.1% control)
Ulam plus amitraz	1407	312 (69.1% control)
Hybrid untreated	1368	1010
Hybrid plus amitraz	1307	217 (78.5% control)
<b>Trial 2</b>		
Yeerongpilly untreated	1177	3695
Yeerongpilly plus amitraz	956	71 (98.1% control)
Yeerongpilly plus 2*amitraz	844	31 (99.2% control)
Hybrid untreated	1346	4521
Hybrid plus amitraz	1227	353 (92.2% control)
Hybrid plus 2*amitraz	1115	209 (95.4% control)

In Trial 1, the tick numbers for four days prior to treatment were added. All animals were infested with 1000 larvae on days 1,3,6,9,14 and 16 and ticks collected from days 20 to 38. Acaricide treatment was on day 23. The hybrid ticks were generated by crossing susceptible Yeerongpilly females with resistant Ulam males.

In Trial 2, the tick numbers for four days prior to treatment were added. All animals were infested with 5,000 larvae on days 1,4,8,11,14 and 17 and ticks collected from day 20 to 45. Acaricide treatment was on day 23. The hybrid ticks were generated by crossing susceptible Yeerongpilly males with resistant Ultimo females.

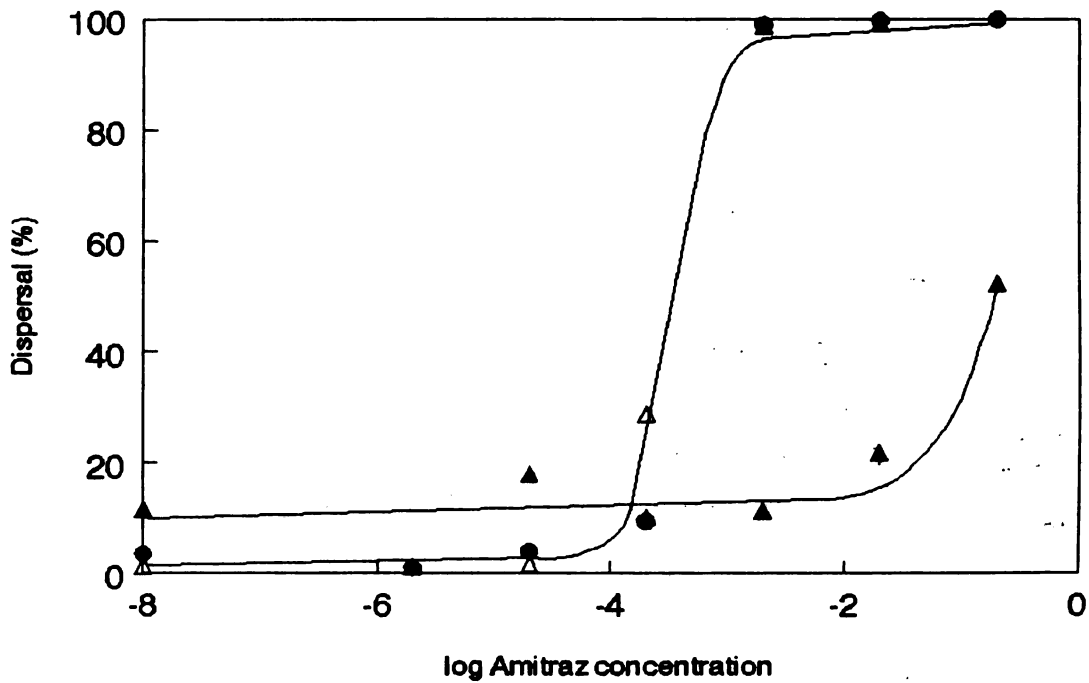
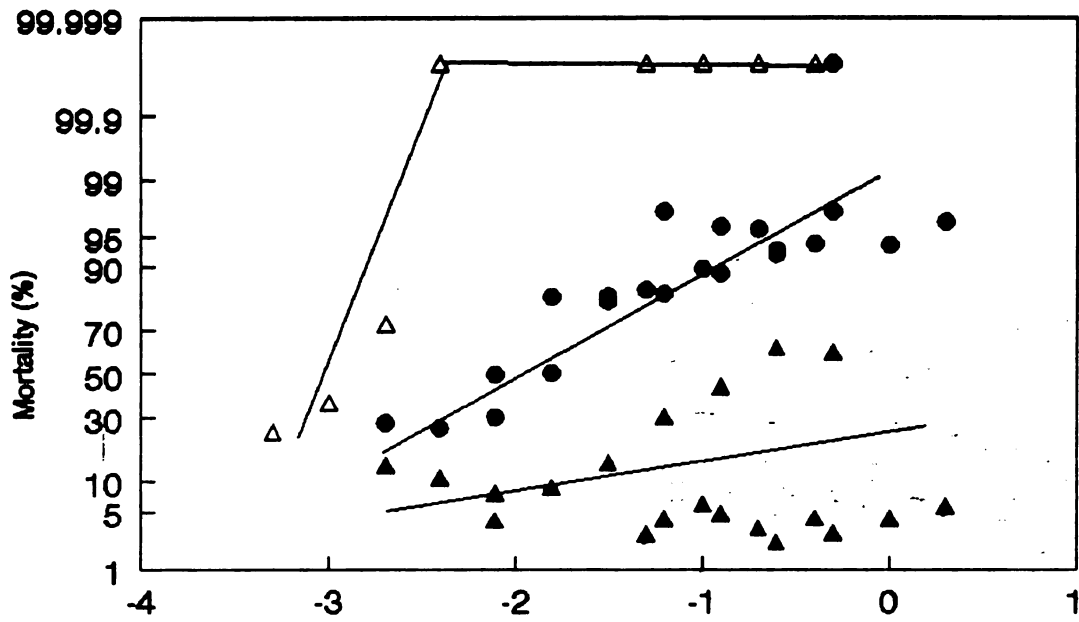


Figure 1. Larval packet tests (upper figure) and dispersal tests (lower figure) using amitraz against susceptible ( $\Delta$ ) resistant ( $\blacktriangle$ ) and heterozygous ( $\bullet$ ) ticks.

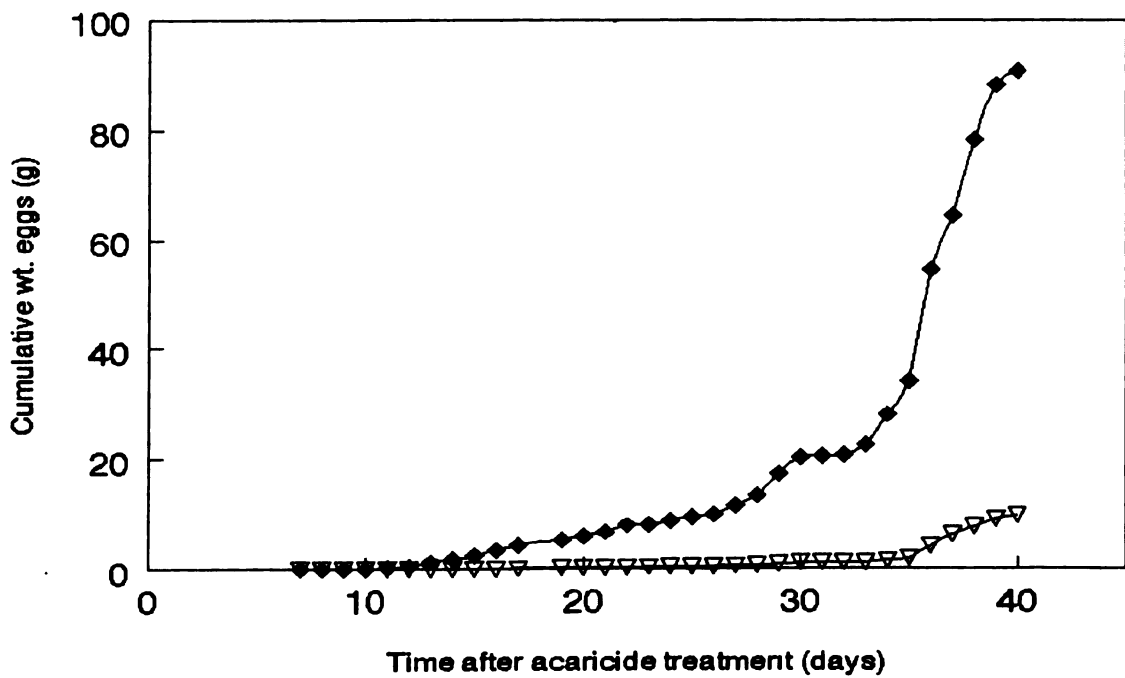
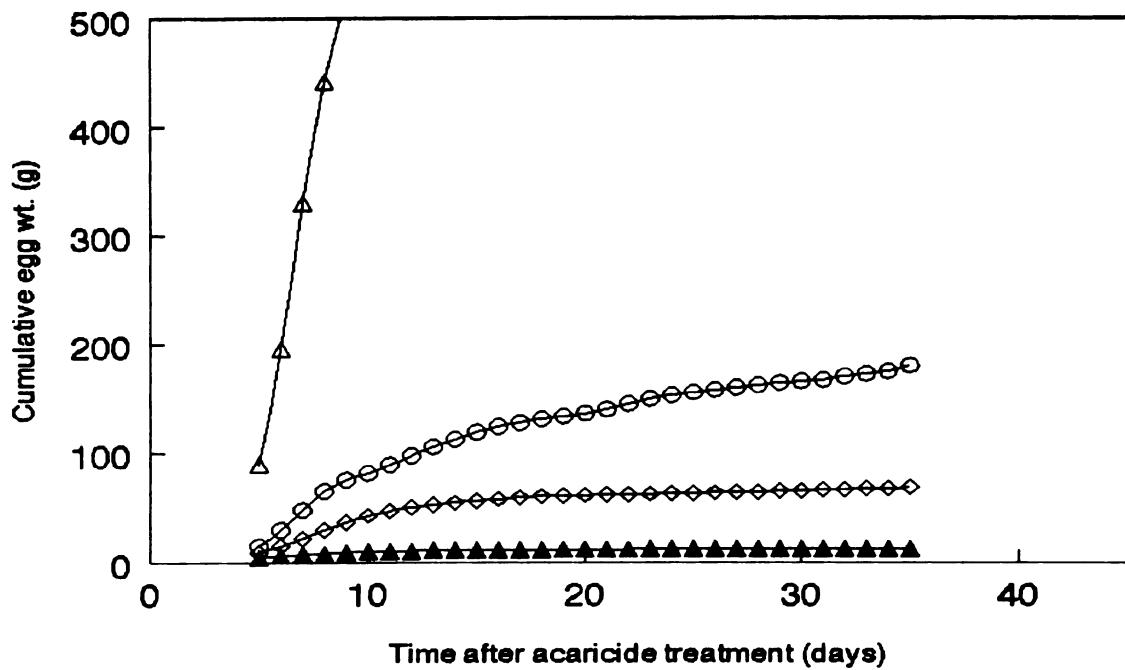


Figure 2. Upper figure: cumulative egg production from tick infestations on groups of three cattle which were untreated ( $\Delta$ ), vaccinated with TickGARD ( $\circ$ ), treated with Dectomax ( $\diamond$ ) or receiving both treatments ( $\blacktriangle$ ). Lower figure: cumulative egg production on groups of seven cattle either vaccinated with TickGARD ( $\blacklozenge$ ) or non-vaccinated ( $\triangleright$ ) and subsequently treated with Cydectin.

**SITUACION ACTUAL DE LA GARRAPATA *Boophilus microplus* (ACARI: IXODIDAE) EN COSTA RICA. SITUACIÓN DE OTRAS GARRAPATAS.**

**CURRENT STATUS OF THE TROPICAL, CATTLE TICK *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) IN COSTA RICA. OTHER TICK'S SITUATIONS.**

VÍCTOR ALVAREZ C.

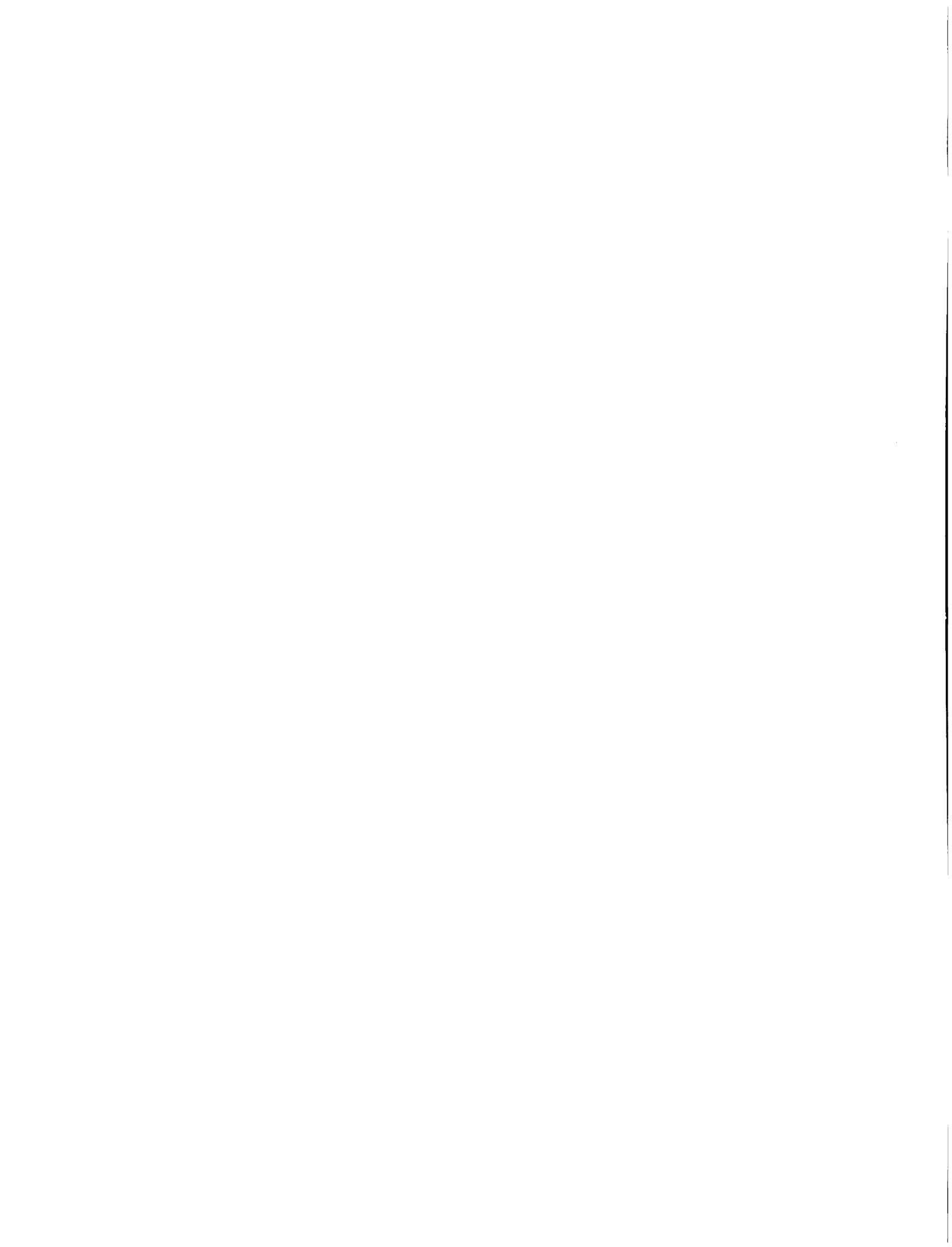
*Ministerio de Agricultura y Ganadería*

I. Introducción.....	11
II. Políticas Oficiales.....	12
A. Legislación.....	12
B. Normas de Registro de Acaricidas.....	13
III. Control de la garrapata.....	13
A. Especies de Importancia Pecuaria.....	13
B. Métodos de Control de la Garrapata.....	14
C. Estado de la Resistencia.....	14
IV. Estudios de dinámica de población.....	15
A. Distribución de <i>Amblyomma cajennense</i> .....	15
B. Comportamiento poblacional de garrapatas.....	16
V. Resumen.....	17
VI. Summary.....	17
VII. Referencias.....	17
Cuadro 1.....	19
Cuadro 2 y 3.....	20
Cuadro 4.....	21
Figura 3 .....	21
Cuadro 5, 6.....	22
Figura 1 y 2.....	23

**I. INTRODUCCIÓN**

Costa Rica es un país tropical ubicado entre los 11°13'12" de latitud norte y los 8°2'26" de latitud sur y los 82°33'48" de longitud este y los 85°57'57" de longitud oeste y se caracteriza por una gran variedad de microclimas y alrededor de 24 zonas ecológicas. La ganadería bovina cuenta con cerca de 2 millones de cabezas, siendo el sector lechero el que cuenta con la mejor tecnología e infraestructura. En los últimos años el sistema de producción de doble propósito se ha extendido bastante, en especial en las zonas bajas, húmedas y cálidas.

Gracias a las condiciones climáticas que imperan en gran parte del territorio nacional, la garrapata *Boophilus microplus* ha encontrado condiciones muy favorables para su





desarrollo, siendo la principal especie, seguida de *Amblyomma cajennense* (Anónimo, 1980).

En los años 70' se desarrolla, en Costa Rica, un proyecto denominado "Estudio de factibilidad para el control de la garrapata", ejecutado por el Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) y financiado por el Banco Centroamericano de Integración Económica (BCIE) y la Organización de Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). El Proyecto realiza una amplia investigación sobre la situación de la garrapata y las enfermedades por ella transmitidas, dictando, al concluir, una serie de recomendaciones. Desgraciadamente, al concluir el financiamiento externo, el Proyecto fue descuidado y se perdió la infraestructura creada, incluyendo los recursos humanos preparados durante su ejecución, las experiencias generadas y el material biológico obtenido.

Durante cerca de 20 años el país no llevó a cabo ningún trabajo de investigación relacionado con garrapatas de importancia pecuaria. Sin embargo, durante la década de los 90' se ejecutaron diferentes investigaciones que permitieron conocer la distribución y algunos factores de riesgo de las hemoparasitosis transmitidas por garrapatas y establecer la situación de estabilidad (inestabilidad) epidemiológica de algunas zonas (Pérez *et al.* 1994a, Pérez *et al.* 1994b, Hermans *et al.* 1994, Pérez *et al.* 1996, Alvarez y Herrero, 1996, Alvarez *et al.* 1996, Herrero *et al.* 1998).

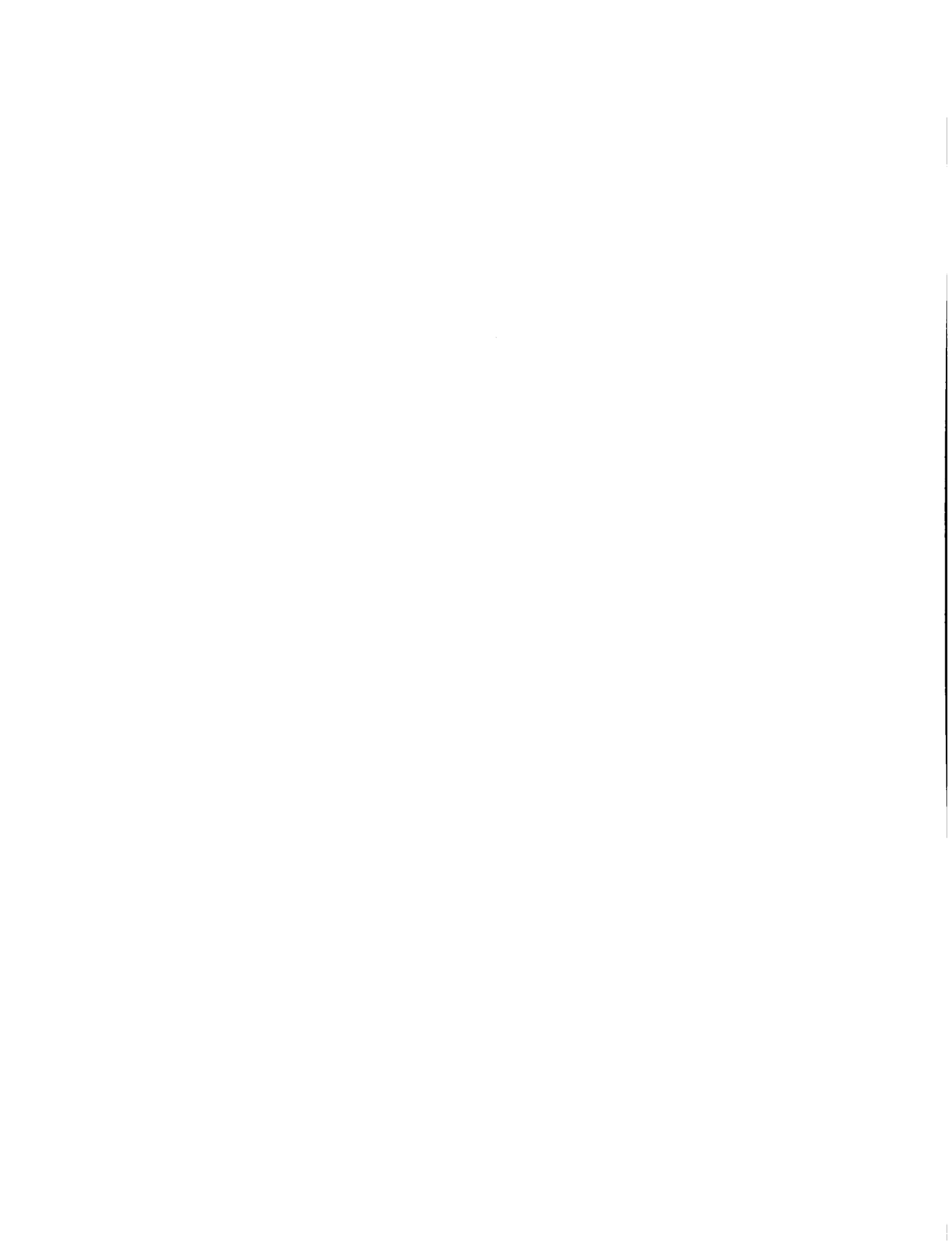
Finalmente en 1997, el MAG decide iniciar algunos trabajos sobre garrapatas entre los que se incluye estudios de resistencia, distribución de especies de garrapatas de importancia pecuaria y dinámica de población. Por otro lado, un Proyecto de hemoparásitos, aprobado por la Agencia Internacional de Energía Atómica (AIEA), financió la adquisición de equipo básico para establecer un laboratorio. Asimismo, para ese momento ya se habían construido unas modernas instalaciones que permitían ubicar el equipo adquirido y establecer, en un amplio sentido de la palabra, el laboratorio requerido para realizar los trabajos de investigación en garrapatas.

El objetivo del presente artículo es presentar la situación actual de la problemática de la garrapata en Costa Rica, a la luz de los trabajos realizados en los últimos tres años.

## II. POLÍTICAS OFICIALES

**Legislación.** Los diferentes instrumentos legales que puedan relacionarse con la Salud Animal (Ley General de Salud, Ley de Salud Animal), no contemplan ninguna disposición especial con relación al combate de la garrapata. La guía para transporte de animales dentro del territorio de la república tampoco cita nada con el fin de tomar medidas preventivas para evitar la dispersión de garrapatas. El Proyecto ejecutado por el MAG en la década de los 70' señala la necesidad de que el Estado dicte las políticas de control de la garrapata, sin embargo, esta recomendación nunca fue acogida.

El estado de abandono en que se encuentra el control de la garrapata, en cuanto a políticas oficiales se refiere, provoca que esta sea una actividad exclusiva del ganadero. De esa forma el ganadero aplica el acaricida como mejor le parezca, el ixodicida que considere,



sin ninguna orientación técnica en cuanto a los baños, lleva a cabo los traslados de ganado sin tomar medidas para evitar la dispersión de las garrapatas, etc.

**Normas de registro de acaricidas.** No existe un estatus especial o diferente para la inscripción de ixodicidas, sino que su inscripción se realiza de la misma forma que cualquier otro medicamento. El capítulo IV del Reglamento de Inscripción, Constatación de Calidad y Fiscalización de Medicamentos Veterinarios de la Ley de Salud Animal se encarga de normar la inscripción de los diferentes medicamentos veterinarios. Básicamente, el Reglamento contempla solo la presentación de diferentes documentos (solicitud de inscripción, datos relacionados con el solicitante, información vinculada con el medicamento a inscribir y otros de carácter administrativo), además, se deben adjuntar dos muestras físicas del producto (Anónimo, 1997).

Una vez concluidos los trámites administrativos del proceso de inscripción se solicitan muestras físicas complementarias para efectuar los análisis químicos.

El capítulo VI de dicho Reglamento, en su artículo 40, señala una serie de disposiciones vinculadas con la inscripción de los plaguicidas, sin embargo, todas ellas están dirigidas a exigir, de manera clara, se indiquen en la etiqueta las calidades del producto, formas de aplicación, advertencias sobre el uso y disposición de los envases, etc. (Anónimo, 1997).

La legislación vigente no incluye pruebas de eficacia (pruebas de laboratorio, establo o ensayos de campo), aprovechando la infraestructura y experiencia desarrollada por el MAG, para la inscripción de nuevos acaricidas y no mantiene ningún control sobre la calidad de los inventarios que están a disposición del productor.

Es interesante hacer notar el artículo 27 del Reglamento cuando habla sobre la posibilidad de que es factible denegar o cancelar la inscripción de un medicamento veterinario, entre otras razones, “cuando se considere necesario mantener el producto como una reserva terapéutica” o “cuando existan razones epizootiológicas que así lo justifiquen” (Anónimo, 1997). Sin embargo, llevar a la práctica tales postulados es muy difícil por los intereses comerciales que podría afectar, lo que convierte esos párrafos en letra muerta o inaplicables.

Es urgente la necesidad de efectuar cambios en la legislación que regula la inscripción de sustancias para el control de la garrapata con el fin de lograr un mayor control sobre la eficacia de los productos. Además, es importante asegurarse que los productos ya inscritos cumplan no solo con las características estipuladas en la etiqueta, sino también, que sean eficaces.

### III. CONTROL DE LA GARRAPATA

**Especies de Importancia Pecuaria.** Diferentes estudios han determinado para Costa Rica que las especies que presentan la mayor distribución son *B. microplus* y *A. cajennense* (Anónimo, 1980, Alvarez *et al.*, 1999 (a), Alvarez *et al.*, 1999 (b)). Sin embargo, otras especies de garrapatas han sido reportadas parasitando bovinos, aunque se encuentran en

menor grado: *Dermacentor spp.*, *A. maculatum*, *A. inornatum*, *Ixodes spp.* (Alvarez, datos sin publicar). El estudio del MAG de los años 70 señala, aparte de los arriba citados, a *A. inornatum* y *Anocentor nitens* (Anónimo, 1980).

Es importante señalar la necesidad de realizar estudios que permitan conocer el impacto real de las diferentes especies de garrapatas en las diversas zonas del país y épocas del año, con el fin de fijar políticas de control de esos ectoparásitos.

**Métodos de control de la garrapata.** Los trabajos de Pérez y Alvarez (1995) y Alvarez *et al.* (1999 b), muestran claramente que el método exclusivo de combate de la garrapata es el químico, para el cual se utiliza la bomba de espalda accionada manualmente (baños de aspersión). Realmente, no son significativas las cantidades de productores que utilizan otros sistemas de control: el baño de inmersión, el trapo humedecido o la bomba de motor. En el Proyecto del MAG se indica que en los años 70 estaban registrados en el país, aproximadamente 13 marcas comerciales (Anónimo, 1980). En estos momentos están inscritos ante el Departamento de Registro de Medicamentos Veterinarios más de 50 productos que son utilizados por el productor para el control de la garrapata (sin contar los de pequeñas especies) (Cuadro 1).

El uso indiscriminado de la bomba de espalda, accionada manualmente, para el control de la garrapata y, las desventajas que este sistema tiene (dosificaciones, premezclas, cansancio para el operador, desconocimiento de la forma correcta de baño, número de animales a bañar), obligan a promover una campaña de educación que permita al productor mantener el equipo en óptimas condiciones al momento de efectuar el baño de aspersión (boquilla correcta, presión adecuada, etc.) y así, al menos, disminuir un poco los problemas propios de la utilización de la bomba de espalda.

Es definitivo que el abandono de las políticas orientadas hacia el control de las garrapatas, por parte del Estado, provocó una ausencia total de investigación y de directrices que señalaran las posibilidades de implementar otras alternativas de control (biológico, uso de animales resistentes, manejo, etc.). Tal situación ha provocado que el único sistema de control empleado por el ganadero sea el químico, obviando conceptos modernos y de gran valor como el Manejo Integrado de Plagas (Kemp *et al.* 1998).

**Estado de la Resistencia.** En Costa Rica se han realizado pocos trabajos que demuestren la situación de la resistencia a los acaricidas (Alvarez y Herrero, 1996). Básicamente, a nivel de campo se realizó una investigación en 10 fincas para determinar la resistencia desarrollada al coumaphos (Solano 1979) y recientemente se tomó una muestra de 21 fincas para evaluar la situación de los fosforados, piretroides y amidinas (Hagen 1997). Por otro lado, se llevaron a cabo tres evaluaciones *in vitro* de eficacia de acaricidas (Zamora 1988, Alvarado 1989, Temponi 1993).

Solano (1979) reporta una incipiente manifestación de resistencia al coumaphos, sin embargo, Hagen dice no encontrar resistencia alguna a los fosforados y amidinas, aunque sí a los piretroides.

El MAG ha concluido un estudio para determinar el estado de la resistencia a los acaricidas organofosforados y piretroides sintéticos por parte de la garrapata *B. microplus* (Alvarez *et al.*, en revisión). El mencionado trabajo fue un estudio de corte transversal basado en el Censo Nacional de 1984 sobre una población de 27076 fincas, con una prevalencia asumida de 50%, un error aceptable de 5% y una confianza de 99.5%. El trabajo, sin embargo, por razones ajenas a nuestra capacidad, se realizó en 415 fincas a nivel nacional.

La prueba de paquete de larvas fue la utilizada para el diagnóstico de la resistencia (recomendada por FAO). El CENAPA de México proporcionó la cepa de referencia y se trabajó con las dosis discriminantes determinadas por ellos.

La investigación desarrollada por el MAG demostró una amplia distribución de la resistencia por parte de la garrapata *B. microplus* a los piretroides sintéticos, la cual alcanza desde niveles muy bajos (1-25%) hasta el 100% a cerca del 81% de las fincas del país (Fig. 2). Por el contrario solo un porcentaje muy bajo de las muestras procesadas presentó algún grado de resistencia a los organofosforados y es de recalcar que la mayoría de esas fincas manifestaron niveles superiores al 90% de mortalidad (Fig. 1). No se realizaron pruebas para determinar la resistencia a las amidinas.

Ese mismo estudio demostró fallas en el manejo de los acaricidas: ausencia de premezcla del acaricida al momento de la aplicación (Cuadro 2), mecanismos poco confiables para medir las dosis de ixodicida (desde la probeta graduada hasta el "cálculo"), exceso de animales bañados por bomba de espalda (Cuadro 3), una alta presión de baño sobre la población de garrapatas sin que se cuente con verdadero respaldo que justifique el mantener periodos de baño cerrados (Cuadro 4).

La investigación sobre el estado de la resistencia permite concluir en la necesidad, a la mayor brevedad posible, de llevar a cabo una campaña de educación del productor pecuario, vendedores de insumos para el control de la garrapata y médicos veterinarios en cuanto al manejo correcto de los ixodicidas.

Otras conclusiones que permite sacar el estudio son: mantener una vigilancia permanente sobre la resistencia, establecer pruebas complementarias de manera rutinaria, caracterizar cepas nacionales para el desarrollo de futuros trabajos, efectuar cambios drásticos en cuanto a la inscripción de garrapaticidas y fijar disposiciones legales en cuanto al transporte de animales. En resumen, el estado debe establecer una política clara en cuanto al control de la garrapata.

#### IV. ESTUDIOS DE DINÁMICA DE POBLACIÓN

**Distribución de *A. cajennense*.** Gracias al estudio de Resistencia a los Acaricidas fueron remitidas al laboratorio gran cantidad de muestras de *A. cajennense* recolectadas sobre bovino, las cuales eran acompañadas de su respectiva encuesta. Esto permitió ubicarlas y llevar a cabo un análisis sobre la distribución de esa especie de garrapatas según cantón (Cuadro 5). El análisis indica que en el 41% de los cantones muestreados se hallaron garrapatas *Amblyomma*, (Fig. 3), siendo dos de las regiones, Chorotega y Pacífico Central,

las que tienen la mayor probabilidad de encontrar garrapatas de ese género con 11.19 veces más (6.71 a 18.75) que en el resto de regiones del país, el intervalo de confianza es de 95% y  $P < 0.0001$  (Alvarez *et al.*, 1999a en prensa).

Además de *A. cajennense*, fueron encontradas *A. maculatum* y *A. inornatum*. En el caso de *A. maculatum* esta fue localizada en los cantones de San Carlos y Puntarenas, mientras que *A. inornatum* en Puntarenas (Alvarez *et al.*, en prensa, 1999 a).

La presente investigación coincide con el estudio de Factibilidad del MAG (Anónimo, 1980) en cuanto a la presencia de *Amblyomma* spp. en la zona de Guanacaste (Región Chorotega). Mientras que existen diferencias en el tanto encontramos *Amblyomma*

Este estudio permite observar que las garrapatas del género *Amblyomma* están ampliamente diseminadas en las zonas de influencia del Pacífico seco lo que obliga a establecer una estrategia de baños diferente a otras zonas del país en las que o no está presente o es muy escasa. Hay que recordar el fenómeno de sustitución reportado anteriormente en otras partes (Solís, 1987), cuando intensas campañas orientadas hacia el control de *Boophilus* spp. permitieron que su nicho fuera ocupado por *Amblyomma*.

**Comportamiento poblacional de garrapatas.** El trabajo de comportamiento poblacional recién finaliza y aún no se cuenta con los análisis de los resultados observados, sin embargo, en este artículo sometemos a consideración las actividades realizadas durante el período comprendido entre abril de 1998 y junio de 1999. El estudio mencionado, sobre dinámica poblacional de garrapatas, se llevó a cabo en bovinos.

Durante un año se visitaron mensualmente 10 fincas ubicadas en ocho Zonas Ecológicas (Z.E.) (Cuadro 6). En cada visita se registraron los siguientes datos: si se efectuó o no baño garrapaticida, la fecha, el producto utilizado, la dosis empleada, el número de animales bañados, si se aplicó algún endectocida, cuál y la fecha de aplicación y por último casos de enfermedades causadas por hemoparásitos. Fueron recolectadas garrapatas mayores de 4.5 mm., ubicadas en el lado derecho del animal, con el fin de efectuar conteos y clasificación por especie.

Con el fin de poder analizar los datos recolectados se creó una base de datos en el programa Epi Info 6.4.

El objetivo de este trabajo era conocer y comparar las fluctuaciones poblacionales de las garrapatas en diferentes Z. E. Otro dato importante era conocer cuáles especies de garrapatas están presentes, sobre bovino, en las diversas zonas.

Pese a que la investigación tuvo una duración de un año, se considera de gran valor realizar este tipo de trabajos por espacio de varios años consecutivos con el fin de obtener información que pueda ser comparada entre sí. Debido a la gran variedad de climas presentes en el país, es importante complementar la información sobre dinámica de población con datos relacionados con la bioecología de las especies de garrapatas más importantes desde el punto de vista pecuario.

## V. RESUMEN

Costa Rica carece de legislación sobre el control de la garrapata y de una política oficial para enfrentar adecuadamente la problemática causada por la garrapata. Sin embargo, el Ministerio de Agricultura y Ganadería ha realizado en los últimos tres años varios trabajos de investigación que permiten tener una idea más clara de algunos aspectos relacionados con el estado de la garrapata. Un estudio de resistencia a los acaricidas utilizando la prueba de paquete de larvas permite identificar una resistencia muy alta a los piretroides (alrededor del 81%), mientras que la resistencia a los organofosforados es muy baja (alrededor del 10%). Por otro lado se ha establecido que las garrapatas del género *Amblyomma*, en especial *A. cajennense*, están ampliamente distribuidas en la zona de influencia del Pacífico seco. Otro estudio sobre dinámica de población aún está en la fase de análisis de la información, por lo que no se presentan resultados.

## VI. SUMMARY

Costa Rica lacks of legislature and official procedure to face properly the problem caused by ticks. Nevertheless the Ministry of Agriculture and Livestock has done in the last three years research that allows to have a better idea of ticks status in the country. A trial on acaricides using the package larvae test permits to identify a very high resistance to piretroids (about 81%), mean while that for organophosphorades is very low (10%). Besides it has been established that ticks of *Amblyomma* gender, specially *A. cajennense* are wide-spread in the Pacific zone. Another study on dynamic of population is still in the analysis phase of information.

## VII. REFERENCIAS

- Alvarez, V. y Herrero, M. 1996. Bibliografía sobre *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) y enfermedades transmitidas por esta en Costa Rica. Ciencias Veterinarias, 19 (1-2): 1-10. Costa Rica.
- Alvarez, V. Pérez, E., Herrero, M. 1996. Epizootiologic instability of bovine populations against *Babesia bovis* (Piroplasmida: Babesiidae) in the region of Poas, Costa Rica, vol. 791: 110-116.
- Alvarez, V., Bonilla, R. y Chacón, I. 1999a. Distribución de la garrapata *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae) recolectada sobre bovino en Costa Rica. Rvta. Biol. Trop. (En revisión).
- Alvarez V., Bonilla, R. y Chacón, I. 1999b. Situación de la resistencia a los acaricidas organofosforados y piretroides por parte de la garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) en Costa Rica. (En revisión).
- Anónimo, 1980. Informe Final Proyecto Estudio de Factibilidad para el Control de la Garrapata. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección de Salud Animal. San José, Costa Rica, Febrero, 1980.

- Anónimo, 1997. Legislación sobre medicamentos veterinarios. Ministerio de Agricultura y Ganadería, Dirección de Salud Animal, Departamento de Medicamentos Veterinarios. Costa Rica.
- Hagen, S. 1997. Resultados de la investigación en resistencia a acaricidas en la especie de garrapatas *Boophilus microplus* en América Central y la República Dominicana. Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de San Carlos. Guatemala.
- Hermans, P., Dwinger, R., Buening, G., Herrero, M. 1994. Seasonal incidence and hemoparasite infection rates of Ixodid ticks (Acari: Ixodidae) detached from cattle in Costa Rica. *Rev. Biol. Trop.*, 42(3): 623-632. Costa Rica.
- Herrero, M., Pérez, E., Goff, W., Torioni de Echaide, S., Knowles, D., McElwain, T., Alvarez, V., Alvarez, A., Buening, G. 1998. Prospective study for the detection of *Anaplasma marginale* (Rickettsiales: Anaplasmataceae) in Costa Rica. *Tropical Veterinary Medicine: Molecular epidemiology, hemoparasites and their vectors, and general topics*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 849: 226-233.
- Kemp, D., Thullner, R., Gale, K., Nari, A., Sabatini, G. 1998. Report to the Animal Health Services, AGAH, FAO. Acaricide resistance in the cattle-ticks *Boophilus microplus* and *B. decoloratus*: Review of resistance data; standarization of resistance tests and recomendations for integrated parasite control to delay resistance. CSIRO, Australia.
- Pérez, E., Herrero, M., Jiménez, C., Carpenter, T., Buening, G. 1994. Epidemiology of bovine anaplasmosis and babesiosis in Costa Rica. *Preventive Veterinary Medicine* 20:23-31.
- Pérez, E., Herrero, M., Jiménez, C., Hird, D., Buening, G. 1994. Effect of management and host factors on seroprevalence of bovine anaplasmosis and babesiosis in Costa Rica. *Preventive Veterinary Medicine* 20:33-46.
- Pérez, E., Jaén, M., Herrero, M. 1996. Effect of management and inherent factors on birth seroposivity and seroconversion to *Babesia bovis* in calves in Costa Rica. *Vector - borne pathogens: international trade and tropical animal diseases*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, vol. 791: 100-109.
- Pérez, E. y Alvarez, V. 1995. Analysis of potential causes of acaricide resistance in *Boophilus* ticks in Costa Rica. III Seminario Internacional de Parasitología Animal, "Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria". Acapulco, México.
- Solís, S. 1987. Efectos del programa de control de *Boophilus microplus* sobre la dinámica de *Amblyomma* en México. Consulta de expertos sobre la erradicación de la garrapata con referencia especial a las Américas y el Caribe. FAO. México D.F. 22 al 26 de junio.



Solano, M. 1979. Determinación de resistencia de *Boophilus microplus* al acaricida coumaphos en Costa Rica. Tesis de grado para optar al título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. Costa Rica.

Temponi, M. 1993. Evaluación *in vitro* de cuatro ixodicidas organofosforados para el combate de la garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini,1888). Tesis de grado para optar al título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Costa Rica, Sede de Occidente. Costa Rica.

Zamora, L. 1988. Evaluación *in vitro* de tres ixodicidas para el control de la garrapata *Boophilus microplus* (Canestrini,1888). Tesis de grado para optar al título de Médico Veterinario. Facultad de Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina Veterinaria, Universidad Nacional. Costa Rica.

Cuadro 1. Productos para el combate de la garrapata inscritos ante el Dpto. de Registro de Medicamentos Veterinarios del MAG. 1999.

Producto	Principio Activo	Producto	Principio Activo
Neguvón + Asuntol	Organo fosforado	Barricade 15% EC	Piretroide
Neguvón + Asuntol Plus	Organo fosforado	Amitraz 12.5%	Amidina
Asuntol Polvo	Organo fosforado	Ectotraz 12.5%	Amidina
Asuntol PM 5%	Organo fosforado	Besuntol Ec	Amidina
Asuntol Líquido 20%	Organo fosforado	Besuntol EC 25%	Amidina
Esteladón 300 EC	Organo fosforado	Amitraz	Amidina
Esteladón 300	Organo fosforado	Tactic	Amidina
Parasitol	Organo fosforado	Bovitraz EC	Amidina
Tiguvón spot on	Organo fosforado	Besuntol + Cyflut	Amidina + Piretr
Clorpirifos SK, Sk-5	Organo fosforado	Virbamec L. A.	Endectocidas
Clorpirifos coat	Organo fosforado	Virbamec Inyect.	Endectocidas
Acaricida garrapaticida	Organo fosforado	Baymec Prolong.	Endectocidas
Supona 20%	Organo fosforado	Baymec 1%	Endectocidas
Garraphin	Organo fosforado	Ivomec Inyect.	Endectocidas
Clorpirifos Shield	Organo fosforado	Ivomec F	Endectocidas
DDVP	Organo fosforado	Dectiver	Endectocidas
Nuván 1000 EC	Organo fosforado	Duotín	Endectocidas
Bayticol PO	Piretroide	Dectomax	Endectocidas
Bayticol EC 3%	Piretroide	Interex 0.3% PM	Endectocidas
Butox PO	Piretroide	Ivermectina 1%	Endectocidas
Butox	Piretroide	Ivercen 10%	Endectocidas
Dermethon	Piretroide	Ivomec Bolo	Endectocidas
Cipermetrina 15%	Piretroide	Ivomec Tópico	Endectocidas
Cipermetrina 20%	Piretroide	Virbamax Inyect.	Endectocidas
Ticoff	Piretroide	Acatak	Fluazuron

**Cuadro 2. Distribución de los productores que hacen premezcla del acaricida según Región (%).**

<b>Región</b>	<b>Si</b>	<b>No</b>	<b>Ns/r</b>
Chorotega	43	46	11
Pac. Central	32	51	17
Brunca	45	19	36
C. Oriental	9	52	39
C. Occidental	31	51	18
Puriscal	50	38	12
Huetar Norte	32	44	24
H. Atlántica	19	38	43
<b>Total</b>	<b>32</b>	<b>45</b>	<b>23</b>

**Cuadro 3. Número de animales bañados por bomba y porcentaje según Región.**

<b>Región</b>	<b>&lt;=5</b>	<b>6-10</b>	<b>11-20</b>	<b>&gt;20</b>	<b>Ns/r</b>
Chorotega	0	11	12	9	3
Pac. Central	1	30	44	28	2
Brunca	0	7	7	11	6
C. Oriental	6	11	8	3	16
C. Occidental	3	25	6	7	4
Puriscal	1	5	16	8	4
Huetar Norte	1	13	25	11	34
H. Atlántica	2	6	13	11	5
<b>Total</b>	<b>14</b>	<b>108</b>	<b>131</b>	<b>88</b>	<b>74</b>
<b>Porcentaje</b>	<b>3%</b>	<b>26%</b>	<b>32%</b>	<b>21%</b>	<b>18%</b>

**Cuadro 4. Frecuencia de baños/días según Región (%).**

<b>Región</b>	<b>&lt;=8</b>	<b>9-15</b>	<b>16-21</b>	<b>22-30</b>	<b>&gt;30</b>
Chorotega	6	17	12	31	31
Pac. Central	5	13	23	39	20
Brunca	10	22	29	16	10
C. Oriental	2	9	14	14	48
C. Occidental	5	13	18	33	24
Puriscal	6	6	24	32	29
Huetar Norte	0	13	29	39	14
H. Atlántica	0	11	22	30	32
<b>Total</b>	<b>4</b>	<b>13</b>	<b>22</b>	<b>32</b>	<b>24</b>

**Figura 3. Distribución de *A. cajennense* según cantón.**



**Cuadro 5. Muestras de *Amblyomma* spp. según cantón**

<b>Cantón Muestreado</b>	<b>Muestras Recibidas</b>	<b>Muestras <i>Amblyomma</i></b>	<b>% muestras con <i>Amblyomma</i></b>
Abangares	10	5	50
Acosta	3	3	100
Alajuela	4	1	25
Bagaces	2	1	50
Cañas	9	4	44
Esparza	16	9	56
Garabito	6	1	17
Hojancha	3	2	67
Liberia	4	2	50
Los Chiles	20	1	5
Montes Oro	11	8	73
Mora	4	2	50
Nandayure	4	3	75
Naranjo	9	1	11
Orotina	17	8	47
Palmares	1	1	100
Puntarenas	55	39	71
Puriscal	12	1	8
Pérez Zeledón	19	2	10
San Carlos	51	5	10
San Mateo	11	4	36
San Ramón	20	11	55
Tilarán	1	1	100
Turrubares	11	1	9
Upala	5	1	20
<b>Total</b>	<b>308</b>	<b>117*</b>	

\*Una muestra recibida en el Laboratorio no contaba con información básica, por lo que no pudo ser ubicada

**Cuadro 6. Z.E. seleccionadas para estudio de dinámica de población de garrapatas. 1998-1999.**

Bosque muy húmedo Tropical, transición a premontano
Bosque muy húmedo Premontano, transición a basal *
Bosque muy húmedo Tropical
Bosque húmedo Premontano transición a basal *
Bosque húmedo Tropical
Bosque húmedo Tropical transición a premontano
Bosque muy húmedo Premontano
Bosque húmedo Tropical, transición a perhúmedo

\* En estas Z.E. se escogieron dos fincas

Figura 1. Susceptibilidad de la garrapata *B. microplus* a los acaricidas organofosforados.

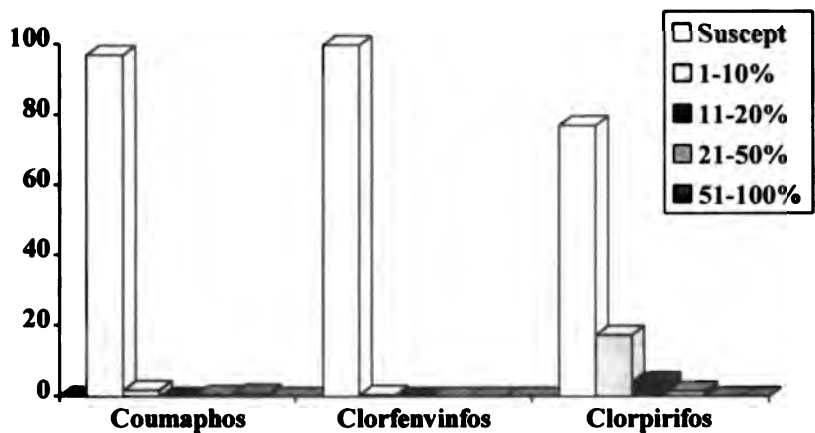
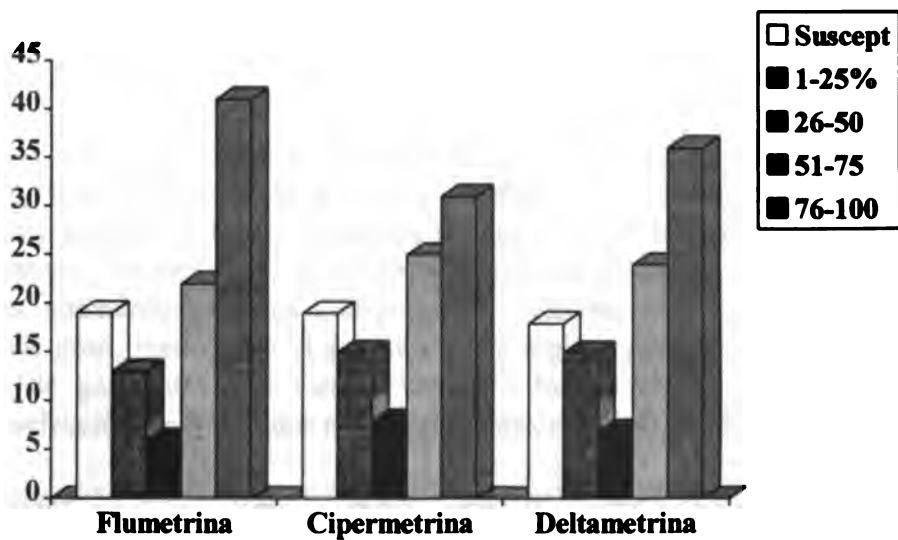
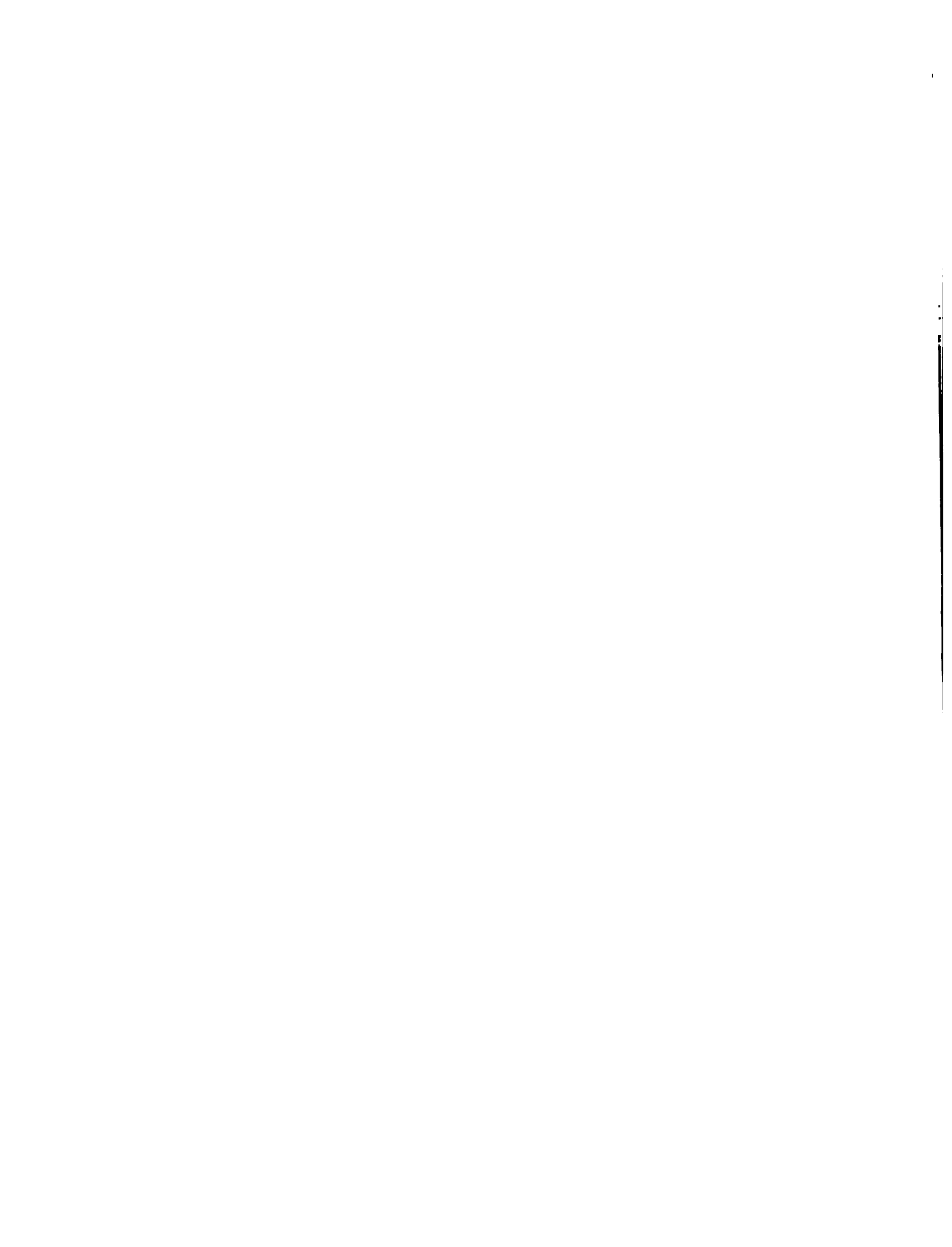


Figura 2. Susceptibilidad de la garrapata *B. microplus* a los acaricidas piretroides.





# **SITUACION DE LA RESISTENCIA DE LA GARRAPATA *Boophilus microplus* EN LA REGIÓN SUR DE RIO GRANDE DEL SUR, BRASIL**

## **THE SITUATION OF ACARICIDE RESISTANCE IN THE CATTLE TICK *Boophilus microplus* IN THE STATE OF RIO GRANDE DO SUL, SOUTHERN BRAZIL.**

N.A.DA R. FARIAS

*Instituto De Biologia, Universidade Federal De Pelotas, Caixa Postal 354, Pelotas, RS, Brasil. 96010-900*

I.	Introducción .....	25
II.	Material y Métodos .....	26
III.	Resultados y Discusión .....	27
IV.	Resumen.....	28
V.	Summary.....	29
VI.	Referencias .....	29
	Tabla 1 .....	31

### **I. INTRODUCCIÓN**

La garrapata *Boophilus microplus* es responsable de grandes pérdidas económicas en la bovinocultura brasilera, y la principal arma utilizada para su control es la aplicación de acaricidas.

La región sur del estado de Río Grande del Sur (Brasil), zona marginal para el desarrollo de *Boophilus microplus*, es de clima templado con bajas temperaturas en los meses de invierno y primavera, lo que posibilita la ocurrencia de apenas tres generaciones por año de la garrapata. Sin embargo, en esta región existe un predominio de la explotación de razas europeas, altamente sensibles a la garrapata (Sutherst et al., 1973). Este hecho, además de conferir gran importancia al parásito en la región, posibilita la ocurrencia de sobrepoblaciones de garrapatas que son expuestas a fuerte presión de garrapaticidas, conduciendo a la selección de individuos resistentes a las drogas (Gonzales, 1973).

La primera comprobación de resistencia a los garrapaticidas en el Brasil fue registrada por Freire (1953), en el estado de Río Grande del Sur. Esta cepa de garrapata (cepa Alegrete), se tornó resistente a los garrapaticidas arsenicales después de aproximadamente 40 años, y luego, a los organoclorados después de apenas dos años de contacto.

En el inicio de la década de los 70 surgieron los primeros casos de resistencia a los organofosforados (Arteche et al., 1975) y en la década del 80 Laranja et al. (1989) detectaron resistencia a los piretroides (cipermetrina), dos años después de haber sido detectada en Australia (Nolan et al., 1989). En Brasil existen registros de resistencia de garrapatas a piretroides en varios estados, además de Río Grande del Sur. Esto constituye un gran problema, ya que más del 90% de las drogas disponibles en el mercado pertenecen a este grupo químico.

Las amidinas fueron substituidas por los piretroides debido a su ineficacia en el control de insectos. En los últimos años, sin embargo, volvieron a ser usadas como alternativa para el control de cepas resistentes a los demás grupos químicos, principalmente a los piretroides. Actualmente, en Río Grande del Sur existe una cepa resistente a los componentes amidínicos (cepa Alegrete o Cavalcanti), controlada através del uso de insecticidas inyectables y del fluazurón (Martins, comunicación personal).

La ausencia de una política oficial de control de la garrapata, sumado a la falta de información de la mayoría de los productores, agravan el surgimiento de cepas resistentes. Los principales factores que proporcionan la aparición de resistencia implican, entre otros, el manejo con fallas en la dilución, en la aplicación, en la conservación y en los intervalos de aplicación del garrapaticida, que llevan a concentraciones no letales para las garrapatas (Sutherst; Comins, 1979). Además, los tratamientos frecuentes contra la "mosca de los cuernos" (*Haematobia irritans*) aceleran la selección de cepas resistentes a los piretroides. Estos errores deben ser detectados y corregidos a la brevedad, a fin de proporcionar una vida útil más larga para los productos químicos, todavía eficaces en el control de esta ectoparasitosis.

En el presente trabajo se realizó un relevamiento de la situación de sensibilidad/resistencia de *Boophilus microplus* a los diferentes grupos químicos de acaricidas disponibles en el mercado, en la región sur de Río Grande del Sur. La detección de posibles focos de resistencia, sumado al análisis de su causa, torna posible la elaboración de programas de control adecuados a la región. La información técnica también permite a los productores la utilización de medidas de manejo capaces de reducir la infestación de los campos, utilizando el garrapaticida como una de las armas, y no la única, en el control de la garrapata.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS

Se colectaron hembras ingurgitadas de *Boophilus microplus* de 38 propiedades del estado de Río Grande del Sur, en la región sur del Brasil. También se colectó una muestra del líquido de baño de inmersión (caldo garrapaticida) para realizar el test de laboratorio, acompañada de datos anamnésicos referentes a las medidas utilizadas para el control del parásito en cada propiedad.



En el laboratorio se realizó el test de inmersión de teleóginas (Drummond et al., 1973), con el fin de conocer su sensibilidad a los diferentes principios activos disponibles en el mercado: coumaphos, amidina, alfametrina, cipermetrina, deltametrina, cyalothrin, cipermetrina +chlorfenvinphos, chlorfenvinphos + diclorvós, triclorfón + coumaphos + ciflutrin, cipermetrina + diclorvós.

Para el test se formaron grupos de 10 teleóginas (3 g) que fueron expuestas durante 5 minutos a los diferentes acaricidas en la dilución recomendada por el fabricante. Posteriormente, se incubaron a 27°C con humedad relativa del 80% durante dos semanas. Después se evaluó la masa de huevos y su eclosión. Se utilizó un grupo control (inmersión en agua) para comparar la producción de huevos y la eclosión de los mismos.

### III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En esta región, el control de garrapata es realizado, exclusivamente, através de la aplicación de garrapaticidas cuando los animales aparecen infestados, no realizándose ningún control estratégico en las propiedades estudiadas. En la región predomina la aplicación de garrapaticidas por inmersión (78,9%), seguida de la aspersión (13,2%) y el derrame dorsal ("pour-on") (7,9%).

Independientemente del principio activo utilizado, el 80% de los establecimientos que utilizan la aspersión y el 100% de los que aplican garrapaticidas "pour-on", tienen cepas resistentes, indicando que estos medios de aplicación están más sujetos a fallas humanas (sobretudo subdosis de producto). Sólo el 51,7% de los establecimientos que utilizan baños de inmersión presentan cepas resistentes.

La concentración del líquido de baño de inmersión es uno de los principales factores determinantes de la selección de individuos resistentes. En todos los establecimientos estudiados en esta región, en que la eficacia del líquido de baño fue similar a la del producto diluido en el laboratorio, la cepa es sensible a la droga en uso. En el 100% de los establecimientos cuyo líquido de baño está a una concentración mayor a la recomendada, la garrapata es resistente, mientras que en el 66% de aquellos a subconcentración, la garrapata todavía es sensible a la droga en uso, confirmando la importancia de la concentración de los productos y la hipótesis de que la sobredosificación selecciona más rápidamente a los individuos resistentes.

Cuando se analizó el principio activo utilizado en el momento del test y el que fue usado anteriormente, se constató una reducción en la utilización de los piretroides y un aumento en el uso del amitraz, debido al surgimiento creciente de cepas resistentes a los piretroides. Las drogas más usadas anteriormente en la región fueron la deltametrina (48% del mercado) y la cipermetrina. Actualmente, estas últimas son las que tienen menor

eficacia en el control de la garrapata (mayores índices de resistencia), lo que indica que la presión garrapaticida es responsable de la selección de cepas resistentes.

En la tabla 1 se presentan los resultados del test *in vitro* con teleóginas.

Los resultados obtenidos indican que, hasta el momento, en esta región no hay resistencia al amitraz y al chlorfenvinphos + diclorvos, cuyos índices de eficacia son superiores al 95% en todos los establecimientos estudiados.

Los resultados revelan que, además de la explotación de bovinos altamente sensibles a la garrapata en dotaciones cada vez mayores (actualmente, grandes extensiones están destinadas a la agricultura), la falta de información de los productores lleva a fallas de manejo que posibilitan el surgimiento de sobrepoblaciones con la consecuente selección de cepas resistentes a las drogas. Las principales fallas detectadas fueron: a) no utilización de baños estratégicos a intervalos regulares (los bovinos son bañados solamente cuando presentan altas infestaciones por garrapatas adultas, lo que garantiza la reinfestación de los campos); b) utilización de garrapaticidas en concentraciones inadecuadas (recargas mal hechas, infiltraciones de agua, mezclas de principios activos); c) aplicaciones frecuentes de piretroides a dosis insecticidas para el control de *Haematobia irritans*; d) aplicación de formulaciones caseras con piretroides para aplicación "pour-on", sobretodo con miras al control de la "mosca de los cuernos"; e) aplicación "pour-on" de productos en volumen inferior al recomendado, "para abaratar costos".

Una vez detectada la resistencia es necesario buscar las alternativas capaces de controlar la población resistente a la droga en uso. En caso de subconcentración de líquido de baño de inmersión, cuando aún no hay selección de individuos resistentes, se tiene como alternativa el refuerzo del líquido de baño, corrigiendo así su concentración. En caso contrario, es necesario el cambio de principio activo por uno que sea eficaz en el test *in vitro*. Sin embargo, siempre se deben buscar y corregir las fallas de manejo que permitieron esa selección.

El conocimiento de la dinámica poblacional de la garrapata en la región, permite determinar la época adecuada para la aplicación de baños estratégicos. Los productores también deben ser informados sobre las ventajas de la rotación de pasturas, utilización de equinos y ovinos y de la realización periódica de exámenes de laboratorio para realizar el test de sensibilidad de las garrapatas. Para ello, es necesaria la implementación de una política oficial para el control de la garrapata, y fundamentalmente, la información de técnicos y productores para que se pueda llevar a cabo un programa de control que utilice la aplicación de acaricidas apenas como una de las armas para ese control, y no la única. De esta forma, sería posible mayor rentabilidad en la bovinocultura, además de permitir prolongar la vida útil de los nuevos principios activos que vayan a ser lanzados al mercado.

#### IV. RESUMEN

Se determinó el grado de sensibilidad/resistencia a diferentes acaricidas, mediante el test de inmersión *in vitro*, evaluándose 38 cepas de garrapatas de *Boophilus microplus* del sur de Brasil. También se estudiaron las posibles relaciones entre las cepas resistentes, y las instalaciones y el manejo. Se detectaron diferentes niveles de resistencia a deltametrina, cipermetrina, alfametrina, cialotrin, coumaphos, y drogas combinadas (piretroides + fosforados). Ninguna cepa se reveló resistente al amitraz. Se analizaron, también, algunos factores que pueden contribuir en la selección de cepas resistentes, tales como tiempo de uso, tipo de aplicación, estrategia, y frecuencia de aplicaciones de los acaricidas, encontrándose mayores niveles de resistencia en los establecimientos que utilizan aspersión y "pour-on". De acuerdo a los resultados obtenidos, es imperioso establecer un programa de información hacia técnicos y productores, mediante el apoyo conjunto de autoridades públicas y privadas, con el fin de establecer un manejo racional para prolongar la vida útil de las nuevas formulaciones acaricidas ofrecidas en el mercado.

#### V. SUMMARY

The sensibility/resistance grade against different acaricides in 38 strains of the cattle tick *Boophilus microplus* in the southern of Brazil was studied. The *in vitro* test was used with adult females. Also, structures and management measures related was studied. Different levels of resistance to Deltamethrin, Cypermethrin, Alphamethrin, Cyalothrin, Coumaphos and pyrethroid plus organophosphorus compounds, were detected. None of the studied strains showed resistance against Amitraz. The factors that might have contributed to the selection of these resistant strains, such as time, method, strategics and frequency of acaricid application, are discussed. A political program to control ticks is necessary to inform veterinarians and farmers. A racional management has to be implemented in order to prolong the lifetime of new acaricides.

#### VI. REFERENCIAS

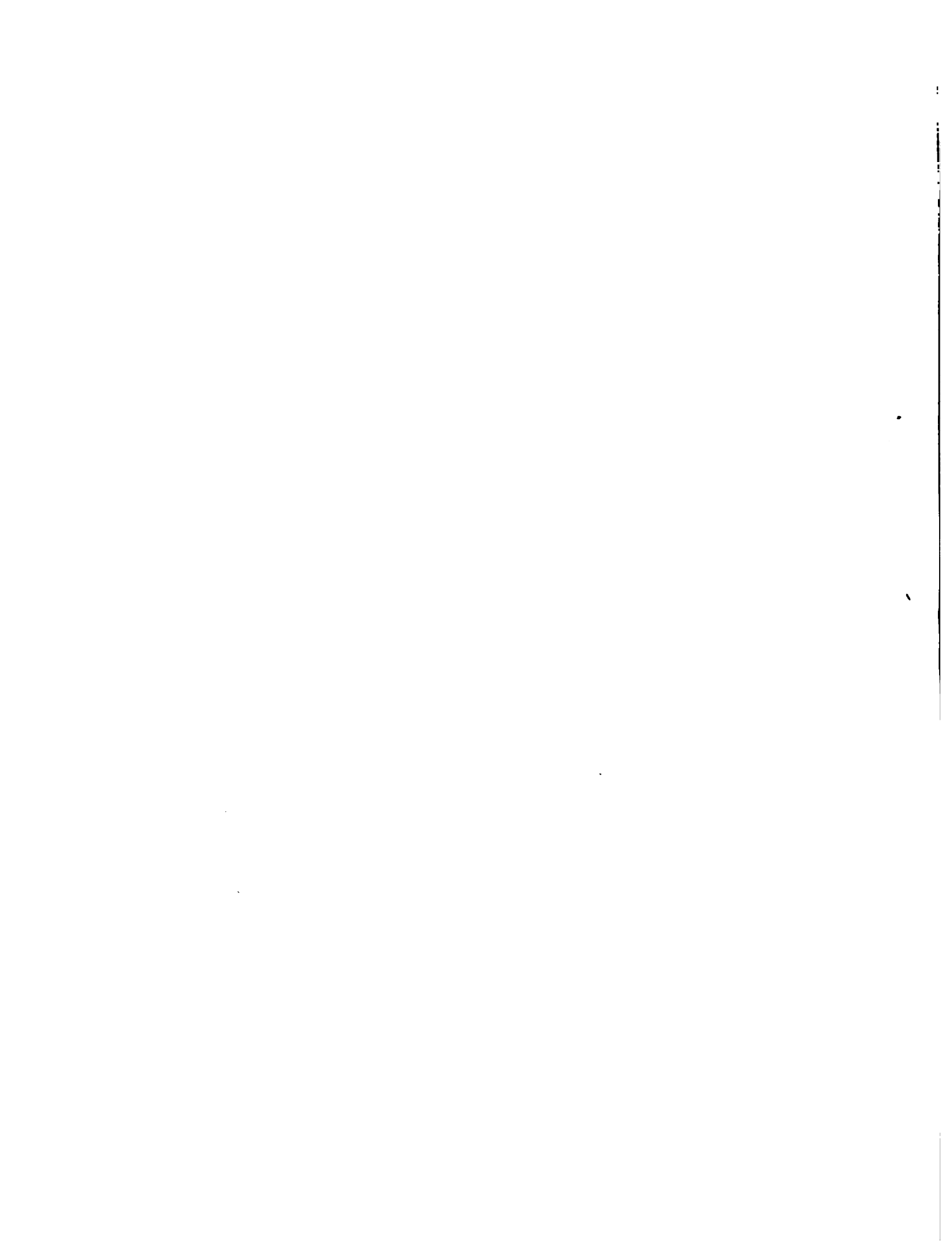
- Arteche, C.C.P.; Arriegui, L.A.; Laranja, R.J. (1975) Alguns aspectos da resistência do *Boophilus microplus* a piretróides. Anais: XI Congresso Estadual de Medicina Veterinária, Gramado, RS, p.44.
- Drummond, R.O.; Ernest, S.E.; Trevino, J.L.; Gladney, W.J.; Graham, O.H. (1973). *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus* laboratory tests of inseticides. Journal of Economy and Entomology, 66: 130-133.

- Freire, J.J. (1953) Arseno e cloro resistência e emprego de tiofosfato de dietilparanitrofenila (Parathion) na luta anticarrapato *Boophilus microplus*. Boletim da Diretoria de Produção Animal, 9 (17): 3-21.
- Gonzales, J.C. (1993) O Controle do Carrapato do Boi. Porto Alegre, Ed. do Autor, 80 p.
- Nolan, J.; Wilson, J.T.; Bird, P.E. (1989). Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick. Australian Veterinary Journal, 66 (6): 179-182.
- Sutherst, R.W.; Utech, K.B.W.; Dallwitz, M.J.; Kerr, J.D. (1973). Intra-specific competition of *Boophilus microplus* on cattle. Journal Appl. Ecol., 10: 855-862.
- Sutherst, R.W.; Comins, H.N. (1979). The management of acaricide resistance in cattle tick *Boophilus microplus* in Australia. Bulletin of Entomology Research, 69 (3): 519-537.

Tabla 1. Eficacia media de productos garrapaticidas en el test *in vitro* con teleóginas de *Boophilus microplus* del sur de Brasil (Estado de Río Grande del Sur), durante el período de 1997 a 1999.

Producto	Principio activo	n	eficacia media (%)	% de establecimientos con eficacia $\geq$ 95%
TRIATOX	Amitraz	38	100	100
TACPLUS	Amitraz	21	99,9	100
AMITRACID	Amitraz	27	99,8	100
CARBESON	Clorfenvinfos+diclorvos	28	99,9	100
NEGUVON + ASUNTOL	Triclorfon+coumafos+ciflutrin	26	98,7	92,3
ALATOX	Cipermetrina+diclorvos	32	98,4	87,5
SUPOCADE	Cipermetrina+clorfenvinfos	38	96,5	78,9
ECTOP	Amitraz	10	95,9	80,0
ECTOPLUS	Cipermetrina high cis+diclorvos	28	94,7	67,9
ASUNTOL	Coumafos	24	87,5	37,5
FLYTICK	Cipermetrina	18	66,4	16,7
GRENADE	Cialotrin	30	64,4	33,3
ULTIMATE	alfametrina	32	61,9	21,9
ECTOMIN	Cipermetrina high cis	32	60,2	20,1
BUTOX 10'*	deltametrina	16	57,3	6,3
BARRAGE	Cipermetrina	34	56,0	14,7
BUTOX 5'*	deltametrina	38	51,1	7,9

\* El producto fue testado con tiempos de inmersión de 10 y 5 minutos, respectivamente.



**ESTUDIOS DE RESISTENCIA A ACARICIDAS EN LA GARRAPATA BOVINA  
*Boophilus microplus* EN AMÉRICA CENTRAL.**

**STUDIES ON ACARICIDE RESISTANCE IN THE CATTLE TICK *Boophilus  
microplus* IN CENTRAL AMERICA.**

S. HAGEN\*, J. A. KOPP GÓMEZ \*\*, A. LIEBISCH\*

\* *Instituto de parasitología, Escuela de Medicina Veterinaria, Hannover, Alemania.*

\*\* *Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia,  
Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala*

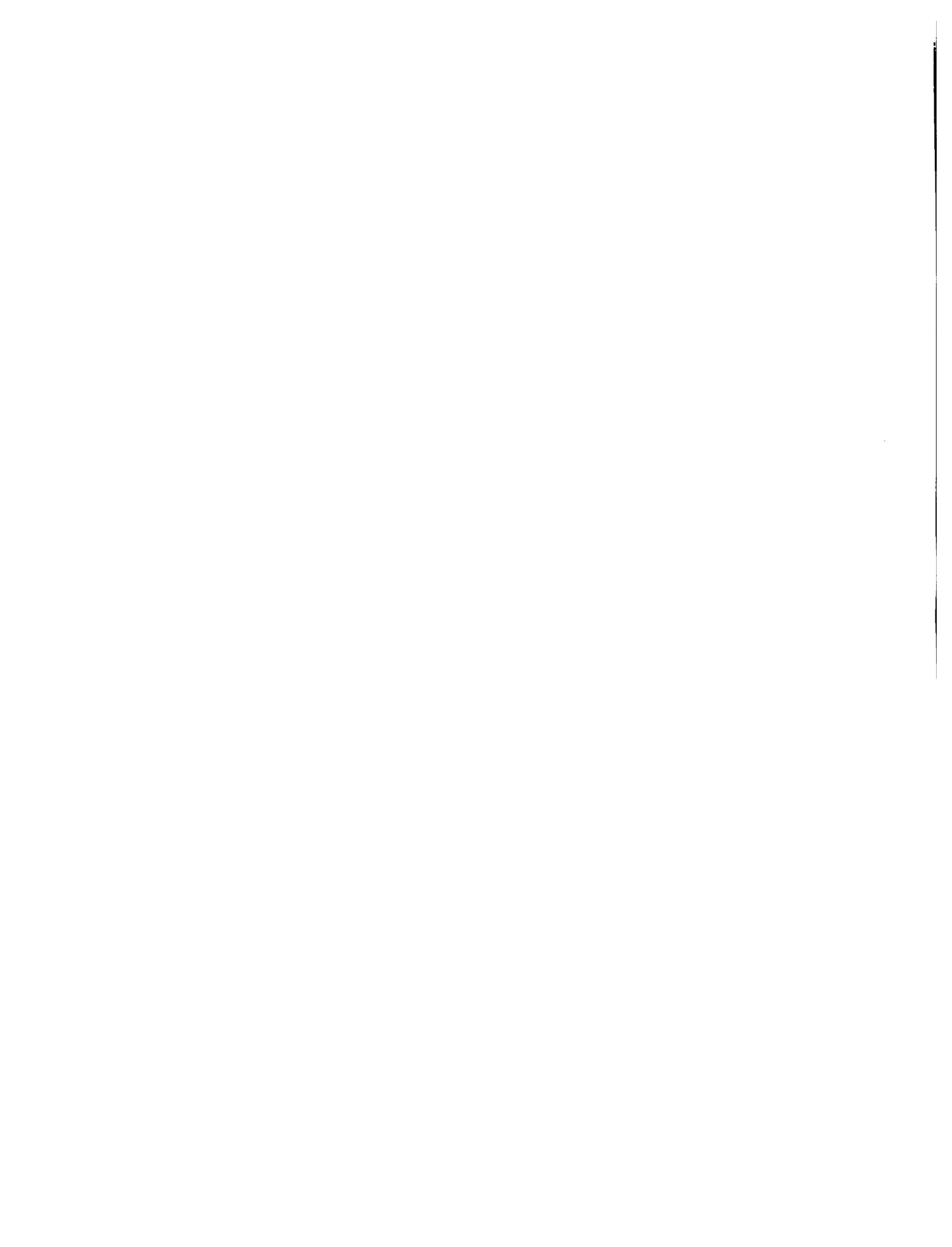
En el año 1996 fueron investigadas 83 cepas de campo de la especie de garrapatas *Boophilus microplus* en cuestión de que si existe resistencia contra los acaricidas. De esas 29 cepas de campo provinieron de Guatemala, 21 de Costa Rica, 17 de Honduras, 9 de la República Dominicana, 6 de El Salvador y una cepa de campo proveniente de Panamá. Como método para confirmar la existencia de resistencia contra acaricidas fue escogido el In-Vitro-Ensayo de Paquetes de Larvas (STONE Y HAYDOCK, 1962), el cual fue modificado por la FAO.

Resistencias contra los organofosforados Chlorfenvinfos y Coumafos, o sea la diamidina Amitraz no fueron detectado.

Por primera vez las cepas de campo de *Boophilus microplus* resistentes a piretroides fueron confirmados en América Central. En todos los países incluidos en esta investigación, fueron detectadas cepas de campo resistentes a piretroides. Por toda la región de Centro América 28.4% de las cepas de campo tenían resistencia contra Deltametrina, 37.5% tenían resistencia contra Flumetrina y 39.2% tenían resistencia contra Ciflutrina. Los porcentajes siguientes indican la porción de cepas de campo de cada país, los cuales tenían resistencia contra las diferentes acaricidas: Guatemala: Deltametrina 14.3%, Flumetrina 10.7%, Ciflutrina 57.9%; Honduras: Deltametrina 66.7%, Flumetrina 55.6%, Ciflutrina 62.5%; El Salvador Deltametrina 33.3%, Flumetrina 66.7%, Ciflutrina 83.3%.

La cepa de campo proveniente de Panamá ("Hac. C. Espina") presentó una resistencia específica contra Flumetrina así como la cepa de campo "Hac. María Adelia" de costa Rica. Así es demostrado el tipo de resistencia igual a la cepa "Lamigton" de Australia.

Posibles razones por la ausencia de resistencia contra organofosforados y las diferentes porciones de cepas de campo que tienen resistencia contra piretroides en los diferentes países están mencionados. Recomendaciones para estrategias en el futuro por la lucha contra *Boophilus microplus* están discutidos. En consideración de la realidad centroamericana la realización de medidas "Control Contra Garrapatas Emigradas" no parece muy prometedor.





## **ACARICIDAS Y RESISTENCIA EN *Boophilus spp* EN SUDAFRICA.**

## **ACARICIDES AND *Boophilus spp* RESISTANCE IN SOUTH AFRICA**

T. STRYDOM\* , R. PETER \*\*

\* *South African Bureau of Standards, P.O. Box 5156 Greenfields 5208 South Africa*

\*\* *Bayer (Pty) Ltd Animal Health Division, P.O. Box 143 Isando 1600 South Africa*

I. Introduction.....	35
A. Objectives.....	35
II. Methods.....	36
Study design 1.....	36
Study design 2.....	36
III. Results.....	37
Study design 1.....	37
Tabla 1, 2, .....	37
Tabla 3, 4.....	38
Study design 2 .....	38
Tabla 5 .....	38
IV. Conclusion.....	39
V. References.....	39

### **I. INTRODUCTION**

In South Africa resistance to arsenic was recorded in the 1-host tick *Boophilus decoloratus* by Du Toit *et al.*, (1941), to BHC and toxaphene by Whitnall *et al.*, (1953), to DDT and pyrethrin by Whitehead, (1956 and 1959 respectively) and to organophosphorous and carbonate acaricides Shaw *et al.*, (1979). Resistance to synthetic pyrethroids was recorded by Coetzee *et al.*, (1987). Beyond these published findings the true extent of acaricide resistance in South Africa remains conjecture. Only two reports on acaricide resistance have been published since 1980 to present. Ostensible resistance as reported by producers cannot be accepted *per se* without thorough scientific testing.

Results from continued *in vitro* testing of *Boophilus spp* for resistance at the South African Bureau of Standards in East London, South Africa and the interim results from a National Survey on *Boophilus spp* resistance in South Africa are confirming the increase of tick resistance against acaricides in the country.

#### **A. OBJECTIVES**

The objective of the first survey is to obtain an indication of *Boophilus spp* resistance against selected chemicals at their recommended field use on farms where farmers are complaining about blue tick control. These complaints are usually made to representatives of pharmaceutical companies who then collect ticks from animals on the farms.

The objective of the National Survey is to determine the extent and distribution of *Boophilus spp* resistance in South Africa against certain selected acaricides. The results from the survey will be used for planning of resistance management control strategies, to conserve susceptible strains in different geographic areas, to plan marketing strategies for acaricides and to end speculation regarding the existence or absence of resistance in South Africa.

## II. METHODS

### **Study Design 1**

Pharmaceutical representatives will follow up complaints from farmers who experience problems in blue tick control. Engorged female *Boophilus spp* ticks are collected from animals before dipping and submitted to the SABS Veterinary Testing Department in East London. The ticks are incubated at 27°C and 80% RH. The larvae from these ticks are subjected to the larval test as described by Shaw. Solutions of amitraz at 250ppm, chlorfenvinphos at 500ppm and a pyrethroid (usually flumethrin at 40ppm or cypermethrin at 70ppm) are made. Ten millilitres of each solution is pipetted onto filter paper with 14 to 28 day old larvae. Exactly after 10 minutes approximately 100 larvae are transferred into a clean filter paper packet. These filter paper packets are sealed with a paper crimper or stapler and placed in the incubator. After 72 hours of incubation the packets are removed from the incubator and the number of live and dead larvae are recorded. The percentage mortality and corrected mortality for each solution are then calculated. A figure of >50% to 80% corrected mortality is interpreted as an indication of developing resistance against a specific solution, while a figure of 0% to 50% corrected mortality is interpreted as an indication of resistance.

### **Study Design 2**

Two hundred and fifty farms were identified at random for tick collection. Sample sizes were directly related to tick densities and there were no bias towards areas with perceived resistance problems. Ticks were collected from animals before dipping and despatched to laboratories for bio-assay testing. The bio-assay tests are conducted according to the 'Shaw larval Test'. Before the onset of field collections the test centres ran bio-assay tests on various tick strains to validate results obtained. Engorged female ticks were incubated at 27°C and 80% RH to allow egg laying.

A geometric series of dilutions of amitraz, chlorfenvinphos and cypermethrin were prepared for each sample to give at least 7 concentrations of each chemical. Ten millilitres of each solution was pipetted on filter paper with 18 to 21 day old larvae. Exactly after 10 minutes approximately 100 larvae were transferred into clean folded filter paper packets which were sealed with a paper crimper or stapler and placed in the incubator. Mortality rates of the larvae were determined 72 hours later and data subjected to probit analysis

using the BMDP statistical package. The  $LC_{50}$  values were compared to that of a susceptible reference strain and resistance factors were calculated by dividing the  $LC_{50}$  of the tested strain by that of the susceptible strain.

### III. RESULTS

#### **Study Design 1**

- 1) Table 1 indicates the number of tests conducted every year since 1996 to present.
- 2) Table 2 indicates percentage of tests showing <80% larval mortalities for each chemical compound each year.
- 3) Table 3 indicates the percentage of tests showing 50-80% larval mortalities for each chemical compound each year.
- 4) Table 4 indicates the percentage of tests showing <50% larval mortalities for each chemical compound each year.

*Table 1 : Number Of Tests Conducted Every Year Since 1996 To Present*

1996	1997	1998	1999
17	33	42	43

*Table 2 : Percentage Of Tests Showing <80% Larval Mortalities*

Year	Amitraz	Chlorfenvinphos	Pyrethroid	Amitraz/ Pyrethroid	Chlorfenvinphos/ Pyrethroid
1996	52.9%	5.9%	64.7%	52.9%	5.9%
1997	36.4%	9.1%	54.5%	24.2%	3.0%
1998	23.8%	16.7%	45.3%	9.5%	7.1%
1999	53.5%	25.6%	69.8%	39.5%	23.3%

**Table 3 : Percentage Of Tests Showing 50-80% Larval Mortalities**

Year	Amitraz	Chlorfenvinphos	Pyrethroid
1996	29%	0%	29%
1997	24%	3%	6%
1998	12%	5%	19%
1999	28%	16%	28%

**Table 4 : Percentage Of Tests Showing <50% Larval Mortalities**

Year	Amitraz	Chlorfenvinphos	Pyrethroid
1996	24%	6%	35%
1997	9%	6%	48%
1998	12%	12%	26%
1999	26%	9%	42%

### **Study Design 2**

Since the survey started in 1997 a total of 42.8% of the required number of samples were tested. The resistance status of the strains tested is indicated in Table 5.

**Table 5 : Resistance Status Of The Strains Tested**

Compound	Susceptible	Resistant
Amitraz	97.59%	2.41%
Cypermethrin	76.19%	23.81%
Chlorfenvinphos	83.95%	16.05%

These figures are calculated on the following basis for each chemical compound:

Amitraz	Factor of Resistance >100 =	Resistant
	Factor of Resistance < 50 =	Susceptible
Cypermethrin	Factor of Resistance >100 =	Resistant
	Factor of Resistance < 50 =	Susceptible
Chlorfenvinphos	Factor of Resistance > 5 =	Resistant
	Factor of Resistance < 2.5 =	Susceptible

#### IV. CONCLUSION

It is widely accepted that *in vitro* tests are not as reliable as the mini dip test or stall test, in quantifying tick resistance (Stendel 1980). However, the costs involved with the stall test is undoubtedly a limiting factor for the conducting of resistance tests.

The test method for the first survey/study was selected due to the low costs involved and to be able to explain to the farmer in his language the resistance situation on his farm. Although the results are no indication of factual resistance, it gives us an indication when resistance is developing. Ideally samples should be re-collected from farms which indicated resistance by means of the Shaw larval Test and subjected to the Engorged Adult Female Immersion Test (EAFI) as described by Drummand *et al.* The EAFI test is more reliable than the larval tests in extrapolation to practical conditions (Standel 1980) but the costs involved with the test are again a limiting factor in widespread applications.

The results from the national Survey on Tick Resistance in South Africa obtained to-date indicate factual pyrethroid resistance, a lower incidence of organophosphate resistance and only a few cases of amidine resistance. The survey will be completed by March 2000.

Both these surveys, however, suggest a significant increase in incidence of *Boophilus spp* resistance in South Africa to synthetic pyrethroids, organophosphates and amidines.

#### V. REFERENCES

- COETZEE, B.B., STANFORD, G.D. & DAVIS, D.A.T., 1987a. The resistance spectrum shown by a fenvalerate-resistant strain of blue tick (*Boophilus decoloratus*) to a range of ixodicides. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54, 79-82.
- COETZEE, B.B., STANFORD, G.D. & DAVIS, D.A.T., 1987b. Resistance by the blue tick (*Boophilus decoloratus*) to the synthetic pyrethroid, fenvalerate. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 54, 83-86.
- DRUMMOND, R.O., ERNST, S.E., TREVINO, J.L., GLADNEY, W.J. & GRAHAM, O.H., 1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory tests of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 66, 130-133.

- FOURIE, L.J., 1999. National Tick Resistance Survey. *Progress report*. 1-14
- SHAW, R.D., 1966. Culture of an organophosphorous-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. *Bulletin of Entomological Research*, 56, 389-409.
- SPICKETT, A.M., 1998. Acaricides and resistance. Facts, figures and tables concerning tick control. *Laboratory Diagnostic Series. Module: Veterinary Ectoparasitology and Protozoology. Acaricides and Resistance*. 1-13
- STENDEL W., 1980. The relevance of different test methods for the evaluation of tick controlling substances. *Journal of the South African Veterinary Association*. 51, 147-152.
- WHITEHEAD, G.B., 1956. DDT resistance in the Blue Tick, *Boophilus decoloratus* (Koch). *Journal of the South African Veterinary Medical Association*, 27, 117.
- WHITEHEAD, G.B., 1959. Pyrethrum resistance conferred by resistance to DDT in the Blue tick. *Nature*, 184, 378.
- WHITNALL, A.B.M., THORBURN, J.A., MCHARDY, W.M., WHITEHEAD, G.B. & MEERHOLTZ, F.A., 1952. A BHC resistant tick. *Bulletin of Entomological Research*, 43, 51.

**DIAGNOSTICO DE LA SUSCEPTIBILIDAD DE LA GARRAPATA DEL  
GANADO *Boophilus microplus* A LOS ACARICIDAS EN EL ESTADO DE MINAS  
GERAIS, BRAZIL.**

**DIAGNOSIS OF THE SUSCEPTIBILITY OF THE CATTLE TICK, *Boophilus  
microplus*, TO ACARICIDES IN MINAS GERAIS STATE, BRAZIL.**

JOHN FURLONG.

*Embrapa Dairy Cattle, Rua Eugênio do Nascimento 610, Juiz de Fora, MG., 36038-330.  
Brazil. john@cnpgl.embrapa.br.*

I. Summary.....	41
II. Introduction.....	42
III. Material and methods.....	42
IV. Results.....	43
Tabla 1.....	43
Figura 1.....	43
V. Discussion.....	44
Figura 2.....	44
VI. Bibliographic references.....	45

**I. SUMMARY**

During the 1997 and 1999 years, samples of 207 random collections of engorged female cattle ticks, from populations of *Boophilus microplus* throughout Minas Gerais State, Brazil, were submitted to laboratory immersion tests for the most frequently used contact chemical groups of acaricides in this region. Products, respective number of tests, susceptibility levels (different letters refer to a significant difference in efficiency,  $P < 0.05$ ) and their mean comparison ranks were as follow: Carbeson (Chlorphenvinphos + Dichlorvos), 69 tests, 96,30% <sup>(a)</sup>; Ektoban (Thiazolin + Cypermethrin High Cis), 37 tests, 79,41% <sup>(b)</sup>; Cythal (Cypermethrin + Piperolin Butoxid), 91 tests, 63,29% <sup>(c)</sup>; Triatox (Amitraz), 205 tests, 54,61% <sup>(d)</sup>; Supocade (Cypermethrin + Chlorfenvinphos), 205 tests, 55,53% <sup>(d)</sup>; Cypermil Plus (Cypermethrin + Dichlorvos), 54 tests, 55,29% <sup>(d)</sup>; Assuntol (Coumaphos), 201 tests, 50,42% <sup>(d)</sup>; Amitracid (Amitraz), 130 tests, 49,88% <sup>(d)</sup>; Ectoplus (Cypermethrin High Cis + Dichlorvos), 59 tests, 48,73% <sup>(e)</sup>; Flytick (Cypermethrin), 6 tests, 47,39% <sup>(e)</sup>; Ectop (Amitraz), 38 tests, 38,18% <sup>(e)</sup>; Butox (Deltamethrin), 207 tests, 24,02% <sup>(f)</sup>; Ultimate (Alfamethrin), 204 tests, 24,32% <sup>(f)</sup>. Relating to acaricide chemical groups, the following averaged susceptibility levels were obtained: organophosphates (73,36%), acaricides mixtures (49,66%), pyrethroids (31,91%) and amidines (47,55%). The results show the wide dissemination of the resistance problem to such acaricides in this region. The work is a part of a national network for diagnosis of the susceptibility of *B. microplus* to such acaricides throughout Brazil.

## II. INTRODUCTION

The Brazilian farmers don't have an official program to control the cattle tick. Presently, the official extension service was replaced by private assistance, mainly related to the dairy industry. As a general rule, this picture can be extrapolated to the whole country, despite the differences among farming systems, climatic regions and farmers culture.

In Brazil, the first report of tick resistance was done by FREIRE, 1953, in Rio Grande do Sul state and related to arsenic. During the 70<sup>s</sup> decade, many *B. microplus* resistant strains to organophosphates have been reported (MARTINS, 1995). The first detection of pyrethroid resistance was reported by LEITE, 1988, followed by LARANJA et al., 1989, ALVES-BRANCO et al. 1992, MARTINS et al. 1992, ALVES-BRANCO et al. 1993 and FLAUSINO et al., 1995. Despite the complains done by producers and extensionists, related to tick resistance, costs and difficulties to reverse it, a broad diagnosis of the situation, as it was done in Australia (ROULSTON et al. 1981), Africa (LUGURO et al. 1987, WEDDERBURN et al. 1991, REGASSA et al. 1993), and Mexico (AGUIRRE, 1989) still needs to be done in Brazil. MARTINS et al., 1992, in the state of Rio Grande do Sul, conducted similar research, determining the resistance levels of tick populations in farms where control failure was detected due to tick resistance.

The widespread resistance of the cattle tick to the acaricides has been one of the main constraints of farmers and extensionists to improve the control of this parasite. The situation has caused great concern since in some places there are no acaricide options to control this tick species. In 1996, considering the urgent need to maintain the efficiency of the few groups of acaricide products available in the market, and the fact that it is easier to control or eradicate resistant genes in the population if resistance is early detected, a group of Brazilian researchers joint in a national network for diagnosis and monitoring the susceptibility of *B. microplus* populations throughout Brazil.

The southeastern region of Brazil produces approximately 60% of the Brazilian milk. The dairy cattle systems are basically composed by crossbred cattle (Holstein x Zebu), and reared in extensive conditions. The average farm size is approximately 120 ha and the daily milk production average between 6 and 10 liters. The climatic conditions are favourable for the development of the *B. microplus* cattle tick during all the year.

The control of the cattle tick is mainly based in the number of engorged females and done by costal pump machine. The yearly average number of treatments ranges between 15 to 18 and the amount of product applied to each animal is 1 to 2 liters.

This paper summarises the results of the susceptibility diagnostic of *B. microplus* to the main acaricide products sold in the region, between the years of 1997 and 1999.

## III. MATERIAL AND METHODS

From 1997 to 1999, 207 randomised samples of *B. microplus* engorged females were collected from different places in Minas Gerais State, Brazil. They were submitted to the AIT (Adult Immersion Test) (DRUMMOND, 1973) and the most common chemicals used in the region were utilised in this test, according to the manufacturer recommended



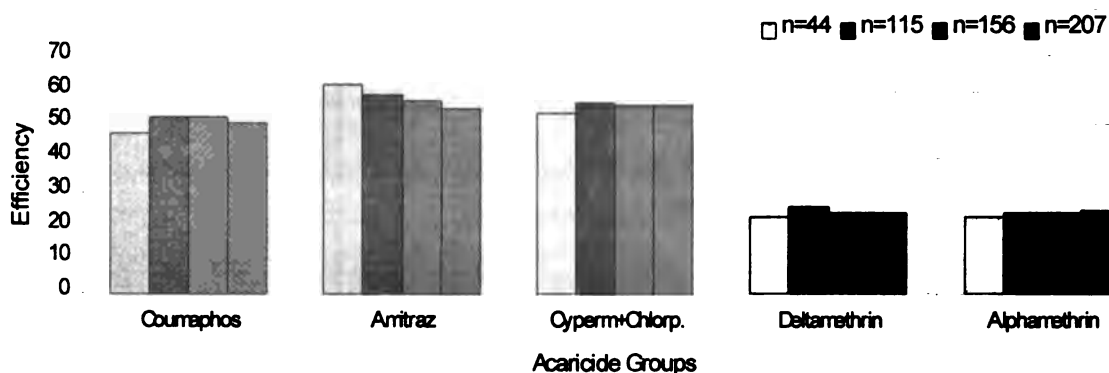
concentrations. The same procedures were performed in other states by the members of the network.

#### IV. RESULTS

Table 1. Average results of acaricides efficiency obtained in the adult immersion tests of *B. microplus* cattle tick, from 1997 to 1999, of Minas Gerais State, Brazil.

<b>ORGANOPHOSPHATES</b>	
<i>Carbeson (Chlorphenvinphos + Dichlorvos)</i>	96,30% (n=69)
<i>Assuntol (Coumaphos)</i>	50,42% (n=201)
<b>Average</b>	<b>73,36%</b>
<b>ACARICIDE MIXTURES</b>	
<i>Supocade (Cypermethrin + Chlorphenvinphos)</i>	55,53% (n=205)
<i>Cypermil Plus (Cypermethrin + Dichlorvos)</i>	55,29% (n=54)
<i>Ectoplus (Cypermethrin + Dichlorvos)</i>	38,18% (n=38)
<b>Average</b>	<b>49,66%</b>
*** <i>Ektoban (Thiazolin + Cypermethrin)</i> : 79,41% (n=37)	
<b>PYRETHROIDS</b>	
<i>Ultimate (Alphamethrin)</i>	24,32% (n=204)
<i>Butox (Deltamethrin)</i>	24,02% (n=207)
<i>Flytick (Cypermethrin)</i>	47,39% (n=6)
<b>Average</b>	<b>31,91%</b>
*** <i>Cythal (Cypermethrin + Piperonyl Butoxide)</i> : 63,29% (n=91)	
<b>AMIDINES</b>	
<i>Triatox (Amitraz)</i>	54,61% (n=205)
<i>Amitracid (Amitraz)</i>	49,88% (n=130)
<i>Ectop (Amitraz)</i>	38,18% (n=38)
<b>Average</b>	<b>47,55%</b>

Figure 1. Cumulative results of acaricide efficiency in the immersion adult test of *B. microplus* observed in Minas Gerais state, Brazil, during the years of 1997 to 1999.



## V. DISCUSSION

The widespread resistance of the tick to the available acaricides in Brazil was already known in the field. The new fact is the quantification of this resistance, based on a standard methodology (the adult immersion test) within a national network. This joint effort, to obtain a broad picture of the problem started in 1996 and results showing the different situations in several regions of the country were obtained between 1997 and 1999. The average efficacy obtained in the state of Minas Gerais is causing concern since most of the available commercial acaricide can not be recommended for field application without problems of resistance. The fact that the vast majority of the acaricide applications in the region are done by spray and most of the them, are not correctly applied, might have contributed to the present resistance situation (FURLONG, 1993; SANTOS Jr. et al, 2000). The introduction and widespread distribution of the horn-flies, *Haematobia irritans*, are of concern to the farmers who treat the fly with pyrethroids using doses lower than recommended for tick control may also have an important role in the emergence and spread of SP resistance ticks (ROCHA, 1996).

There is a recent proposal for a joint effort among industry representatives, official institutions and producers associations, aiming to improve education with special attention to sellers and field workers, in order to explain the key factors in the use of acaricides. Misuse of acaricides has contributed to the present situation of tick resistance, reflected the diagnosis of the susceptibility of *B. microplus* (adult immersion test) that has been made since 1997. The data shown above is consistent with data from other Brazilian regions (Figure 2). The general view shows widespread tick resistance in all acaricide groups. Amitraz, despite its use in the last 20 years in Brazil, is still the main chemical alternative for control of SP resistant ticks, in most of the Brazilian regions where this survey was carried out.

There are clearly some problems with synthetic pyrethroid acaricides (SP). The acaricide products with only an SP component have a very low efficiency (31.91% Table 1). The products with an SP and an OP component are better (49.66% Table 1), probably because the OP is synergising the SP or the OP is also killing the ticks. The new product Ektoban (Thiazolin + cypermethrin) is disappointing because the efficiency is only 79.4%. (Table 1) This is probably due to the resistance to cypermethrin in the mixture.

Figure 2. Results of acaricide efficacy (%) observed in *Boophilus microplus* populations, using "Adult Immersion Test", in different Brazilian states, during the years of 1997 and 1999.

<i>Acaricides</i>	<i>RS</i>	<i>SC</i>	<i>MG</i>	<i>PE</i>	<i>SP</i>	<i>RJ</i>	<i>MS</i>	<i>DF</i>	<i>PI</i>	<i>SE</i>
<i>Amidine</i>	97.0	99.9	47,5	53,5	95.0	49.4	92.2	87.6	89.9	51.5
<i>Alphamethrin</i>	67.7	91.2	24.3	38,3	39.7	87.6	54.2	39.0	83.3	46.7
<i>Deltamethrin</i>	46.7	90.7	24.0	30,2	33.0	80.2	36.6	36.6	82.5	40.4
<i>Cypermethrin</i>	52.4	-	47.3	34,9	42.9	-	28.3	-	-	43.9

<i>Cyperm/Chloph.</i>	91.8	95.2	55.5	95,3	87.9	97.4	95.4	77.5	100	-
<i>Coumaphos</i>	81.4	81.2	50.4	79,6	67.6	88.3	85.1	61.8	91.1	79.2
<i>Diazinon</i>	66.3	-	-		-	-	-	-	-	-

## VI. BIBLIOGRAPHIC REFERENCES

- AGUIRRE, J. A. *Monitoring of tick populations in an eradication campaign to detect outbreaks of resistance. In: The Eradication of Ticks. Proceedings of The Expert Consultation on The Eradication of Ticks with Special Reference to Latin America. Mexico City, Mexico, 22-26 June, 1987. FAO, Animal Production and Health Paper, Rome, 1989. n. 75, p. 177-185.*
- ALVES-BRANCO, F. de P. J.; SAPPER, M. F. M.; ARTILES, J. M. *Diagnóstico de resistência de Boophilus microplus a piretróides. In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11., 1992, Gramado. Anais... Gramado: SOVERGS, 1992. p. 44.*
- ALVES-BRANCO, F. de P. J.; SAPPER, M. F. M.; PINHEIRO, A. C. *Estirpes de Boophilus microplus resistentes a piretróides. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 7., 1993, Londrina. Anais... Londrina: CBPV, 1993. p. A4.*
- DRUMMOND, R. O.; ERNST, S. E.; TREVINO, J. L.; GLADNEY, W. J.; GRAHAM, O. H. *Boophilus annulatus and Boophilus microplus: Laboratory tests of insecticides. J. Econ. Entomol. 66 : 130-133, 1973.*
- FLAUSINO, J. R. N.; GOMES, C. C. G.; GRISI, L. *Avaliação da resistência do carrapato Boophilus microplus ao amitraz e a piretróides, no município de Seropédica, Rio de Janeiro. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 9., 1995, Campo Grande. Anais... Campo Grande: CBPV, 1995. p. 45.*
- FREIRE, J. J. *Arseno e cloro resistência e emprego de tiofosfato de dietilparanitrofenila (Parathion) na luta anticarrapato Boophilus microplus (Canestrini, 1887). Boletim da Diretoria de Produção Animal, Porto Alegre, v. 9, n 17, p. 3-21, 1953.*
- FURLONG, J. *Controle do carrapato dos bovinos na Região Sudeste do Brasil. Cadernos Técnicos da Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, n. 8, p. 49-61, 1993.*
- LARANJA, R. J.; MARTINS, J. R. de S.; CERESER, V. H.; CORREA, B. L.; FERRAZ, C. *Identificação de uma estirpe de Boophilus microplus resistente a carrapaticidas piretróides no Estado do Rio Grande do Sul. In: SEMINÁRIO BRASILEIRO DE PARASITOLOGIA VETERINÁRIA, 6., 1989, Bagé. Anais... Bagé: CBPV, 1989, p. 83.*
- LEITE, R. C. *Boophilus microplus (Canestrini, 1887) susceptibilidade, uso atual e retrospectivo de carrapaticidas em propriedades das regiões fisiográficas da Baixada do Grande Rio e Rio de Janeiro. Uma abordagem epidemiológica. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 1988. 151 p. (Tese de doutorado).*

- LUGURU, S. M.; CHIZYUKA, H. G. B.; MUSISI, F. L. *A survey for resistance to acaricides in cattle ticks (Acari:Ixodidae) in three major traditional cattle areas in Zambia.* Bull. Entomol. Res. 77: 569-574, 1987.
- MARTINS, J. R. de S.; CORREA, B. L.; MAIA, J. Z. *Resistência de carrapatos a carrapaticidas no Rio Grande do Sul.* In: CONGRESSO ESTADUAL DE MEDICINA VETERINÁRIA, 11., 1992, Gramado. Anais... Gramado: SOVERGS, 1992. p. 46.
- MARTINS, J. R. de S.; CORREA, B. L.; CERESER, V. H.; ARTECHE, C. C. P. *A situation report on resistance to acaricides by the cattle tick Boophilus microplus in the state of Rio Grande do Sul, Southern Brazil.* In: SEMINARIO INTERNACIONAL DE PARASITOLOGIA ANIMAL, 3., 1995, Acapulco. Anais... Acapulco: SAGAR, CANIFARMA, FAO, IICA, INIFAP, 1995. p. 1-8.
- REGASSA, A.; & CASTRO, J. J. de. *Tick resistance to acaricides in western Ethiopia.* Trop. Anim. Health Prod. 25: 69-74, 1993.
- ROCHA, C. M. B. M. *Caracterização da persepção dos produtores do município de Divinópolis, MG, sobre a importância do carrapato Boophilus microplus e fatores determinantes das formas de combate utilizadas.* Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 1996. 205 p. (Tese de mestrado).
- ROULSTON, W. J.; WHARTON, R. H.; NOLAN, J.; KERR, J. D.; WILSON, J. T.; THOMPSON, P. G.; SCHOTZ, M. *A survey for resistance in cattle ticks to acaricides.* Aust. Vet. J. 57: 362-371, 1981.
- SANTOS Jr., J. de C.; FURLONG, J.; DAEMON, E. *Controle do carrapato Boophilus microplus (Acari:Ixodidae) em sistemas de produção de leite da Microrregião Fisiográfica Fluminense do Grande Rio, Rio de Janeiro.* Ciência Rural, 30, 2000. (PRELO).
- WEDDERBURN, P. A.; JAGGER, T. D.; McCARTAN, B.; HUNTER, A. G. *Distribution of Boophilus species ticks in Swaziland.* Trop. Anim. Health Prod. 23: 167-171, 1991.

# SITUACION ACTUAL DE LA CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA GARRAPATA EN MEXICO.

## CURRENT STATUS OF THE NATIONAL TICK CAMPAING IN MEXICO

ALFREDO GARCIA BUSTAMANTE

*Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. Dirección General de Salud Animal  
Departamento de Garrapata. Av. México No. 190, Col. Del Carmén, Coyoacán, C.P. 04100  
Teléfono: 56-58-02-50, 56-59-05-84, 56-59-89-22, Fax 56-59-31-46*

I. Introducción.....	47
II. Situación actual.....	48
A. Capacitación.....	48
B. Monitoreo.....	48
C. Vigilancia epizootiologica.....	48
D. Supervisión a los baños de línea y estaciones cuarentenarias.....	49
III. Conclusiones.....	49

### I. INTRODUCCIÓN

El control de la garrapata *Boophilus spp.* en México tiene su origen en la década de los 20, después en el año de 1972 se liberó de este ectoparásito una porción del territorio de Sonora, estableciéndose en esa época las características técnicas de lo que sería el programa de control y erradicación. En el año de 1975 se creó el Fideicomiso Campaña Nacional Contra la Garrapata el cual después de 10 años de intensa actividad y logros de relevancia, fué liquidado en 1984, posteriormente a esa fecha el control de garrapatas *Boophilus* se realiza en forma individualizada, por los productores contando con la asesoría y el apoyo del gobierno federal, a través de la SAGAR y la CONASAG, los gobiernos estatales, las organizaciones de productores y los Comités de Fomento y Protección Pecuaria de los estados.

En México existen áreas que por su clima y ubicación geográfica o por acciones de la campaña están reconocidas como libres de garrapatas *Boophilus*, dentro de estas podemos considerar a: los estados de Aguascalientes, Sonora, Tlaxcala, y el D.F.

Por otra parte, gracias a las actividades de los productores, técnicos de la SAGAR y gobiernos estatales existen zonas que se mantienen libres del ectoparásito; considerando

que parcialmente en su extensión territorial se encuentran libres de garrapata *Boophilus*, los estados de Baja California, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Nuevo León, Tamaulipas, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Guanajuato, Hidalgo, Edo. de México, Puebla, Querétaro y Sinaloa.

## II. SITUACIÓN ACTUAL.

La normatividad y líneas de acción de la campaña se efectúan a través de la NOM-019-ZOO 1994, " Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus*, spp" la cual contiene los lineamientos para el control de las garrapatas y el relacionado con las enfermedades que transmiten, los aspectos referentes al tratamiento garrapaticida, uso de productos ixodicidas, estrategias para el reconocimiento y la prevención y control de la resistencia a los garrapaticidas, vigilancia epidemiológica, medidas cuarentenarias y de control de la movilización de animales; Este documento básico ha sido revisado exhaustivamente por la Comisión de Ixodicidas SAGAR-INFARVET-CANIFARMA, para su actualización e inclusión de nuevos tópicos, como sería el concepto de los inmunógenos, habiéndose enviado al CONAPROZ para su publicación, en el Diario Oficial de la Federación.

Dentro de la campaña se han definido estrategias y acciones básicas para el control del ectoparásito, las cuales están relacionadas con las actividades de las diversas dependencias de la CONASAG, de los gobiernos estatales, asociaciones de productores y de los Comités de Fomento y Protección Pecuaria de los estados, dentro de estas vertientes es importante señalar:

### **A. Capacitación:**

Impartir cursos y dar pláticas a productores, MVZ, aprobados y oficiales, inspectores fronterizos y técnicos sobre las acciones de la campaña, normatividad de la misma, control de la movilización, manejo y uso apropiado de los ixodicidas así como la prevención y control de la resistencia a los mismos.

### **B. Monitoreo:**

Establecer y dar a conocer las técnicas y procedimientos para la evaluación periódica del número de garrapatas presentes en un animal, para que los técnicos y MVZs., a nivel regional o estatal puedan muestrear y enviar garrapatas para su identificación taxonómica, pruebas de susceptibilidad a los ixodicidas y para determinar modificaciones o cambios en la dinámica poblacional de las garrapatas en el país.

### **C. Vigilancia epizootiologica:**

Esta vigilancia tanto pasiva como activa se efectúa en todos los estados de la república con el objeto de identificar y notificar la presencia de garrapatas en las diferentes entidades del país, con el objeto de determinar y aplicar las medidas correctivas a efectuar y los

tratamientos idóneos contra el ectoparásito y la preservación y ampliación de las áreas libres.

#### **D. Supervisión a los baños de línea y estaciones cuarentenarias:**

Este punto consiste en las visitas de supervisión periódica a las instalaciones de los baños cargados con amidinas, estaciones cuarentenarias fronterizas, baños de línea y casetas de inspección para verificar el uso correcto de los ixodicidas, su manejo, almacenamiento dosificación, cargas y recargas, uso de estabilizadores, mezclas, contaminación, así como emitir dictámenes para la corrección de las anomalías detectadas y orientar técnicamente a los productores e inspectores sobre estos aspectos y la forma de mejorar su participación en las actividades de la campaña.

Además de estos 4 puntos básicos es conveniente señalar lo relacionado con la supervisión a predios con garrapata resistente a ciertas familias de ixodicidas, con el objeto de proponer el manejo mas adecuado de este problema y la utilización del ixodicida al cual no tengan resistencia las garrapatas.

### **III. CONCLUSIONES**

La campaña no se abocará a la erradicación del ectoparásito a nivel nacional, solo en aquellas regiones donde se considere factible o por interés de los productores, como es el caso de Baja California y Coahuila en su franja fronteriza.

De acuerdo a los aspectos inmunológicos y de profilaxis contra Anaplasmosis y Babesiosis es conveniente en algunas áreas mantener cierta población de garrapatas para que actúen como generadores de inmunidad contra estas 2 enfermedades.

Un punto básico dentro de la economía del sector pecuario mexicano por la gran cantidad de divisas que representa es la exportación de animales libres de garrapata, lo cual debe ser tomado como alta prioridad buscando que los productores manejen apropiadamente su calendario de baños y control de la garrapata, para evitar que la presencia del ectoparásito se constituya en una barrera zoonosanitaria y como apoyo a esto la línea de baños cargados con amidinas debe constituirse en un factor de control de la movilización de animales hacia la frontera; debiéndose reforzar la misma e instrumentar una política de capacitación y apoyo constante a los técnicos e inspectores encargados de su manejo y operación.

La capacitación de los productores a nivel de predios, Uniones y Asociaciones debe ser otra de las actividades prioritarias, ya que ellos deberán constituir la fuerza básica en las acciones para el control de la garrapata.

Otro punto a considerar será el monitoreo, actividad que deberá realizarse en forma inicial en los estados fronterizos, para constatar si las áreas libres de garrapata *Boophilus spp.* pueden seguir siendo consideradas como tales y detectar si no se tiene garrapata resistente a los ixodicidas, debido a la movilización indiscriminada de ganado que llega inclusive de la frontera sur.

Los materiales de capacitación Posters, trípticos, manuales, revistas, folletos, videos, etc., deberán continuarse elaborando y suministrando como parte de las estrategias de la Campaña contra la Garrapata, y se promoverá su distribución en los eventos que se lleven al cabo a nivel regional estatal y nacional incluyendo ferias, exposiciones, pláticas, cursos, conferencias, etc.



# CONTROL QUÍMICO DE *Boophilus microplus* EN VENEZUELA: SITUACIÓN ACTUAL.

## CHEMICAL CONTROL OF *Boophilus microplus* IN VENEZUELA: CURRENT SITUATION.

*Alfredo Coronado*

*Universidad Centroccidental Lisandro Alvarado, Barquisimeto, Venezuela.*

*E-mail: [acoronad@delfos.ucla.edu.ve](mailto:acoronad@delfos.ucla.edu.ve) [alfredocoronado@hotmail.com](mailto:alfredocoronado@hotmail.com)*

I.	Introducción.....	51
II.	Situación Actual.....	52
III.	Resumen .....	53
IV.	Summary.....	53
V.	Referencias.....	53
	Tabla 1 .....	55

### I. INTRODUCCIÓN

La ganadería bovina en Venezuela está conformada por unos 12 millones de cabezas, predominando los rebaños mestizos y es explotada bajo condiciones de manejo extensivo en su mayoría. Más del 75% del territorio nacional ofrece condiciones apropiadas para la producción pecuaria (Ewel *et al*, 1976). Sin embargo, el 60% de los bovinos se encuentran concentrados en cuatro de los 23 estados del país.

Al igual que para la ganadería bovina, las condiciones climáticas imperantes son propicias para el desarrollo de numerosos ectoparásitos, tanto autóctonos del continente americano como aquellos introducidos desde otros países junto con los bovinos importados. El espectro de artrópodos que afectan la ganadería nacional está conformado principalmente por dípteros hematófagos o causantes de miiasis y por ixódidos. Alrededor de 60 especies de garrapatas han sido señaladas en Venezuela, sin embargo, la especie *Boophilus microplus* es sin duda la más importante. En efecto, la prevalencia de esta especie en bovinos es de 85%, seguida por *Amblyomma cajennense* y en menor grado por *Anocentor nitens*. Este predominio de *B. microplus* sobre *A. cajennense* puede cambiar en función del uso y frecuencia de garrapaticidas (Power y Silvestri, 1984).

La incidencia de garrapatas en Venezuela está determinada por el régimen de precipitaciones. Durante la estación lluviosa, la cual se extiende de Mayo hasta Octubre, el número de garrapatas en los animales es mínimo, y con ello se reduce la aplicación de

acaricidas. En la estación seca, de Noviembre a Abril, las condiciones son propicias para el desarrollo de varias generaciones de garrapatas, específicamente de *B. microplus*. A pesar de esta franca estacionalidad, la presencia de otros ectoparásitos tales como *Haematobia irritans* imponen el uso de productos químicos de acción no sólo mosquicida sino también garrapaticida.

La genética del rebaño bovino nacional, otrora conformado por animales aclimatados y con una moderada resistencia al ataque de las garrapatas, se vio modificado por la introducción masiva de bovinos de aptitud lechera tales como el Holstein, con miras a incrementar la baja producción láctea del rebaño criollo. Hoy en día, más del 90% de la producción láctea del país se obtiene de rebaños “doble propósito”, los cuales se muestran más eficientes que las ganaderías especializadas a la luz de las condiciones imperantes en el país.

## II. SITUACION ACTUAL

El rebaño bovino actual se muestra menos resistente al ataque de ectoparásitos, concretamente al parasitismo por *B. microplus*. Esto se ha traducido en el uso intensivo de acaricidas y con ello una mayor presión de selección sobre las poblaciones de este ixódido. La aplicación de acaricidas se realiza principalmente por aspersión, en sus modalidades de aspersión manual y mecanizada. Con frecuencia se utilizan equipos aspersores de uso agrícola, afectando así la eficacia de los productos aplicados. Así mismo, la frecuencia de tratamientos no responde a estrategias propias de cada situación sino a esquemas tradicionales tales como los baños a cada 21 días.

El creciente interés de los ganaderos venezolanos por controlar las poblaciones de “mosquilla” (*H. irritans*) ha sido un factor determinante en la aparición de poblaciones tanto de *H. irritans* como de *B. microplus* no susceptibles a compuestos químicos. Desde 1970 cuando se señaló por vez primera la existencia de cepas de *B. microplus* resistentes a organofosforados (Nuñez *et al.*, 1985) hasta 1995, varios compuestos se han mostrado ineficaces en el control de *B. microplus* (Coronado, 1995).

En los últimos cuatro años, se observó un crecimiento sostenido en el uso de amitraz. A pesar de que el mismo fue introducido al mercado venezolano a mediados de la década de los 70, sólo ahora ha sido empleado en forma intensiva, probablemente por la ineficacia en el control de *B. microplus* de los piretroides sintéticos, principalmente cipermetrina. El resultado ha sido la aparición de poblaciones marcadamente insensibles al amitraz, tal y como ocurrió en otros países (Nolan, 1981; Gloria *et al.*, 1993).

La Tabla 1 muestra los resultados obtenidos en Venezuela en los últimos cuatro años. Las muestras de garrapatas fueron colectadas en fincas con evidencias de fallas terapéuticas después de aplicados los acaricidas. La técnica empleada fue la de inmersión de adultos (Drummond *et al.*, 1973).

### III. RESUMEN

*Boophilus microplus* es el ectoparásito más importante en Venezuela. La introducción masiva de animales *Bos taurus* se tradujo en un incremento en la susceptibilidad de los rebaños nativos al ataque de las garrapatas y como consecuencia, el uso intensivo de acaricidas ha sido la única estrategia empleada por los ganaderos. Adicionalmente, la presencia de "mosquilla" en los rebaños exige el uso de compuestos químicos con actividad no sólo insecticida sino también acaricida. La resistencia a garrapaticidas, reportada por primera vez en 1970, se ha convertido en un obstáculo para el control de las poblaciones de garrapatas. Esa resistencia mostrada contra organofosforados en sus comienzos, se ha expandido a otros grupos químicos, como los carbamatos, los piretroides sintéticos y la diamidina. La técnica de inmersión de adultos mostró un amplio rango de susceptibilidad. El uso intensivo de amitraz condujo a la aparición de poblaciones resistentes en un período de cuatro años. La existencia de una legislación sanitaria obsoleta, unida a una escasa asistencia técnica y al desconocimiento de la bioecología de *B. microplus* en las diferentes regiones del país representan los tres mayores obstáculos que deben enfrentar los ganaderos, los técnicos y los veterinarios.

### IV. SUMMARY

*Boophilus microplus* is by far the most important bovine ectoparasite in Venezuela. Insertion of a great number of *Bos taurus* breeds in native herds lead to an increased susceptibility to tick infestation in bovines, and consequently, an intensive use of acaricides has been the one strategy used by cattlemen. Besides, horn fly is a coming up concern within cattle breeders, hampering the profit and demanding the use of chemical product usually with activity not only against flies, but cattle ticks. Acaricide resistance in Venezuela reported for the first time in 1970 has become an obstacle for controlling tick population, and the former resistance against organophosphorous compounds has spreading to other acaricide groups v.g. carbamates, synthetic pyrethroids and diamidines. The AIT technique performed in tick samples collected from cattle showed a wide range of susceptibility. Intensive use of diamidines lead to the rise of unsusceptible tick strains in less than a four year period. Lacking in an update legislation and shortness of technical information dealing with tick control along with scarcity of *B. microplus* bioecological studies performing the three greatest obstacles to be facing by owners, veterinarians and technicians.

### V. REFERENCIAS

Coronado, A. (1995). Current status of the tropical cattle tick *Boophilus microplus* in Venezuela. III Seminario Internacional de Parasitología Animal. Acapulco, México, Oct. 11-13. 1995, 22-29.

- Drummond, R.O, Ernst, S.E., Treviño, J.L., Gladney, W.J. and Graham, O.H. (1973). *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory test of insecticides. *Journal Economic Entomology*, 66, 130-133.
- Ewel, J.J., Madriz, A. y Tosi, J.A. (1976). "Zonas de Vida de Venezuela". Ed. Sucre, 270 pp.
- Gloria, M.A., Flausino, J.R.N. e Grisi, L. (1993). Resistencia do *Boophilus microplus* ao amitraz no estado de Rio de Janeiro, com base em testes de imersao de femeas ingurgitadas. *Anais do VIII Seminario Brasileiro de Parasitologia Veterinaria*, Londrina, Paraná, Brasil, A7.
- Nolan, J. (1981). Current development in resistance to amidine and pyrethroids tickcides in Australia. *Proceeding of the International Conference Rhodes University, Grahamstown, R.S.A. Jan 27-29.*
- Núñez, J.L., Muñoz, M.E. and Moltedo, H.L. (1985). *Boophilus microplus*, The Common Cattle Tick. Ed. Springer-Verlag, Berlin, 204 pp.
- Power, L. y Silvestri, R. (1984). Observaciones preliminares sobre la presencia de *Boophilus microplus* y *Amblyomma cajennense* en ganado bovino de los estados Yaracuy y Falcón. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias*, 31, 39-45.

**SITUACION DE LA RESISTENCIA DE LAS GARRAPATAS A LOS  
ACARICIDAS EN CUBA. USO DE LA LUCHA INTEGRADA COMO  
ESTRATEGIA.**

**ACARICIDE TICK RESISTANCE IN CUBA. USE OF INTEGRATED CONTROL  
AS STRATEGY.**

M. VALDEZ RODRÍGUEZ, L. MENDEZ MELLOR, A. ALFONSO GUERRA, H.  
PEREZ BARRIOS, I. RODRÍGUEZ SALAZAR, A. LEYVA RODRÍGUEZ.

*Centro Nacional de Parasitología, Instituto de Medicina Veterinaria, Cuba.*

I. Introduccion.....	57
II. Materiales y Métodos.....	58
III. Resultados y Discusión.....	59
IV. Conclusiones.....	60
Referencias.....	62
Tabla 1.....	63

## I. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas tienen la capacidad de transmitir graves enfermedades a los animales y al hombre, provocando pérdidas millonarias en todo el mundo, por tal motivo el hombre dedica grandes recursos al control de esta plaga, la cual según informaciones históricas, basadas en los reportes realizados por los jesuitas durante el periodo colonial las garrapatas eran en esa época aparentemente desconocidas (FAO, 1987).

Los primeros reportes en América Latina sobre la presencia de garrapatas lo encontramos en Paraguay en el año 1838 y en Argentina en 1899. Por lo que se deduce que este artrópodo fue introducido en América junto con los animales que se trajeron del viejo mundo y gracias a su buen poder de adaptación se fueron dispersando conjuntamente sobre el ganado hasta llegar al paralelo de Latitud Sur (FAO, 1987).

Las garrapatas se conocen en Cuba hace más de 90 años. Stilles y Hassall reportaron la existencia de la *B. australi* en 1901, y Mayo en 1905 describe la presencia de *Margoropus annulatus australis*. Las especies de garrapatas de mayor importancia en nuestro país son:

*Boophilus microplus*, *Amblyomma cajennense*, *Anocentor nitens* y *Rhipicephalus sanguinius*.

La resistencia de las garrapatas es un problema económico bastante grande y complejo, que presenta hoy día la ganadería mundial en el control de estos vectores, cada día es más difícil debido a la resistencia que están presentando los acaricidas e insecticidas en sus aplicaciones (Serrano, 1904).

En Cuba la resistencia a organofosforados en garrapatas *Boophilus microplus* fue reportada en 1976 por Villalba y Stendel, y en *Amblyomma cajennense* mediante una prueba de campo en 1986 por Vitorte y Pérez. En 1995 fue diagnosticada por Valdés y Col (1997) mediante pruebas *In vitro* y en campo la resistencia a Amidinas, esta resistencia se identificó en la provincia de La Habana y hasta la fecha se mantiene en este territorio.

Entre las consecuencias que trae consigo el desarrollo de resistencia de las garrapatas a los acaricidas tenemos:

- Marcada disminución de la eficacia de los acaricidas.
  - Elevación de los gastos económicos del ganadero.
  - Aumento del daño por las garrapatas a los animales.
  - Limitación en el desarrollo de nuevos acaricidas por los elevados costos que esto conlleva.
- Por tal motivo en nuestro país ante este grave problema que enfrenta la ganadería, ha desarrollado la siguiente estrategia para amortiguar las consecuencias de este fenómeno.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### **Muestreo**

Estos se llevaron a cabo en todo el país y se tuvieron en cuenta aquellos lugares que reunieran las siguientes premisas:

- Que el producto en uso presentara síntomas de pérdida de eficacia.
- Quejas de los ganaderos respecto a que el producto usado no matara las garrapatas.
- Observación de que algunas garrapatas sobrevivieran al tratamiento con acaricidas.
- Lugares donde el ganado se infestara rápidamente post-tratamiento, es decir que a los 7 días después del baño garrapaticida aparecieran garrapatas adultas repletas.

### **Envío de las muestras**

Las pruebas de laboratorio se llevaron a cabo en el Centro Nacional de Parasitología del Instituto de Medicina Veterinaria en San Antonio de Los Baños, La Habana. Para lo

cual se les indicó al servicio nacional del Instituto de Medicina Veterinaria que el envío de garrapatas se realizara de la siguiente forma:

- Envío de 50 garrapatas hembras repletas para pruebas con Clorfenvinfos (organofosforado).
- Envío de 250 garrapatas hembras repletas para pruebas con Cimiazol (Amidina).
- Realizar el envío de las garrapatas al Centro Nacional de Parasitología en frascos conteniendo en su interior papel o algodón humedecidos en agua. En lugares muy distantes se recomendó mantener el frasco entre 4-8 °C para retardar la oviposición.
- En todos los casos se recomendó que la toma de muestras de garrapatas se realizara por lo menos 7 días posteriores al último baño garrapaticida y que estuvieran en el Centro Nacional de Parasitología antes de las 72 horas de recolectadas las garrapatas, para evitar en lo posible que ovipositaran en el traslado.

### **Pruebas realizadas**

Para determinar el factor de resistencia de cada muestra enviada se siguió la siguiente metodología:

Si la muestra de garrapatas procedía de una zona con sospecha de resistencia a Clorfenvinfos (organofosforado) se le realizaba la Prueba de Paquetes de Larvas (Santamaría, 1994).

- Si la muestra de garrapatas era enviada con sospecha de resistencia a Cimiazol (Amidina) se sometía a la Prueba de Inmersión de Hembras Repletas en Diluciones Múltiples (Drummond et al, 1974)
- Se calculaba la DL50 mediante el programa computarizado "PROBIT" versión 2, desarrollado en nuestro centro y que permite calcular la DL50 y el Factor de Resistencia de cada muestra con respecto a una cepa sensible mantenida en el laboratorio.

## **III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

De la encuesta nacional de muestras de garrapatas para pruebas de resistencia a los acaricidas realizada bajo las premisas antes expuestas, se obtuvieron los siguientes resultados que se exponen en la tabla No. 1

Como resultado de la encuesta nacional se puede constatar que en general en el país no existe una situación alarmante en cuanto a la resistencia de las garrapatas a los acaricidas, ya que bajo las premisas planteadas para realizar la encuesta, sólo se recibieron un total de 94 muestras para investigar sobre posible resistencia a Clorfenvinfos y 85 muestras para investigar posible resistencia a Cimiazol.

Sin embargo específicamente en la provincia de La Habana la situación es completamente diferente al resto del país, ya que fue de donde se recibieron la gran mayoría de las muestras, destacándose que el 100 % de muestras sospechosas de resistencia a Cimiazol fueron remitidas por esta provincia y del total el 60 % resultaron resistentes a Cimiazol. Mientras que el 76.2 % de las muestras enviadas para investigar Clorfenvinfos dieron resistencia en esta provincia.

Esta situación alarmante en la provincia de La Habana se explica porque entre otros factores es una zona donde ha predominado en los bovinos la raza Holstein, muy susceptible a las infestaciones de garrapatas y a hemoparásitos y erróneamente se trató de resolver esta problemática ejerciendo una fuerte presión química, además en la década de los 80 se llevó a cabo un Programa de Erradicación de garrapatas y por mucho tiempo se realizaron baños garrapaticidas cada 7 y 15 días, primero con organofosforados y después con Cimiazol (Amidina), lo que trajo como consecuencias una inestabilidad enzootica marcada a los hemoparásitos y la situación actual de multirresistencia en la mayor parte de la región.

## I. CONCLUSIONES

Ante la situación difícil de resistencia de las garrapatas a los acaricidas que se presenta en la provincia de La Habana y la presencia de otras zonas que comienzan a tener resistencia, el Centro Nacional de Parasitología se ha trazado desde hace 4 años como estrategia para el control de la resistencia de las garrapatas a los acaricidas la Lucha Integrada, para lo cual hemos unificado una serie de medidas que en su conjunto son nuestra estrategia para controlar las infestaciones de garrapatas y alargar la vida útil de los garrapaticidas. Estas medidas han permitido que en nuestro país en los últimos años las pérdidas por el efecto de las garrapatas hayan disminuido significativamente, ahorro de productos químicos, alargamiento de los ciclos de baños garrapaticidas hasta 60, 90 y en algunas regiones a más de 90 días, se ha alcanzado estabilidad enzootica en la mayoría de la masa ganadera y hemos colaborado en la protección del medio ambiente.

Como principales medidas dentro de la Lucha Integrada que estamos implantando tenemos:

- ◆ Los baños garrapaticidas se realizaran por Intensidad de Infestación. Es decir, llevar a cabo el baño garrapaticida cuando existan sobre el bovino entre 10 y 15 garrapatas adultas mayores de 4,5 mm.
- ◆ Realizar inspecciones periódicas a los baños garrapaticidas y multar aquellos propietarios que no los tengan en óptimas condiciones y no tengan los registros de los baños acaricidas actualizados y correctamente.



- ◆ Cambiar de organofosforado a amidina donde la primera familia química tenga baja efectividad por resistencia y pasar a un piretroide donde falle la amidina.
- ◆ Continuar con la introducción en nuestra ganadería de la vacuna recombinante GAVAC contra la garrapata *Boophilus microplus*.
- ◆ Introducir paulatinamente el control de garrapatas mediante el uso de hongos como el *B. turginensis* y *B. bessiana* de comprobada efectividad en nuestro país.
- ◆ Realizar el control de calidad a todos los lotes de productos garrapaticidas que arriben a Cuba antes de ser distribuidos por todo el país.
- ◆ Llevar a cabo Pruebas *In vitro* con las cepas de garrapatas Sensible y Multirresistente a Organofosforado-Amidina, así como Pruebas de Campo a todos los productos garrapaticidas que se intente registrar en el país.
- ◆ Rescatar lo antes posible el uso de los métodos de control natural.

Además nuestro centro en unión de otras entidades nacionales llevamos a cabo tareas de investigación con el objetivo de desarrollar en un futuro una vacuna contra la garrapata con una mayor efectividad y buscar un marcador molecular de la resistencia a diferentes acaricidas. Dos de estos centros son:

- Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana: Se ensayan nuevos antígenos contra *Boophilus microplus* y hemos comenzado a investigar sobre posibles antígenos de *Amblyomma cajenense* y el uso de nuevas formas de adyuvantes para los antígenos Bm-86 y Bm-95.
- Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri": Estamos enfrascados en el estudio de diferentes enzimas de la garrapata *Boophilus microplus*, que pudieran en un futuro servir como marcador en la resistencia de las garrapatas a los diferentes acaricidas o quizás como antígenos.

## RESUMEN

Se exponen los resultados obtenidos de una encuesta nacional sobre la resistencia de las garrapatas a los acaricidas, la cual se llevó a cabo bajo condiciones específicas para que se enviaran muestras de aquellas zonas donde existiera sospecha por parte del servicio veterinario de resistencia a los garrapaticidas en uso. Como resultado de la encuesta se constata que la problemática se localiza significativamente en la provincia de La Habana, donde el 60 % de las muestras enviadas resultaron resistentes a Cimiazol (Amidina) y el 76.2 % fueron resistentes a Clorfenvinfos (organofosforado). Se explican las causas del por qué de esta multirresistencia localizada en la provincia de La Habana.

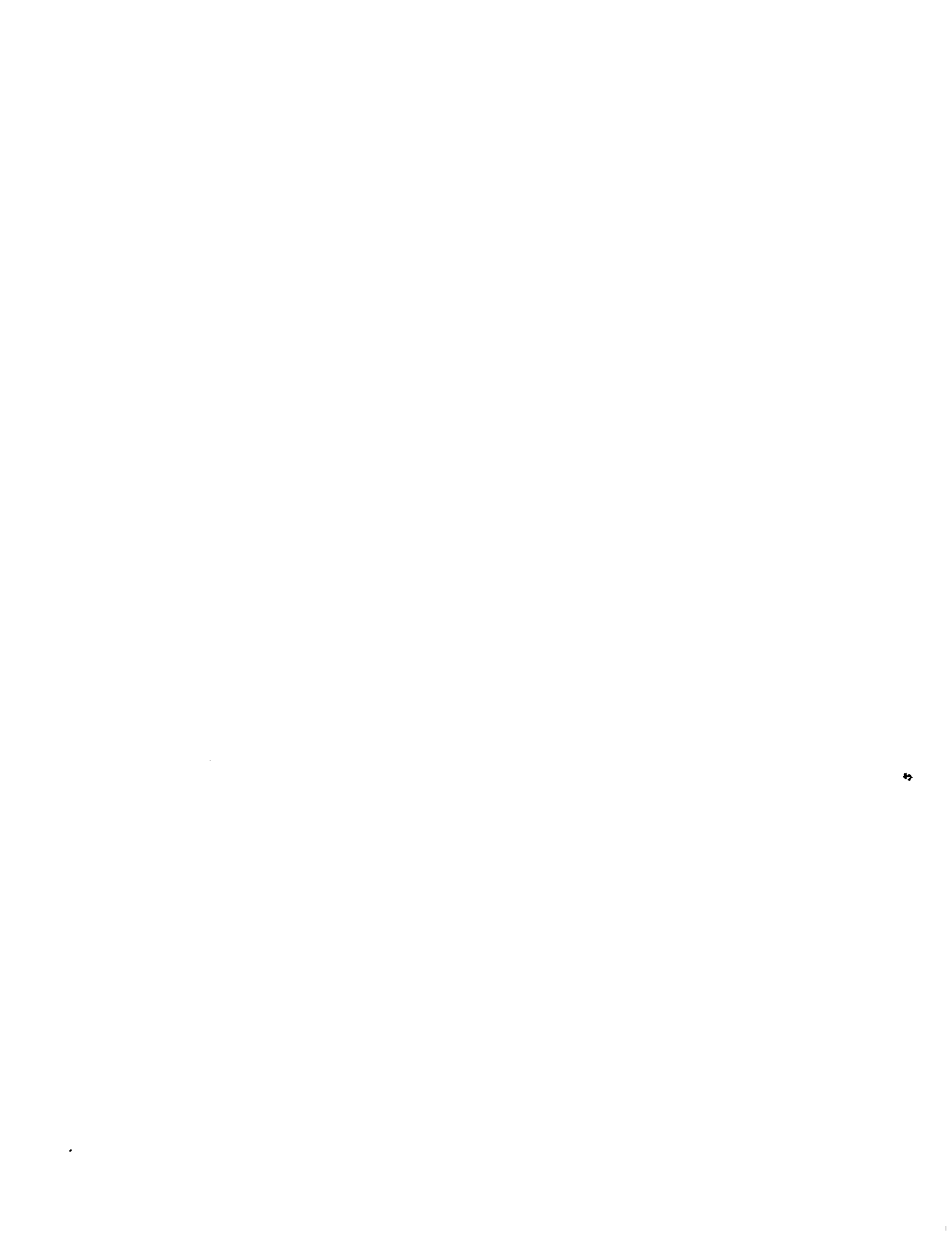
Además se exponen el conjunto de medidas que conforman la estrategia de Lucha Integrada contra las garrapatas que nuestro centro esta llevando a cabo en el país, destacándose que en los últimos años las perdidas por garrapatas han disminuido significativamente y los ciclos de baños garrapaticidas se han alargado hasta 60, 90 ó más días.

## REFERENCIAS

- FAO. 1987 Manual practico de campo. El control de las garrapatas y las enfermedades que transmiten. V.I. p. 140-183. FAO, Roma. Italia.
- Stilles C W, Hassall A. 1901. *Boophilus Australis* present in Cuba. *Cire. Burt Anim. Ind. S. Dep. Agric.* 34:3-4. Australia.
- Mayo N S. 1905. Algunos parásitos del ganado. *Crón. Med. Quir.* 31(2):27-31.
- Serrano V L. 1904. Cambio hemodinámicos y equilibrio ácido-básico en las babesiosis y anaplasmosis bovina. CIBA. p.12-20. Colombia.
- Villalba G C. *et al.* 1987. Fosforresistencia a *Boophilus micro-plus canestrini*. I. Valoración del espéctro de resistencia a tres cepas. *Rev. Cubana de Ciencias Veterinarias.* 13(3):1-6. Cuba.
- Vitorte Elena, Perez G. 1986. Resistencia a organofosforados en una cepa de *Amblyoma cajennense* en condiciones de campo. III Congreso Cubano de Ciencias Veterinarias. Resumen 8-9. Cuba.
- Valdés M, Rodríguez I, Milián A, Méndez L. 1997. Purificación de una cepa de garrapata *Boophilus microplus* multirresistente a organofosforado y amidinas. Resúmenes del XIII Congreso Latino Americano de Parasitología. pp.78. La Habana, Cuba.
- Santamaria M. 1994. Manual para la prueba de paquete de larvas para la determinación de suceptibilidad a acaricidas. Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. p.1-12.
- Drummond R.O. *et al.* 1974. Recent advances in the used of ixodicides to control ticks. Afecting lives tock boll of int Epiz. Vol. 81 (1-2), p.47-63.

**Tabla No. 1 Resultados de la encuesta nacional sobre la resistencia de las garrapatas a los acaricidas.**

<b>Resultados</b>	<b>LA HABANA</b>	<b>CIENFUEGOS</b>	<b>CAMAGUEY</b>
<b>Número de muestras Resistentes a Clorfenvinfos</b>	64	5	5
<b>Número de muestras Sensibles a Clorfenvinfos</b>	20	0	0
<b>Total de muestras investigadas para Clorfenvinfos</b>	84	5	5
<b>Porcentaje de muestras Resistentes a Clorfenvinfos</b>	76.2 %	100 %	100 %
<b>Número de muestras Resistentes a Cimiazol</b>	51	0	0
<b>Número de muestras Sensibles a Cimiazol</b>	34	0	0
<b>Total de muestras investigadas para Cimiazol</b>	85	0	0
<b>Porcentaje de muestras Resistentes a Cimiazol</b>	60 %	0	0



## LAS PROTEASAS Y EL CICLO BIOLÓGICO DE LAS GARRAPATAS

## THE PROTEASES AND THE BIOLOGICAL CYCLE OF THE TICKS

JUDITH MENDIOLA \*, MARIO VALDÉS \*\*

\* *Instituto Pedro Kourí, Apartado Postal 601, Marianao 13, Ciudad Habana, Cuba.*

*e-mail: [mendiola@ipk.sld.cu](mailto:mendiola@ipk.sld.cu)*

\*\* *Centro Nacional de Parasitología Veterinaria, San Antonio de los Baños, Cuba.*

Las proteasas en la relación hospedero-parásito han sido objeto de estudio frecuente en los últimos años. Estos estudios se fundamentan, por una parte, en el papel que juegan las proteasas en general en la catálisis de importantes reacciones biológicas tales como el metabolismo proteico, el remodelamiento tisular, el procesamiento de prohormonas, la coagulación sanguínea, la fibrinólisis y las reacciones inmunes; y por otra, en los experimentos que han demostrado la importancia de éstas en el establecimiento de la infección parasitaria ya sea porque facilitan la invasión de tejidos del hospedero, permiten la digestión de sus proteínas, ayudan a los parásitos a evadir la respuesta inmune y previenen la coagulación sanguínea.

Este trabajo presenta el resultado de la búsqueda de información sobre las principales características de las enzimas proteolíticas que han sido descritas en las familias *Ixodidae* y *Argasidae*; incluyendo los resultados recientemente obtenidos en los laboratorios de Parasitología del Instituto "Pedro Kourí". El objetivo es llamar la atención sobre las enzimas proteolíticas del ectoparásito como posibles blancos de la acción de acaricidas sistémicos o de anticuerpos protectores.

Se presentan los datos sobre: las proteasas ácidas intestinales y aisladas de ovarios de hembras repletas, las cuales presentan catálisis dependiente de grupos aspártico y dependiente de grupos de cisteína, respectivamente; así como de proteasas neutras intestinales; el hallazgo de catepsinas B y L en la ninfa de *Boophilus microplus*; la circulación hemolinfática de cisteíno proteinasas semejantes a catepsina L durante la oviposición; la presencia en glándulas salivales de una carboxipeptidasa con actividad convertidora de angiotensina que ha demostrado efectos vacunales en *Boophilus microplus* y de una aminopeptidasa actuando como antígeno reactivo con el suero de animales pluriinfestados. La revisión comprende el pH óptimo, la especificidad de sustrato, el peso molecular de las enzimas parcialmente purificadas o purificadas a homogeneidad, los estadios del ciclo de vida de los cuales se aíslan, la descripción en varias especies de garrapatas; su localización celular. La discusión versa sobre los antecedentes de enzimas similares en otras especies de parásitos; su relación con el control de la supervivencia y reproducción parasitaria; los posibles roles biológicos de estas enzimas en garrapatas y las evidencias de los experimentos *in vitro* e *in vivo*.

**LA PURIFICACION Y CARACTERIZACION DE UN  
ACETYLCHOLINESTERASE DESDE *Boophilus microplus***

**PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF AN  
ACETYLCHOLINESTERASE FROM *Boophilus microplus***

**ANDREW C. CHEN**

*USDA-ARS, Southern Plains Agricultural Research Center, 2881 F&B Rd., College  
Station, TX 77845, USA*

Acetylcholinesterase (AChE) has been implicated in the resistance of the cattle tick to organophosphorus pesticides (OP). However, no serious attempts have been made to purify and subsequently compare AChE from OP-resistant and susceptible ticks. Although several putative cDNAs for AChE have been identified, no direct evidence has been presented that these cDNAs do indeed encode AChE. We have purified an AChE to near homogeneity from a pesticide-susceptible strain of *B. microplus* by affinity chromatography. The biochemical properties of the purified enzyme have been characterized. Sequencing of the purified enzyme is underway to determine if it matches the deduced sequence from any of the putative AChE cDNAs.

**PURIFICACION DE UNA ESTERASA DE LARVAS DE LA CEPA DE *Boophilus microplus* COATZACOALCOS.**

**PURIFICATION OF A LARVAL ESTERASE FROM THE COATZACOALCOS STRAIN OF *Boophilus microplus***

JOHN H. PRUETT, ROBERT J. MILLER, ROBERT C. JAMROZ, FELIX D. GUERRERO

*Knipling-Bushland, U.S. Livestock Insects Research Laboratory, USDA-ARS, 2700 Fredericksburg Rd., Kerrville, TX 78028*

I. Introduction.....	67
II. objectives.....	67
A. purification design.....	68
III. Results and discussion.....	68

**I. INTRODUCTION**

The Coatzacoalcos (Cz) strain of *Boophilus microplus* was originally colonized at the Cattle Fever Tick Research Laboratory (CFTRL), Mission, TX, in 1994 with individuals obtained from a colony maintained at the National Parasitology Laboratory in Cuernavaca, Morelos, Mexico. The founding ticks were originally collected from a site south of Veracruz, Mexico. Results of bioassays, synergist studies, and enzyme analyses suggest that resistance to pyrethroid and organophosphate acaricides for the Cz strain is primarily the result of either metabolic detoxification and/or sequestration of the toxicant by metabolic esterases, rather than target site insensitivity.

**II. OBJECTIVES**

The objectives of this ongoing work are to purify and investigate a Cz strain metabolic esterase designated as EST9. We note intense hydrolytic activity in the region of this protein band ( $R_f \approx 0.6$ , 8% gel) on polyacrylamide gels (PAGE). Hydrolysis of the general esterase substrate,  $\gamma$ -naphthyl acetate, and the pyrethroid acaricide permethrin, by extracted proteins was  $\approx 4.5$  fold greater for the Cz strain than for an acaricide susceptible control strain. The enhanced activity and/or overexpression of EST9 esterase suggests a possible mechanistic role for this esterase in the observed resistance to pyrethroid and

organophosphate acaricides. In this presentation I will discuss the purification of Cz EST9 to single band purity.

#### **A. Purification design**

Cz strain larvae (10 day old, 5 grams) were powdered frozen with a mortar and pestle. Esterases were extracted with a Tris-borate buffer pH 8.06 (50 mM Tris, 70 mM boric acid) containing 1 mM dithiothreitol. Sequential purification methods used to purify EST9 included DEAE anion-exchange chromatography, isoelectric focusing, and continuous elution PAGE utilizing the BioRad 491 Prep Cell apparatus.

### **III. RESULTS AND DISCUSSION**

Initial step purification with DEAE anion-exchange chromatography yielded a fraction that contained the esterases of interest. Further purification of the anion-exchange fraction with isoelectric focusing concentrated the bands of interest into 3 fractions ranging in pH from 2.67 to 4.85. These electrofocused fractions were pooled and the EST9 esterase was purified to single band purity with continuous elution PAGE. Subsequent analysis of the EST9 pooled fractions suggested a substantial loss of esterase activity. Purity could be determined, but an evaluation of the purified esterase for the ability to hydrolyze permethrin was inconclusive. Currently we are evaluating other esterases within the sample for their ability to hydrolyze permethrin and evaluating methods to stabilize the purified EST9 protein to preserve esterase activity.



# **EXPRESION DE GENES DE GARRAPATA EN EL SISTEMA DE BACULOVIRUS.**

## **CATTLE TICK GENE EXPRESSION IN THE BACULOVIRUS SYSTEM.**

**ESTEFAN MIRANDA-MIRANDA\*, RAQUEL COSSIO-BAYUGAR\*, JOHN E. GEORGE\*\*, SURYAKANT D. WAGHELA\*, GALE G. WAGNER \***

*\* College of Veterinary Medicine, Texas A&M University.*

*\*\* Agricultural Research Services USDA.*

Currently the resistance to acaricides in ticks is recognized through failure to control the ticks rather than through early detection of resistance in the ticks, the larval packet test currently in use takes a long time to obtain what are sometimes ambiguous results. Thus it is necessary to identify and characterize the mechanism(s) of resistance so that a rapid test to identify ticks resistant to the acaricides can be developed. Acaricide resistance in Boophilus spp. ticks is a global problem requiring immediate and increased research to understand the process of resistance development. Resistance of ticks to several pyrethroids acaricides have been correlated to high levels of esterase, suggesting hydrolysis by enzymes in the degradation. A process of esterase-induced detoxification has been proposed to produce resistance during the ticks exposure to acaricides. Small quantities of esterases are normally found in susceptible B. microplus, but both P and OP resistant strains show an increase in the expression of at least two different esterases, suggesting an overexpression similar to that found in other pesticide resistant arthropods.

Well-characterized, laboratory stock colonies of OP and P resistant and susceptible B. microplus ticks were used (courtesy of Dr. Ron Davey, USDA, ARS Fever Tick Research Laboratory, Mission Texas and Dr. Zeferino Garcia INIFAP National Center for Research in Veterinary Parasitology, Jiutepec, Mexico). A consensus sequence was identified in the 3' side of the esterase genes from different arthropods using the Geneworks® multiple alignment software and a gene specific oligonucleotide was designed complementary to the 3' consensus found. PCR amplification was performed using cDNA from the tick material. The pcr amplified products were cloned and sequenced, the aminoacid sequences were analyzed to find possible post-translational variations that could account for a difference in esterase catalytic function.

The sequences of esterase genes obtained from resistant ticks with potential postranslational variations as compared to those obtained from sensitive strains, were selected for subcloning in the Baculovirus system. The esterase genes were inserted into a Baculovirus transfer vector and recombinant viruses were obtained by cotransfecting the cells with Baculovirus DNA and vector DNA of the transfer vector esterase gene clone. Plaque assays on the cotransfection supernatant were done to obtain individual viral plaques.

**Recombinant viruses were identified to confirm that they have incorporated the target gene and/or express the target protein.**

**The expressed recombinant proteins showed similar biochemical properties to an esterase found in an acaricide resistant strain of *B. microplus*. The postranslational modifications of the enzyme expressed in the insect cell line were similar to those enzymes produced by the tick. The catalytic activity of the recombinant esterase was similar to that found in tick's extracts. The availability of large amounts of recombinant resistance related proteins will permit a series of analytical approaches towards the understanding and diagnosis of the acaricide resistance in *B. microplus*.**

**DETECCION DE UNA MUTACION DE PUNTO EN EL GENE DE CANAL DE SODIO DE CEPAS RESISTENTES A PIRETROIDES DE LA GARRAPATA DEL GANADO (*Boophilus microplus*) POR LA REACCION EN CADENA DE POLYMERASA DE UN FRAGMENTO DE RESTRICCION POLIMORFICO (MPPCR-RFLP).**

**DETECTION OF A POINT MUTATION IN THE SODIUM CHANNEL GENE FROM PYRETHROID RESISTANT STRAINS OF CATTLE TICK (*Boophilus microplus*) BY MISMATCH-PRIMER MEDIATED POLYMERASE CHAIN REACTION-RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM (MPPCR-RFLP).**

HAIQI HE, ANDREW C.

*Chen, USDA-ARS, Southern Plains Agricultural Research Center, 2881 F&B Rd., College Station, TX 77845, USA*

The voltage-sensitive sodium channel is the target site for pyrethroid pesticides in insects. A number of studies have linked the pyrethroid resistance (knockdown resistance, *kdr*) to the *para* (*Drosophila melanogaster*) homologous sodium channel genes in several insects. We have obtained and sequenced a partial *para*-homologous sodium channel cDNA from pyrethroid-resistant and susceptible *Boophilus microplus* strains in an attempt to determine the molecular mechanism of resistance to pyrethroids in this tick. No mutation was found in the location homologous to the *kdr*. However, in tick strains that are highly resistant to pyrethroid acaricides, a single nucleotide mutation in the highly conserved domain IIIS6 of the sodium channel gene was identified which resulted in an amino acid change from Phe to Ile. To detect the mutation, a sensitive and simple PCR-based method (mismatch-primer mediated polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism, MPPCR-RFLP) has been designed. This method uses a mismatching primer to create a restriction site in the mutant allele by PCR amplification. After digestion, PCR products containing wild-type and mutant alleles produce a fragment length polymorphism on electrophoresis that is easily discernible.



**LA DETECCION DE UNA MUTACION DE PUNTO DE UN GEN DE ESTERASA  
EN *Boophilus microplus*.**

**DETECTION OF A POINT MUTATION IN AN ESTERASE GENE IN *Boophilus  
microplus* TICKS.**

RUBEN HERNANDEZ <sup>1,2</sup>, HAIQI HE <sup>3</sup>, ANDREW C. CHEN <sup>3</sup>, SURYAKANT D.  
WAGHELA <sup>1</sup>, G. WAYNE IVIE <sup>3</sup>, JOHN E. GEORGE <sup>4</sup>, G. GALE WAGNER <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dept. of Veterinary Pathobiology, Texas A&M University, College Station, TX. 77843.

<sup>2</sup>Cenid-PAVET, INIFAP-SAGAR, AP 206 Civac, Mor. CP 62500, Mexico.

<sup>3</sup>SPARC, USDA-ARS, 2881 F&B Road, College Station, TX 77845.

<sup>4</sup>Knipling-Bushland US LIRL, USDA-ARS, 2700 Fredericksburg Road, Kerrville, TX  
78028.

In recent years, tick control has become difficult because of the development of resistance to the acaricides in ticks. In many arthropod pests, resistance to pesticides has been attributed to an increase in insecticide degrading enzyme activity. However, in most cases it is not known whether this arises from enzymes produced by mutant genes or from the increased production of an enzyme already present in the susceptible insects. The objective of this research was to find differences in esterase cDNA sequences between susceptible and resistant strains of *B. microplus*.

Following a strategy based on degenerate primers derived from amino acid sequences of acetylcholinesterase from other species, two esterase cDNA sequences from *Boophilus microplus* were obtained from a susceptible and an organophosphorus resistant strain. Both sequences were identified as belonging to carboxylesterase B. One of the genes conserved identical sequences in both the susceptible as well as the OP resistant strain, whereas in the other gene two point mutations are noted, one of which changes the deduced amino acid sequence. This mutation was detected in six different populations of ticks that were susceptible or resistant to acaricides. However, when a PCR assay was carried out to detect the mutant allele in individual tick larvae, the resistant strains showed a mutant allele frequency from 40 to 100%; in contrast, the reference susceptible strain had 12%.

When southern blot was carried out using specific probes, a pyrethroid resistant strain that had 100% of mutant alleles, also showed a strong hybridization signal. The high mutant allele frequency and the strong signal detected in southern blot with this strain could indicate the presence of an esterase contributing to metabolic detoxification of pyrethroid compounds as one resistant mechanism in Mexican strains of the southern cattle tick.



# INMUNOPROTECCION CON UN INHIBIDOR DE SERIN PROTEASA DE LARVA NO ALIMENTADA DE *Boophilus microplus* EN BECERRAS

## A SERINE PROTEINASE INHIBITOR IMMUNOPROTECTION FROM *Boophilus microplus* UNFED LARVAE IN CALVES.

RENATO ANDREOTTI\*, CLAUDIO A M. SAMPAIO\*\*, ALBERTO GOMES\* AND APARECIDA S. TANAKA\*\*.

\* *EMBRAPA - Gado de Corte, Campo Grande, MS, Brazil*

\*\* *Departamento de Bioquímica, UNIFESP-EPM, São Paulo - SP, Brazil*

Correspondence to: Renato Andreotti. UW-Madison, 2015 Linden Drive West Madison WI, USA 53706. [silvar@svm.vetmed.wisc.edu](mailto:silvar@svm.vetmed.wisc.edu)

I.	Introduction.....	75
II.	Materials and methods.....	76
III.	Results and discussion.....	77
	Acknowledgments.....	79
IV.	References.....	79
	Figure 1A.....	81
	Figure 1B.....	82
	Figure 2A.....	83
	Figure 2B.....	84
	Figure 3A.....	85
	Figure 3B.....	86

### I. INTRODUCTION

The tick, *Boophilus microplus*, is an important cattle parasite in South and Central America, Australia, Asia and Africa. Ticks in heavy infestation can cause death in cattle and is responsible for the transmission of diseases like anaplasmosis and babesiosis.

Tick control can be achieved by application of chemical products, but the development of resistance to many acaricides has created problems to this approach (Roulstan et al., 1981). Cattle acquire a partial immunity to the ectoparasite due largely to an immediate hypersensitivity reaction to the tick after extensive natural exposure. However, this is still insufficient protection to prevent serious losses in cattle production (Rodriguez et al., 1994). More recently, the first ectoparasite vaccine has been developed in Australia and commercially released under the name 'TickGARD'. The publication of the gene sequence enabled the development of a similar vaccine in Cuba (Willadsen et al., 1995). The

vaccine's active antigen, named Bm86 for the species of origin and the year in which it was first identified, is an 89 kDa glycoprotein with an extracellular location on the digestive cells of the tick gut (Gough and Kemp, 1993).

The identification and characterization of other protective antigens can be important in developing recombinant vaccines with long protection. It is possible that a vaccine containing more than one antigen may elicit a cooperative effect on protection (Willadsen, 1990). Following this idea, biochemical function of many molecules has been characterized to understand the complex interactions, which occur between parasites and their hosts.

Several proteinaceous components, including proteinase inhibitors, present in tick eggs and larvae have been described (Willadsen and McKenna, 1983; Willadsen and Riding, 1980), and some of this activity was connected with toxicity observed in guinea pigs (Vermeulen et al., 1988). The eggs and unfed larvae of the ectoparasite, *B. Microplus*, contain at least two proteolytic enzyme inhibitors that inhibit trypsin and/or chymotrypsin (Vermeulen et al., 1988).

*B. microplus* larvae have at least two forms of trypsin inhibitors, they were previously reported by Willadsen and Riding (1980). They were described as doubled-headed inhibitors that are able to inhibit two enzyme molecules at the same time for example trypsin and chymotrypsin.

A serine protease inhibitor from *B. microplus* larvae was preliminarily characterized; the inhibitor was purified by affinity chromatography on trypsin-Sepharose and ion-exchange chromatography on Resource Q column, showing an active peak, with 18 kDa. The purified protein inhibited trypsin (K<sub>i</sub> 3.0 nM), elastase, (K<sub>i</sub> 1.4 nM), and plasma kallikrein (K<sub>i</sub> 120 nM). The inhibitor did not change prothrombin time (PT) and thrombin time (TT), but it affected activated-partial-thromboplastin time (APTT) in a dose-dependent function (Andreotti et al., in press). Moreover this inhibitor (BmTI-A) was purified and characterized as a member of the BPTI-Kunitz type serine protease inhibitor family. (Tanaka et al., in press)

The present work describes the effect of immune response of this larval serine proteinase inhibitor on growth and reproduction of the *B. microplus* larvae.

## II. MATERIALS AND METHODS

Tick larvae production: *Boophilus* larvae were obtained by culture of engorged female ticks in the lab. This tick strain were obtained from Dr Raul Henrique Kessler at EMBRAPA and were free of infection by *Babesia bigemina*, *Babesia bovis* and *Anaplasma marginale*.

Serine proteinase inhibitor purification: Larvae ticks (1.13 g) were ground in a mortar with 5 mM tris-HCl buffer (pH 7.4) contain 20 mM NaCl (50 mL). The resulting homogenate was centrifuged at 10000x g for 30 min in a centrifuge (Hitachi model SCR20B). The resultant supernatant (42 mL) was filtered using 0.45 µM filter (Millipore). The filtrate (8 mL) was applied to trypsin-Sepharose column followed by washing with 0.05 M tris-HCl buffer (pH 8.0), and then elution bound inhibitors with 0.2 M KCl solution (pH 2.0). Fractions were immediately neutralized with 1 M tris-HCl buffer (pH 8.0). The fractions containing the inhibitory activity from several chromatographic runs were pooled and lyophilized. The concentrated material (1.8 mL) was desalted in a PD-10 column and



eluted with distilled water. The partial purification was made according to (Tanaka et al., in press).

**Animals:** Six *Bos indicus* nelore calves about 6 months old and around 150 kg. Animals were housed in pens during the development of essay. They were allocated into vaccinated and control groups each consisting of 3 calves. The blood was sampled weekly and the serum was frozen until tested.

**ELISA:** Specific IgG antibodies to the larvae proteinase inhibitors were detected by an ELISA test. Microtitation plates were coated with 1 µg/ml of larval proteinase inhibitor antigen in 20 mM carbonate buffer (pH 9.6) by incubation overnight at 4 C (Harlow and Lane, 1988). The plates were washed five times with 0.1% PBST. One hundred µl of bovine serum, diluted 1:100 in PBST, were added to each well and incubated for 45 minutes at 37° C. After washing 50 µl of rabbit anti-bovine IgG alkaline phosphatase conjugate (Sigma Chemical Co, St Louis, MO), diluted 1:18.000 in PBST, were added to each well and plates were incubated for 30 minutes.

After washing plates with PBST, 50 µl of the substrate p-nitrophenyl phosphate (1.0 mM) were added to each well. Reactions were stopped after 15 minutes by addition of 100 µl of NaOH (0.2M) to each well. Values were obtained using microplate reader at a wavelength of 405nm (Araújo, *et al.*, 1998).

**Experimental design:** The vaccination protocol involved two subcutaneous immunizations with 100 µg of the inhibitor and a saponin adjuvant with a period of 21 days. The control group received only the saponin with saline solution.

Three weeks after the second inoculation both groups received a challenge infestation with 20,000 larvae/animal. Engorged ticks were collected immediately after falling off, weighted and incubated at 28° C and 80% humidity until egg laying. Eggs were weighted and incubated to be evaluated in their hatchability. The hatchability was measured as the percent of larvae emerging from each egg clutch for each engorged tick.

### III. RESULTS AND DISCUSSION

In this work the inhibitor was partially purified by affinity chromatography on a trypsin-Sepharose column. The inhibitors were divided into two groups according to their molecular masses, which were around 10 and 18 kDa (Tanaka et al., in press).

The data displayed in the Figure 1A show that vaccination of calves resulted in a 73.5% reduction in the mean tick number. The mean weight of ticks collected from vaccinated calves was reduced in 84% (Figure 2B). These data show that vaccination produced an overall significant decrease in tick biomass.

The effect not only can be showed in engorged ticks number and biomass produced, but also in the time of peak production. Vaccinated group showed that production peaked two days later in the engorged period (Fig 1B and 2B). This effect of delayed tick development was reflected a three days of delay in the peak egg laying. (Figure 3B)

When the mean weight of ticks was compared of number between both groups, the data showed a reduction of the 41% tick biomass for the vaccinated calves.

The evaluation of the reproduction effect is showed in the first step with the evaluation of the eggs biomass production from laid eggs. The cumulative weight of eggs laid by engorged tick shows 9.6 gr. for the vaccinated group and 68.34 gr. for the control group. Figure 3A shows that the reduction of egg production in the vaccinated group was 86%. The effect in the individual tick when the mean of both groups were compared was about 50% of reduction in ticks for vaccinated calves.

The mean number of larvae that hatched from eggs of ticks collected from vaccinated calves was reduced by 24%.

Results of the serology study showed that vaccinated calves all had positive values reaction at maximum titer of 5,000 and this titer persisted until the last evaluation when the engorged period finishes. Antibody reactivity to the test antigen was not detected in the control groups. Those data suggest that bovine under natural conditions are not immune-stimulated by tick inhibitor when they are bitten by ticks. Apparently the amount of inhibitor introduced during a tick bite was not enough to stimulate the immune response.

In addition the characteristics of kallikrein inhibition in the site of attachment may play an important role by inhibition of bradykinin formation, the pain mediator, and edema forming consequently preventing the tendency to scratch which could lead to the removal of the parasite (Brossard, 1998).

The calves used in the essay did not lose weight or total plasma protein and they did not develop any skin reaction from the time of the first vaccination until the final collection of engorged ticks. Also no edema was observed in the animals, although the edema can has been shown to be a significant component in tick rejection reactions (Ribeiro, 1989). Possibly the absence of edema might signify that the tick reaction was reduced sufficiently to not even produce edema.

It is clear that larvae need an efficient system to prevent blood clotting and the inflammation response during feeding. The hypersensitivity in the larval attachment site was found, so the inhibition of elastase-like enzyme may decrease this response. The double action of this inhibitor on both clotting and inflammatory enzymes might be an economical solution on the feeding process (Tanaka et al., in press). Not only did immunization of calves with inhibitor reduce the number and weight of the ticks which developed on vaccinated calves, but it also strongly reduced the reproductive capacity as demonstrated by a decreased biomass production of eggs and decreased hatchability.

Unfed larvae on the bovine skin died if they do not feed quickly by lose of water. In resistant animals they need frequent and short attachments causing stress to the tick state (Kemp et al., 1976), and it is at this point in the life cycle that larvae are in their most vulnerable state. Also for the host, ticks have not yet begun to provoke any negative consequence related to taking large blood meals.

This work showed that immunoprotection was induced in calves by a serine proteinase inhibitor from *B. microplus* unfed larvae: not only the number and the weight of the ticks were reduced, but also their reproductive capacity.

As a pilot study this work raises several questions in this inhibitor immune protection studies: how much of protein need to inoculate to improve the immune response? what kind of adjuvant has the best antigen potentiality? how long and what kind of immunity it develops.

## **Acknowledgments**

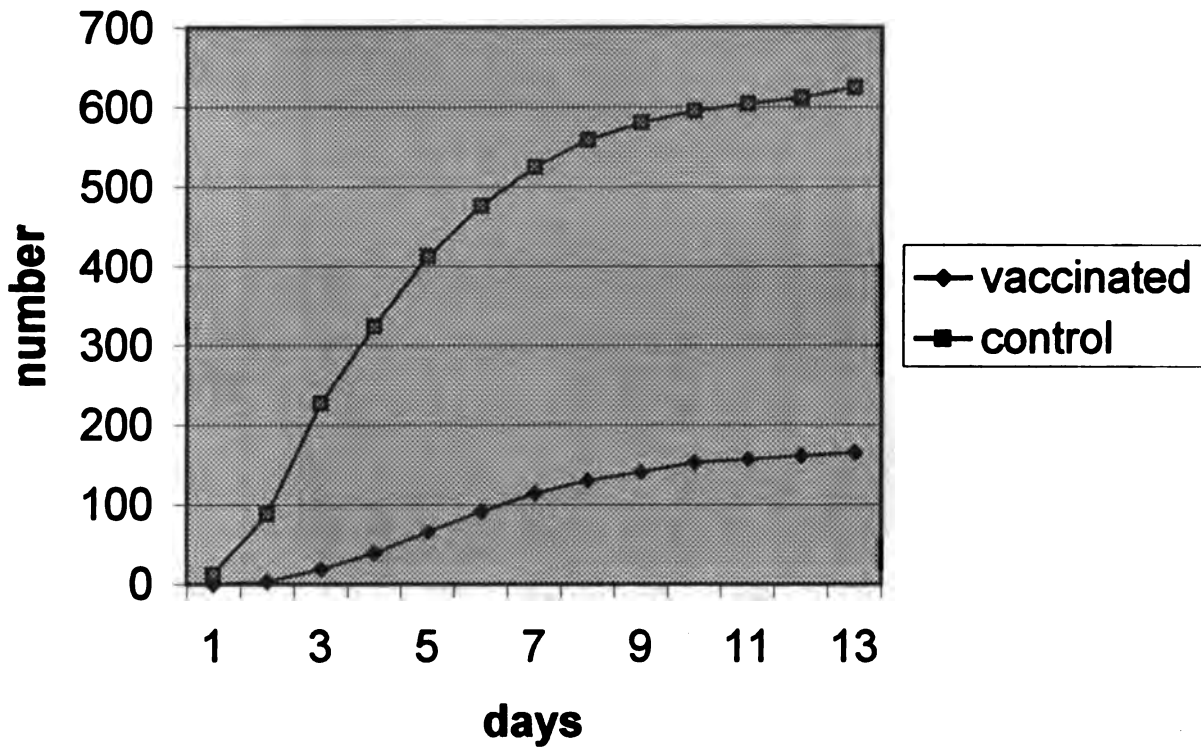
We thank Raul Henrique Kesler from EMBRAPA for providing the tick strain and Claudio Roberto Madruga for sharing the lab. This research was supported by project 176.21 EMBRAPA/Gado de Corte, FAPESP and CNPq (Brazil)

## **IV. REFERENCES**

- Andreotti, R.; Gomes, A.; Torquato R.J.S.; Sampaio, C.A.M. & Tanaka, A. S. 1999. Serinoprotease inhibitor partial purification from *B. microplus* larvae. *Braz. J. of Vet. Parasitol.* (in press)
- Araújo, F.R.; Madruga.C.R.; Leal,C.R.B; Bastos,P.A.S and Marques,A.P.C. 1998. Frequência de anticorpos anti-*Anaplasma marginale* em rebanhos leiteiros da Bahia. *Arq.Bras.Med.Vet.Zootec.*, 50;:3:243.246.
- Brossard, M. The use of vaccines and genetically resistant animals in tick control. 1998. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 17(1), 188-199.
- Gough, J. M., Kemp, D. H., 1993. Localization of a low abundance membrane protein (Bm86) on the gut cells of the cattle tick *Boophilus microplus* by immunogold labeling. *J. Parasitol.* 79, 900-907.
- Kemp, D.H.; Koudstaal, d.; Roberts, J.A.; Kerr, J.D. (1976). *Boophilus microplus*: the effect of host resistance on larval attachments and growth. *Parasitology*, 73: 123-136.
- Ribeiro, J.M., 1989. Role of saliva in tick/host interactions. *Exp & Applied Acarology* 7, 15-20.
- Rodríguez, M., Rubiera, R., Penichet, M., Montesinos, R., Cremata, J., Falcón, V., Sánchez, G., Bringas, R., Cordovés, C., Valdés, M., Lleonart, R., Herrera, L., la Fuente, J., 1994. High-level expression of the *B. Microplus* Bm86 antigen in the yeast *Pichia pastoris* forming highly immunogenic particles for cattle. *J. Biotechnol.* 33, 135-146.
- Roulstan, W. J., Wharton, R. H., Nolan, J., Kerr, J. D., Wilson, J. T., Thompson, P. G., Schotz, M., 1981. A survey for resistance in cattle ticks to acaricides. *Aust. Vet. J.* 57, 362-371.
- Tanaka, A. S.; Andreotti, R.; Gomes, A.; Torquato, R.J.S.; Sampaio, M.U. and Sampaio,C.A.M. A Double headed serine proteinase inhibitor - Human plasma kallikrein and elastase inhibitor - from *Boophilus microplus* larvae. *Immunopharmacology* (in press)

- Vermeulen, N. M. J., Viljoen, G. J., Bezuidenhout, J. D., Visser, L., Neitz, A. W. H., 1988. Kinetic properties of toxic protease inhibitors isolated from tick eggs. *Int. J. Biochem.* 20, 621-631.
- Willadsen, P., 1980. Immunity to ticks. *Adv. Parasitol.* 18, 293-313.
- Willadsen, P., 1990. Perspectives for subunit vaccines for the control of ticks. *Parasitologia Rome* 32, 195-200.
- Willadsen, P., McKenna, R. V., 1983. Trypsin-chymotrypsin inhibitors from the tick, *Boophilus microplus*. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.* 61, 231-238.
- Willadsen, P., Riding, G. A., 1980. On the biological role of a proteolytic-enzyme inhibitor from the ectoparasitic

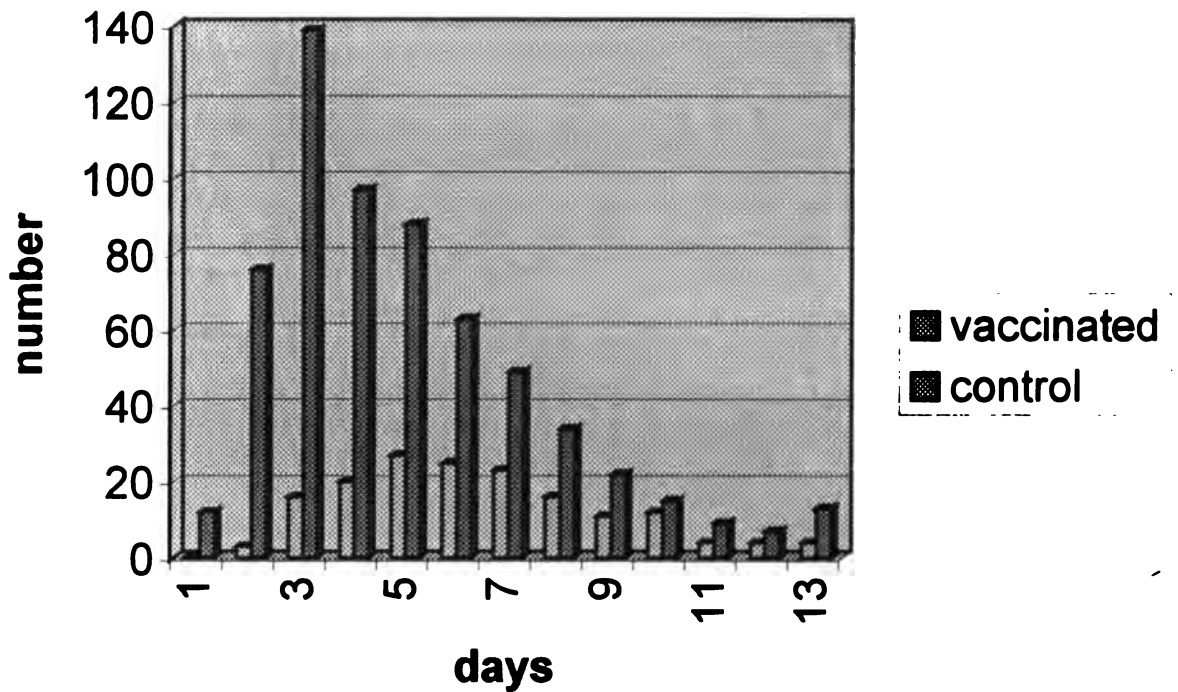
## Number of engorged ticks produced in the challenge



**Figure 1A** – Number of engorged ticks collected in the engorging period after challenging with 20,000 larvae. The data show accumulation of the ticks during of engorging period. From the vaccinated group were collected 624 engorged ticks and 165 from the control group. The overall reduction of engorged ticks in the vaccinated group was of 73.5% when compared with control group.

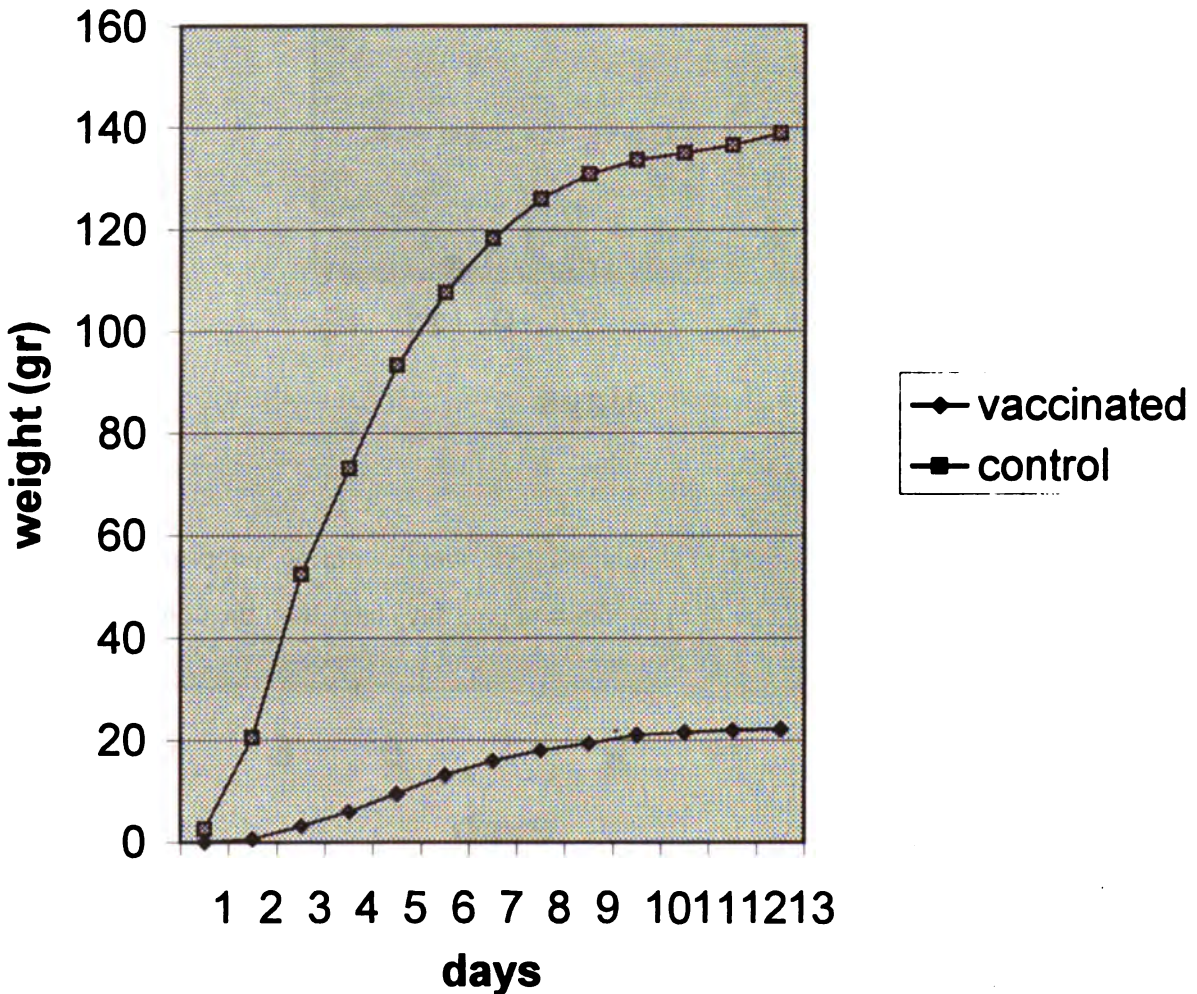
---

## Distribution of number of engorged ticks in the engorging period



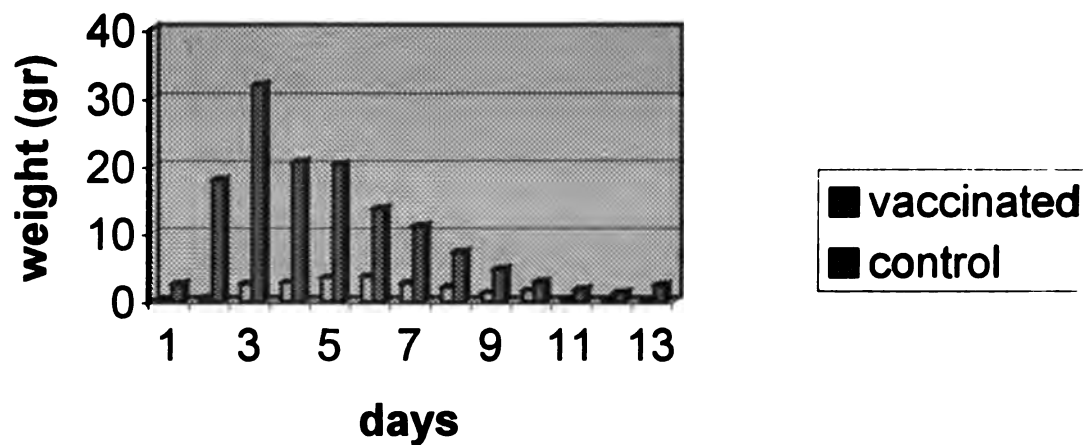
**Figure 1B** – Shows the distribution of engorged tick number during engorging period. The peak was two days later in the vaccinated group.

## Cumulative engorged tick weight in the engorging period



**Figure 2A.** Accumulation of weight in amount of engorged ticks collected during engorging period. In this period the vaccinated group accumulated 9,6 gram and the control group 68,3. The vaccinated group showed a reduction of total weight of 84,1% when compared with control group.

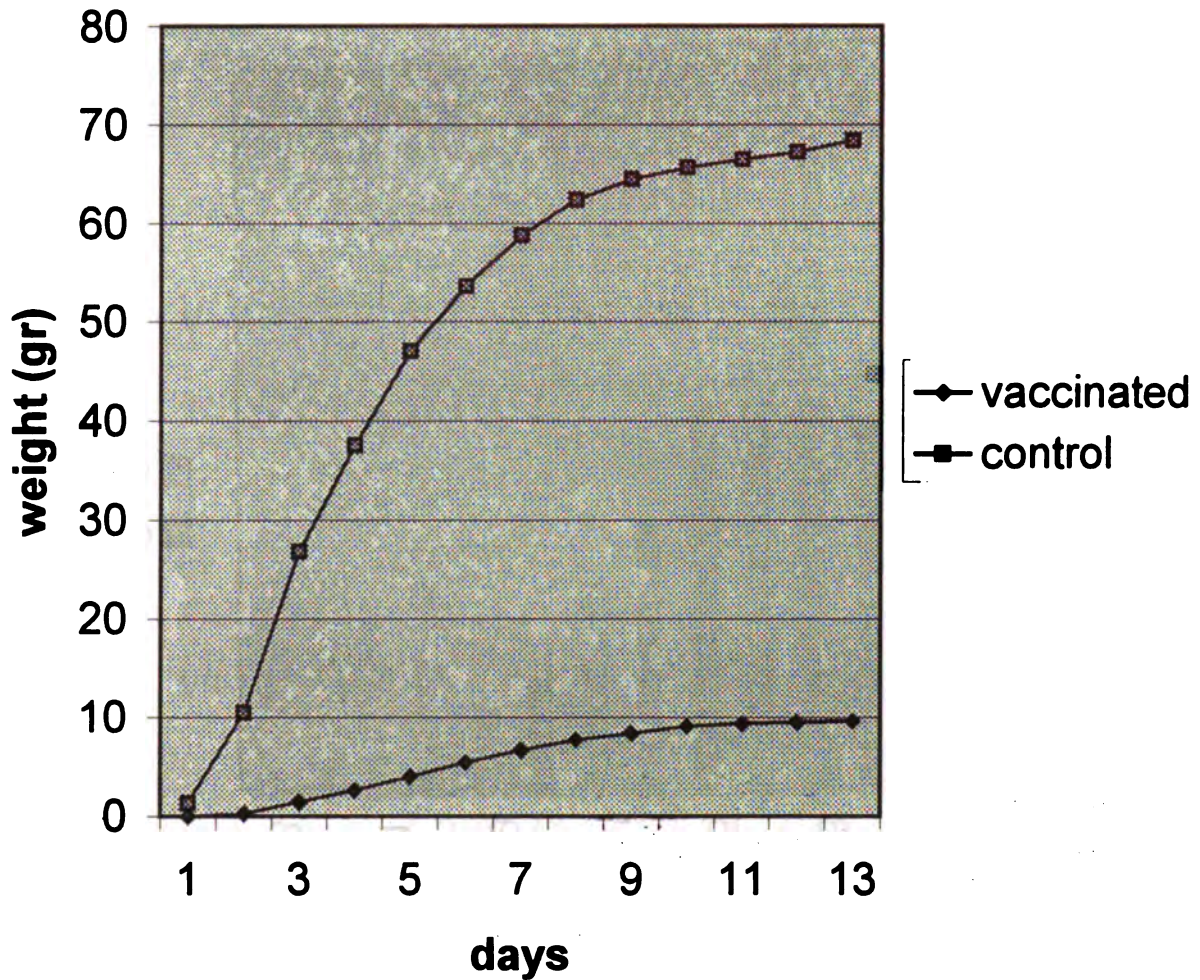
## Distribution of weight production from engorged ticks in the engorging period



**Figure 2B** – The distribution of engorged tick weight during engorging period. The vaccinated group showed the peak of production two days later than the control group.

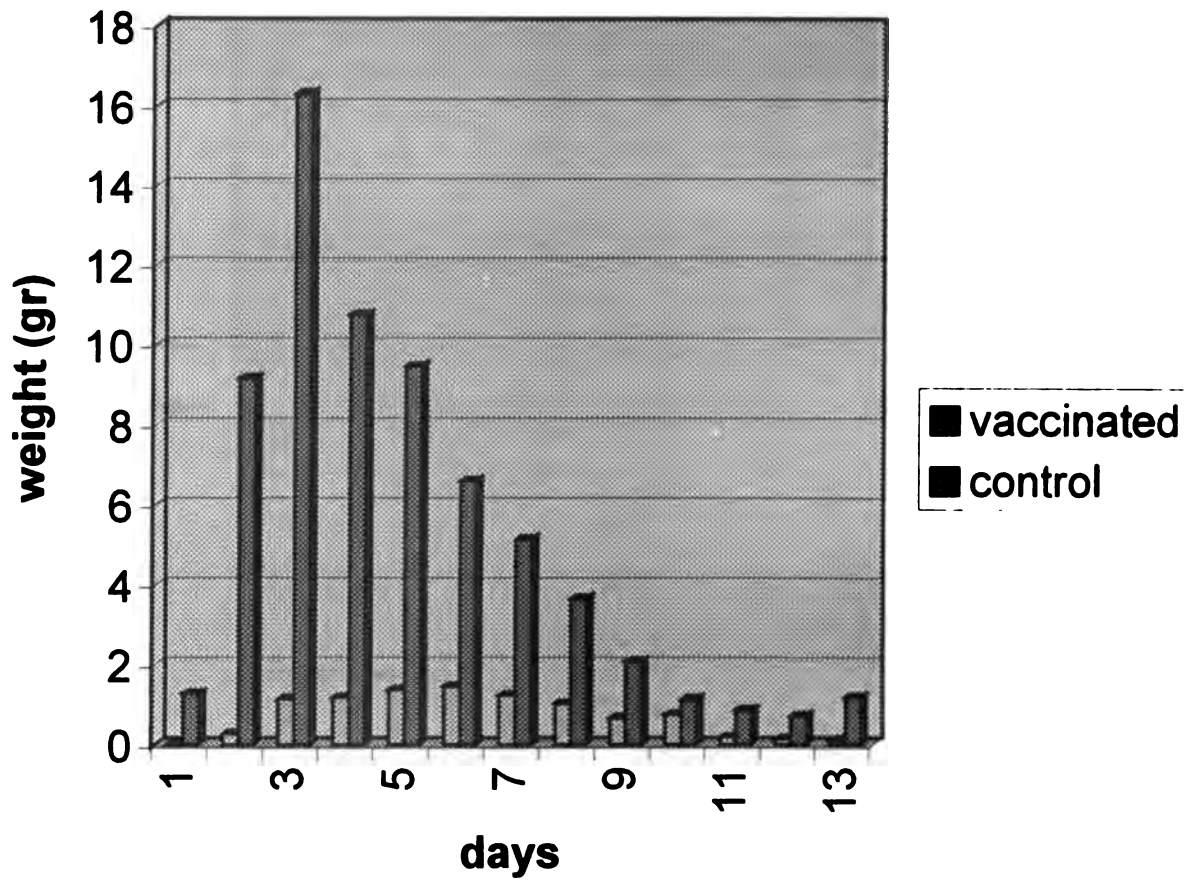


## Cummulative weight of egg laying



**Figure 3A** – The cumulative weight of eggs laid by the engorged ticks shows a cumulative total of 9.6 grams for the vaccinated group and 68.34 grams for the control group. The reduction in the production of eggs in the vaccinated group was 86% when compared with control group.

## Distribution of egg weight during egg laying period



**Figure 3B** – The distribution of egg weight during the egg laying period. The vaccinated groups showed the peak three days later than control group.

**IDENTIFICACION DE UNA PROTEASA NEUTRA DE INTESTINO DE *Boophilus microplus* POR ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA COPOLIMERIZADA CON GELATINA.**

**IDENTIFICATION OF NEUTRAL PROTEASE FROM GET OF *Boophilus microplus* BY ELECTROFORESIS COPOLIMERIZED WITH GELATINE POLYACRILAMIDE.**

H.M. HERNÁNDEZ,\* B.J. MENDIOLA,\* A. FERNÁNDEZ-CALIENES\* Y MARIO VALDÉZ\*\*

\* *Instituto de Medicina Tropical "Pedro Kouri". Apartado Postal 601. Ciudad Habana, Cuba.*

\*\* *Centro Nacional de Parasitología. San Antonio de los Baños, Cuba.*

I.	Introducción.....	87
II.	Materiales y Métodos.....	88
III.	Resultados.....	89
VI.	Discusión.....	89
V.	Resumen.....	90
VI.	Summary.....	90
VII.	Referencias.....	91
	Tabla.....	93

## I. INTRODUCCIÓN

*Boophilus microplus* es un ectoparásito del ganado, vector de hemoparásitos como *Babesia* sp. y *Anaplasma* sp., que causa pérdidas económicas significativas en áreas tropicales y subtropicales.

El intestino en garrapatas, es el sitio donde tiene lugar el proceso de digestión de donde se obtiene la masa y la energía necesaria para la realización de múltiples procesos fisiológicos (Grandjean, 1984). Los estudios realizados en *Rhiphicephalus sanguineus* y *Dermacentor variabilis* han demostrado que el estómago es uno de los sitio de síntesis de vitelogenina (Coons y otros, 1982; Tarnowski, 1983), la que es transportada al ovario vía hemolinfa y convertida en vitelina, constituyente del huevo. Además de constituir una vía de penetración de microorganismos al interior de la garrapata (Kocan, 1995).

Raikhel (1983) planteó que las garrapatas ixódidas se caracterizan por una combinación de tres tipos de digestión: externa, del lumen intrainestinal e intracelular. La fase digestiva externa ocurre mediante el efecto lítico de la saliva; la segunda o

intraluminal se limita a una más completa lisis de las células sanguíneas a través de las secreciones de células secretoras y la intracelular ocurre en las células digestivas especializadas la cual tiene un papel dominante; ya que los componentes sanguíneos sufren hidrólisis completa.

Sin embargo, diferentes autores están en desacuerdo en que si ocurre digestión en el lumen intestinal. La presencia de aminoácidos libres en el lumen intestinal ( Boctor y Araman, 1971) y en el material fecal (Hamdy, 1977) en garrapatas se ha utilizado para sugerir la presencia de digestión en el lumen intestinal (Agyei y otros, 1992). Aunque, la fuente de estos aminoácidos puede ser la sangre del hospedero o células digestivas lisadas. Una enzima que pueda funcionar en el lumen intestinal de las garrapatas no ha sido todavía identificada, (Coons y otros 1986) dado que el pH de los contenidos intestinales es 6.3- 6.5 (Bogin y Hadani, 1973) y lo que sí ha sido demostrado es que la digestión de proteínas ocurre a pH ácido mediante aspártico proteinasas que son inactivas por encima de pH 6.0 (Vundla y otros, 1992; Mendiola y otros 1996).

En la última década el estudio de las serino proteinasas en artrópodos ha despertado gran interés por constituir mediadores esenciales de ciertos procesos fisiológicos (Rosenfeld, 1998). Se ha demostrado que estas proteinasas están involucradas en la digestión del alimento dentro del intestino, en la activación de la cascada de la fenoloxidasas en respuesta a las infecciones microbianas, en la destoxificación de agentes nocivos tales como insecticidas y en la modulación del desarrollo embrionario.

✓ En el presente reporte se describe el hallazgo de una actividad endopeptidasa neutra de *B. microplus* por electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizada con gelatina.

## II. MATERIALES Y METODOS

Las garrapatas utilizadas en el estudio corresponden a una cepa de campo, libre de *Babesia* sp., mantenidas en los laboratorio del Centro Nacional de Parasitología Veterinaria por pases sucesivos en ganado Holstein. Posterior a la infestación del bovino con larvas, las garrapatas repletas fueron colectadas. Las garrapatas fueron disectadas en salina fisiológica a 4°C y el fue extracto preparado según la metodología descrita por Mendiola y otros en 1996.

La actividad proteinasa fue detectada en geles de poliacrilamida al 10 % impregnados en gelatina al 0,1 % según la metodología descrita por Heussen y Dowdle (1980). Las muestras fueron diluidas en el tampón muestra (xilene cianol 0,02% en sacarasa al 15 %) a temperatura ambiente. El tampón de corrida empleado fue tris - borato 0,045 M y 0.001 M EDTA, pH 8,0 a 4°C. Después de transcurrida la electroforesis el gel fue cortado en tiras las que fueron incubadas durante la noche a 37 °C en los diferentes tampones (tampón fosfato disódico a los pH 5,0; 6,0 y 7,0 y en tampón tris- clorhídrico a pH 8,0 y 9,0). Después de la incubación, las tiras fueron teñidas en azul de Coomassie al 0,1 % en fijador (metanol al

40 % y ácido acético al 10 %) por 30 min y decolorados en metanol - ácido acético - agua (5:1:5).

El ensayo enzimático frente a diferentes sustratos naturales (hemoglobina bovina, albúmina de suero bovino, caseína, IgG, elastina y colágeno tipo II) se realizó según el método de Anson modificado por Barrett en 1970.

En el estudio de inhibición se incluyó pepstatina, 14  $\mu\text{M}$ ; trans-epoxisuccinil-L-leucilamino (4 - guanidino) - butano (E-64), 200 $\mu\text{M}$ ; ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), 10 mM; 1-10 fenantrolina, 5 mM y fluoruro de fenil metil sulfonilo (PMSF), 4 mM por separado, en la mezcla de reacción. Para ello se preincubó, 50  $\mu\text{l}$  del extracto crudo, 50 $\mu\text{l}$  del tampón de ensayo tris-clorhídrico pH 6,0; 50  $\mu\text{l}$  de agua destilada y 10 $\mu\text{l}$  de la solución del inhibidor durante 1 h a 25 ° C, previo al ensayo enzimático. En el ensayo de inhibición en geles de poliacrilamida copolimerizada con gelatina 10  $\mu\text{l}$  del extracto crudo, 10  $\mu\text{l}$  del tampón muestra y 2  $\mu\text{l}$  del inhibidor fueron incubados 1h a 25 °C antes de aplicar la muestra. La electroforesis se realizó según se describió anteriormente. Las tiras fueron incubadas durante la noche en el tampón tris - clorhídrico pH 6,0 con cada uno de los inhibidores mencionados.

### III. RESULTADOS

En los estudios de actividad proteolítica sobre gelatina se obtuvo una banda gelatinolítica a los pH 6,0; 7,0 y 8,0; obteniéndose el máximo de actividad a pH 6,0 (Figura 1). La desaparición de esa actividad fue demostrada sólo después de la adición de PMSF, no sucediendo así para el resto de los inhibidores estudiados, lo que sugiere la presencia de una actividad serino dependiente en el extracto. La presencia de hemoglobina, como indicador de la contaminación con proteínas sanguíneas en el extracto, fue despreciable.

Con el sustrato caseína se obtuvo la actividad específica más alta a diferencia del resto de los sustratos ensayados (tabla). Estos resultados apuntan a favor de la selectividad de la actividad neutra en cuanto a la hidrólisis de sustratos naturales. La hidrólisis de caseína en presencia del extracto crudo fue inhibida por PMSF en un 85 % y con EDTA y 1-10 fenantrolina en un 25 % (Figura 2). Del estudio del perfil de inhibición frente a este sustrato se derivó también la presencia de una actividad fundamentalmente del tipo serino dependiente.

### IV. DISCUSIÓN

Nos resulta muy interesante encontrar una actividad endopeptidasa con estas características en el intestino a pesar de que la actividad digestiva en garrapata es intracelular a pH muy ácido, a diferencia de los insectos. Sin embargo su especificidad de

sustrato nos habla a favor de diferencias marcadas con las actividades semejantes a tripsina y quimotripsina que se presentan en el intestino de la mayoría de los insectos, pues las actividades específicas frente a hemoglobina y seroalbúmina bovinas, proteínas principales en la digestión de sangre intraluminal de todo artrópodo hematófago, fueron significativamente menores. Las hembras adultas en estadios previos al engorde rápido presentan también esta actividad caseinolítica a niveles considerablemente mayores que la adulta repleta a pesar de que las ingestas de sangre de ambos estadios son significativamente diferentes (resultados no mostrados).

Una de las actividades reportadas por nuestro grupo en intestino de hembras adultas de *Boophilus microplus* mediante el estudio de hidrólisis de peptidos sintéticos, corresponde a una actividad endopeptidasa neutra semejante a catepsina G (Mendiola y otros, 1996). Si ambas actividades se encuentran sobre una misma molécula; lo cual solo podrá confirmarse a través del aislamiento y purificación de enzimas; podríamos esperar que en el epitelio intestinal estas actividades neutras también estén asociadas a gránulos como sucede en los leucocitos de la médula ósea de vertebrados.

Más recientemente Kanost & Jiang (1997) aislaron clones de cDNA de dos serino proteinasas de una librería de cDNA de hemocitos de *Manduca sexta* con secuencias similares a las enzimas de los granulocitos de vertebrados. Sin embargo, su función aún no se ha definido.

Seis tipos de células han sido descritas en el intestino de garrapatas: células de reemplazo, las células digestivas, las células secretoras, las células indiferenciadas, las células endocrinas y las células vitelogénicas. Todas ellas con excepción de las células vitelogénicas han sido distinguidas solamente por su morfología (Grandjean & Aeschlimann, 1973). Así ningún producto de las células secretoras ha sido identificado; ni se conoce el papel del producto secretado en algún proceso fisiológico (Coons y otros, 1982).

Trabajos futuros son necesarios para profundizar en el conocimiento del papel que juegan estas endopeptidasas neutras en la fisiología de la garrapata.

## V. RESUMEN

En este trabajo se realizó la identificación de una actividad neutra en intestino de *Boophilus microplus* por electroforesis en geles de poliacrilamida copolimerizada con gelatina, obteniéndose el máximo de actividad a pH 6,0. Con el sustrato caseína, se obtuvo la mayor actividad específica a ese pH. La desaparición de esta actividad fue demostrada para ambos sustratos después de la adición de PMSF en las mezclas de reacción. Resulta muy interesante encontrar una actividad endopeptidasa con estas características en el intestino a pesar de que la actividad digestiva en garrapatas es intracelular a pH muy ácido, a diferencia de los insectos.

## VI. SUMMARY

The identification of a neutral activity in the intestine of adult female *Boophilus microplus* was accomplished in this work. The hydrolysis of gelatin was demonstrated by its copolymerization in acrylamide gels and running the midgut samples. The maximum activity was obtained at pH 6.0. The highest specific activity was obtained using casein substrate at the same pH. After adding PMSF in the reaction mixture, the inhibition of this activity was demonstrated. It is interesting to find neutral endopeptidase activity in the intestine in spite of the acid, intracellular digestive activity in ticks.

## VII. REFERENCES

- Agyei, A.D.; Runham, N.W. & Blackstock, N. (1992). Histochemical changes in the midgut of two ixodid tick species . *Boophilus microplus* and *Rhiphicephalus appendiculatus* during digestion of the blood meal. *Experimental Applied Acarology*. 11:187-212.
- Barret, A.J. (1970). Cathepsin D. Purification of isoenzymes from human and chicken liver. *Biochemical Journal* 117:601-607.
- Boctor, F.N. & Araman, S.F. (1971). Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Total free amino acids in gut, hemolymph, and coxal fluids of *Argas (Persicargas ) persicus* (Oken) and *A.(P.) arboreus* Kaiser, Hoogstraal and Kohls ( Argasidae). *Journal of Medical Entomology*. 8:525-528.
- Bogin, E. & Hadani, A. (1973). Digestive enzymes in "hard ticks" (Ixodoidea), Ixodidae). I. Proteolytic enzyme activity in the gut of *Hyalomma excavatum* female ticks. *Zeitschrift fur Parasitenkunde*. 41:139-146.
- Coons, L., Tarnowski, B. & Ourth, D. (1982). *Rhiphicephalus sanguineus*: localisation of vitellogenin synthesis by immunological methods and electron microscopy. *Experimental Parasitology*. 54:331-339.
- Coons, L.B., Rosell-Davies, E. & Tarnowski, B.I. (1986). Bloodmeal digestion in ticks. In "Morphology, Phisiology and Behavioral Biology of ticks" (J. R. Sauer and J. A. Hair, Eds.), pp 248-271. Ellis Horwood, Chichester.
- Grandjean, O. & Aeschlimann, A. (1973). Contribution to the study of digestion in ticks: Histology and fine structure of the migut epithelium of *Ornithodoros moubata* Murray (Ixodoidea, Argasidae). *Acta Tropica* 30:193-212.

- Grandjean, O. (1984). Blood digestion in *Ornithodoros moubata* females, I. Biochemical changes in the midgut lumen and ultrastructure of the midgut cell, related to intracellular digestion. *Acarologia*. 25:147-165.
- Hamdy, B.H. (1977). Biochemical and physiological studies of certain ticks (Ixodoidea). Excretion in ticks. *Journal of Medical Entomology*. 14: 15-18.
- Heussen, C. & Dowdle, E.B. (1980). Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Analytical Biochemistry* 102: 196-202.
- Kanost, M.R. & Jiang H. (1997). Serpins from an insect, *Manduca sexta*. *Chemistry and Biology of serpins*. (Church *et al*, Eds.) pp 248-271. Plenum Press, New York.
- Kocan, K.M. (1995). Targeting ticks for control of selected hemoparasitic diseases of cattle. *Veterinary Parasitology*. 57: 121-151.
- Mendiola, J., Alonso, M., Marquetti, M. & Finlay, C. (1996). *Boophilus microplus*: Multiple Proteolytic Activities in the Midgut. *Experimental Parasitology* 82: 27-33.
- Raikhel, A. (1983). The intestine. In: "An Atlas of Ixodid Tick Ultrastructure".(Yu. S. Balashov, Ed.) pp 59-107. Entomological Society of America Special Publication.
- Rosenfeld, A. & Vanderberg, J.P. (1998). Identification of electrophoretically separated proteasas from midgut and hemolymph of adult *Anopheles stephensi* mosquitoes. *Journal Parasitology*. 84: 361-365.
- Tarnowski, B. (1983). Blood meal digestion and vitellogenesis in the tick *Dermacentor variabilis* Say. Ph. D. Dissertation, Memphis State University.
- Vundla, W. R. Brossard, M., Pearson, D..J. & Labongo, V.L. (1992). Characterization of aspartic proteinases from the gut of the tick, *Rhiphicephalus appendiculatus*. *Insect Biochemistry and Biology*. 22: 405-410.



Tabla. Actividad proteolítica neutra de extractos crudos de *Boophilus microplus* sobre sustratos específicos.

	ACTIVIDAD ESPECÍFICA *
IgG bovina	0.09
Albúmina	0.05
Caseína	1.53
Hemoglobina	0.15
Colágeno tipo II	0.04

\*Micromoles of L- Tirosina / min/ mg



**ESTUDIOS DE EXHIBICION DIFERENCIAL DE RESISTENCIA A  
ORGANOSFOSFORADOSTE EN CELULAS DE *Boophilus microplus*  
CULTIVADAS.**

**DIFFERENTIAL DISPLAY STUDIES OF ORGANOPHOSPHATE RESISTANCE  
IN CULTURED *Boophilus microplus* CELLS.**

RAQUEL COSSIO-BAYUGAR, GALE G. WAGNER, PATRICIA HOLMAN.

*Texas A&M University. Texas Medical Center, College Station, Texas 77843-4467.*

*Email: rcoccio-bayugar@cvm.tamu.edu*

The cattle tick, *Boophilus microplus* (Canestrini), is responsible for transmission of the causative agents of anaplasmosis and babesiosis (cattle tick fever). It was eradicated from the United States with a combined state-federal program that began in 1907 and was completed in 1960. The organophosphorus (OP) acaricide Coumaphos® has been used as the principal control agent in the quarantine program to avoid reintroduction of the pest outside of the permanent barrier zone. Reports of significant levels of resistance to Coumaphos® and other OP acaricides among populations of *B. microplus* in certain areas of Mexico indicate that these pesticides might eventually lead to failure to contain the pest.

Differential gene expression is being evaluated in Coumaphos® resistant cell line from *Boophilus microplus* VII-SCC continuous cell cultures compared to untreated controls. The resistant cell line was generated by incremental exposure of Coumaphos®.

The initial LD50 of the *B. microplus* cells was 27  $\mu\text{M}$  of Coumaphos®. The cells were exposed to 27  $\mu\text{M}$  of Coumaphos® three times. At this time the LD50 value was 34  $\mu\text{M}$ . The cells were then exposed three times to 34  $\mu\text{M}$  Coumaphos® and the resulting LD50 was 41.4  $\mu\text{M}$ . Differential display of mRNAs from the OP resistant tick cells (LD50 41.4  $\mu\text{M}$ ) versus normal control cells was performed using 24 combination of primers. The products were separated electrophoretically in a 6% denaturing polyacrylamide gel. Nineteen differentially expressed cDNA bands were reamplified, cloned and sequenced. The sequences were submitted to Blast searches for gene identification. Comparing the resistant and susceptible cell populations may elucidate cellular mechanisms and identify genes that may contribute to acaricide resistance in *B. microplus* ticks.



**EXPRESION DIFERENCIAL DE ISO ENZIMAS DE ESTERASAS COMO UN MECANISMO DE RESISTENCIA A LOS IXODICIDAS EN LA GARRAPATA DEL GANADO *Boophilus microplus*.**

**DIFFERENTIAL EXPRESSION OF ESTERASE ISOZYMES AS A MECHANISM OF RESISTANCE TO IXODICIDES IN THE CATTLE TICK *Boophilus microplus*.**

RODRIGO ROSARIO-CRUZ \*, ZEFERINO GARCÍA VÁZQUEZ \*, MA. DEL REFUGIO TELLEZ-ALANIS\*, JOHN E. GEORGE\*\*

\* *Centro Nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria. INIFAP-SAGAR. Km. 11.5 Carretera Federal Cuernavaca Cuautla, Jiutepec, Morelos, Mexico. 62550.*

\*\* *USDA, ARS, Knipling Bushland US Livestock Insect Research Laboratory Tick Research Unit Kerrville, TX. USA.*

I.	Introduction.....	97
	Resistance to ixodocides as a preadaptive condition.....	98
	Enzyme systems and detoxication mechanisms.....	98
	Differential overexpression of esterases as a mechanism of resistance in <i>B. microplus</i> .....	99
II.	Conclusions.....	99
III.	References.....	100

**I. INTRODUCTION**

Resistance of the arthropods to xenobiotics is an important issue since many insects are agricultural pests or vectors of parasitic diseases. The cattle tick *Boophilus microplus* is widely distributed in tropical areas in Mexico and is the major transmitter of diseases such as babesiosis. The use of organophosphorous compounds during the National tick eradication program as an attempt to control the cattle tick resulted in a widely distributed problem of tick resistance to OP ixodocides. Studies of OP resistance mechanisms in *Boophilus microplus* have revealed that increased detoxification (Bull & Ahrens 1988), increased esterase activity (Rosario-Cruz, et al. 1997) and insensitive acetylcholinesterase (AChE) (Wright and Ahrens 1988) may all play a role. The former mechanism can be result of two possible mechanisms, gene amplification or gene regulation in both cases the result is the overproduction of the message and therefore of the esterases. The latter mechanism can be produced by structural modifications of the enzymes induced by point mutations. One of the most studied subjects in the understanding of mechanisms as an underlying

cause for the massive production of esterases by some resistant insects that detoxify insecticides is gene amplification (Mouches, et al 1986; Mouches et al, 1987).

#### **Resistance to ixodocides as a preadaptive condition.**

The presence of these detoxification systems, has been an evolutionary adaptation to survive the effect of plant toxicants. And the role of such processes in protecting insects is exemplified by the fact that mixed-function oxidases are higher in polyphagous lepidopterans, which can encounter a broad spectrum of plant derived toxicants, than in mono or oligphagous species (Ronis & Hodson, 1989). Similarly, dietary manipulation of *Spodoptera frugiperda* can lead to marked changes in glutathion-S-transferase activity with concomitant effects on tolerance to OPs (Clark, 1989), apparently involving a quantitative rather than a qualitative change in the enzyme. Acarine and homopteran species that feed more selectively seem predisposed to acquire increased hydrolase activity, especially when the toxicant is an OP. Hydrolases have been recognized as one of the major detoxifying enzymes involved in insect metabolism of xenobiotics. However, in *Myzus persicae*, only one of several esterases has been found to be responsible for marked increase in total esterase activity (Beranek, 1984). The mechanism of detoxification has been demonstrated to be by hydrolysis (Devonshire, 1977) and sequestration when its catalytic center is carbamylated or phosphorylated (Devonshire & Mores, 1982; Cuany et. al., 1993).

#### **Enzyme systems and detoxication mechanisms.**

The synergic effect of three major classes of enzymes may contribute to the increased detoxification process. The cytochrome P450-mediated mixed-function oxidases introduce oxygen, often as hydroxyl groups, into aromatic rings (Ronis & Hodson, 1989). Glutathion-S-transferases catalyze the conjugation of molecules that have an electrophilic center, with the thiol group of the tripeptide glutathion (Clark, 1989) and the group of hydrolases which cleave esters and amides with a consequent increase in polarity as their components are released (Georgiouh & Saito 1983).

Organophosphorus compounds phosphorylate a number of other enzymes, including acid phosphatase, aliesterases, lipases, trypsin, chymotrypsin, succinoxidase, ascorbic acid oxidase, dehydrogenase, sulfhydryl enzymes and others. The reaction with these enzymes is generally slower than that with cholinesterases. As far as is known none of these other reactions have any clinical consequences. The potentiation of certain organic phosphorus compounds by others depends at least in part on inhibition of aliesterases. Another enzyme inhibited by parathion is choline acetyl transferase (ChAc) responsible for the synthesis of acetylcholine.

The relation of organophosphorus compound to microsomal enzymes has been most thoroughly explored in connection with parathion. It has been shown that the conversion of parathion to paraoxon and detoxication to O,O,-diethylthiophosphate depends on these enzymes (Neal, 1967a; Nakatsugawa and Dahm, 1967). The net effect of the microsomal enzymes on the toxicity of organic phosphorus compounds represents a balance of at least two oxidative reactions.

Different esterases are present in all higher eukaryotes, several of which are classified as nonspecific esterases, on the basis of their broad substrate specificities. As mentioned above these carboxylesterases have been subdivided into A,B, and C types on the basis of differential pattern of inhibition by organophosphorus compounds. The B group of carboxylesterases includes the cholinesterases, which are subdivided into acetyl and butyryl cholinesterases on the bases of their preferred substrates.

#### **Differential overexpression of esterases as a mechanism of resistance in *B. microplus*.**

Esterases overexpression was analyzed by two-dimensional electroforesis and three regions with esterase activity it was identified three active esterase isozyms detected in all the tick strains and had an approximate molecular weight of 67 KDa. However, differences in level /intensity of activity were found only in the esterase with an approximate isoelectric point of 4.6. Further studies identified this esterase as EstA-2 by one dimension isoelectrofocussing. The activity of the other two isoforms with higher isoelectric point was not significantly different when they were analyzed by 2D-electroforesis.

However one dimensional isoelectrofocussing showed the presence of at least nine different isoforms differentially expressed. The increased esterase activity by EstA-2 isozyne was consistently shown by tick strains which were resistant to ixodicides, but not by the susceptible strains. This isozyne is of interest since its presence and activity in a detection method can be used as a molecular marker of exposure to ixodicides. It is probably that this sort of polymorphism in induction allow the *B. microplus* ticks to scan the esterase gene repertoire for the appropriate response to chemical poisoning, and at the same time the selection pressure maintain the esterase diversity.

The overexpression (Rosario-Cruz, et al. 1999a) and the differential expression of esterases (Rosario-Cruz, et al 1999b) in *B. microplus* is a fact but, there are still some questions remaining. What is the mechanism driving the differential expression of esterases? Is it induced by the ixodicide? It is selected by the ixodicide? In other words, is the resistance phenomena a matter of polyphenism or polymorphism?, It is possible that the resistance phenomena could be the result of the synergic action not only of esterases but other enzymatic systems , such as, Glutathion-S-transferases.

## II. CONCLUSIONS

*Boophilus microplus* show a marked overexpression of esterases and also the presence of esterase isoforms showing a differential expression. This is probably the result of the exposure to different ixodicides in field conditions. The resistance to pesticides could be the result of two components, one related with polymorfism and selection of preexisting genes and the other by polyphenism or induccion of enzyme systems promoted by the alterations of environmental conditions (presence of the pesticide). The phenomena of induction of new isozyms has been already demonstrated by the use of allelochemical

compounds like xanthotoxin which induce new Glutathion-s-transferase isozymes in the fall Armyworm *Spodoptera frugiperda* (Yu, 1999). It is also probably that similar mechanisms are present in *B. microplus*, since there is at least one isoform EstA-2 which is overproduced no matter the type of ixodicide the ticks are exposed.

### III. REFERENCES

- Bull D L, Ahrens E H. (1988). Metabolism of Coumaphos in susceptible and multiresistant strains of *Boophilus microplus* (Acari:ixodidae). *Journal of Medical Entomology* 25, 94-98.
- Cuany A, Handani J, Berge J, Fournier D, Raymond M, Georghiou G P, Pasteur N. (1993). Action of esterase B1 on chlorpyrifos in organophosphate resistant *Culex* mosquitoes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 45, 1-6.
- De Jersey J, Nolan J, Davey P A, Riddles P W. (1985). Separation and characterization of the pyrethroid-hydrolyzing esterases of the cattle tick *Boophilus microplus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 23, 349-357.
- Devonshire A L, Moores G D. (1982). A carboxylesterase with a broad substrate specificity causes organophosphorous, carbamate and pyrethroid resistance. in peach potato aphids (*Myzus persicae*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*. 18, 235-246
- Devonshire A L. (1977). The properties of a carboxylesterase from the peach-potatoe aphid *Mizus persicae* (Sulz.), and its role in conferring insecticide resistance. *Biochemical Journal* 167, 675-683.
- Lacks S A, Springhorn S S. (1980). Renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium Dodecyl sulphate. *Journal of Biological Chemistry* 265, 7467-7473.
- Lacks S A, Springhorn S S, Rosenthal A L. (1979). Effect of the composition of sodium dodecyl sulphate preparations on the renaturation of enzymes after polyacrylamide gel electrophoresis. *Analytical Biochemistry* 100, 357-363.
- Laemmli U K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lee R M, Batham P. (1966). The activity and organophosphate inhibition of cholinesterases from susceptible and resistant ticks (Acari). *Entomologia Experimentalis et Applicata* 9, 385-392.



- Mouches C, Pasteur N, Berge J B, Hyrien O, Raymond M, De Saint Vincent B R, De Silvestri M, Georghiu G P. (1986). Amplification of an esterase gene is responsible for insecticide resistance in a California *Culex* mosquitoes. *Science* 233, 778-780.
- Mouches C, Magnin M, Berge J B, De Silvestri M, Beyssat V, Pasteur N, Georghiou G P. (1987). Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 84, 2113-2116.
- Nakatsugawa T, Dahm P A. (1967). Microsomal metabolism of parathion. *Biochemical Pharmacology*. 16, 25-38.
- Neal R A. (1967a). Studies on the metabolism of diethyl 4-nitrophenyl phosphorothionato in vitro. *Biochemistry Journal*. 103, 183-191.
- Rosario C R, Miranda M E, García V Z, Ortiz E M. (1997). Detection of esterase activity in susceptible and resistant *Boophilus microplus* tick strains. *Bulletin of Entomological Research* 87, 197-202.
- Rosario-Cruz R, Waghela D S, García-Vázquez Z, Wagner G G, George E J, Holman J P, Tellez-Alanis M R, Miranda E. 1999a. Increased esterase activity as a mechanism of resistance to Organophosphorous acaricides in the cattle tick *Boophilus microplus*. (In preparation).
- Rosario-Cruz R, Waghela D S, Garcia-Vazquez, Z, Tellez-Alanis M R, Holman J P, Miranda E, George E J, Ortiz-estrada M, Wagner G G. 1999b. Esterase Isozyme polymorphism in *Boophilus microplus* cattle tick strains resistant to acaricides. (In preparation).
- Wright F C, & Ahrens E H. (1988). Cholinesterase insensitivity: a mechanism of resistance in Mexican Strains of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) against coumaphos. *Journal of Medical Entomology* 25, 234-239.
- Yu S J. (1999). Induction of New Glutathion-S-transferase isozymes by allelochemicals in the fall Armyworm. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 63, 163-171.



**ANALISIS DE LA SITUACION ACTUAL MEDIANTE EL MONITOREO DE SUSCEPTIBILIDAD A IXODICIDAS EN *Boophilus microplus* DE 1993 A 1999 Y MEDIDAS PREVENTIVAS PARA RETARDAR LA RESISTENCIA AL AMITRAZ EN MEXICO.**

**ANALYSIS OF THE CURRENT SITUATION BY SURVEYED THE SUSCEPTIBILITY OF *Boophilus microplus* FROM 1993-1999 AND THE PREVENTIVE ACTIONS TO DELAY THE AMITRAZ RESISTANCE IN MEXICO.**

M. SANTAMARÍA VARGAS, N. SOBERANES CÉSPEDES, A. ORTIZ NAJERA, H. PRAGOSO SÁNCHEZ, J. OSORIO MIRANDA, F. MARTÍNEZ IBAÑEZ, R. FRANCO BELLO, G. DELABRA VACA, R. QUEZADA DELGADO, I. GILES HERNÁNDEZ Y M. ORTIZ ESTRADA.

*Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. Carretera Cuernavaca- Cautla km 11.5 Jiutepec, Morelos, México. 62550.*

I. Introducción.....	103
II. El problema de la resistencia en México.....	104
III. Situación actual de la resistencia.....	105
IV. Resistencia al amitraz.....	107
IV. 1. Pruebas con larvas.....	107
V. Estudios de resistencia al amitraz.....	108
V. 1. Pruebas con paquete de larvas.....	108
V.2. Pruebas de inmersión con hembras adultas.....	108
V.3. Evaluación de productos en campo.....	109
V.4. Diagnostico en larvas para la detección de resistencia al amitraz.....	109
VI. Referencias.....	110
Cuadro 1.....	113
Cuadros 2, 3 .....	114
Cuadros 4, 5 .....	115
Cuadros 6, 7 .....	116
Cuadros 8, 9 y 10 .....	117

## I. INTRODUCCION

La perdida de eficiencia de los ixodicidas organofosforados a partir de 1981 en México, motivo que el gobierno federal permitiera el uso y comercialización de nuevas

formulas como piretroides y amidinas (Ortiz, 1991). Una situación similar se presentó en varios países de Centro y Sudamérica donde se reportó resistencia de *Boophilus microplus* a ixodicidas organofosforados en Costa Rica y Argentina (Solano, 1979; Pérez y Alvarez, 1995; Guglielmo y Signorini, 1995), Brasil en 1963, Colombia y Venezuela en 1967 y Sudáfrica en 1979 (Solomon 1983; Kemp *et al.*, 1998). En Australia emergieron 9 cepas resistentes a organofosforados y carbamatos entre los años 1963 y 1979, cada una con características toxicológicas y bioquímicas diferentes (Nolan, 1979, 1986).

En México al igual que en estos países, se comprobó la eficacia de los piretroides y del amitraz en base a una serie de pruebas realizadas en campo, establo y en laboratorio en las fases de adultas mediante pruebas de inmersión de hembras repletas y en larvas de *B. microplus* por medio del diagnóstico de resistencia (dosis discriminantes) y probits para controlar garrapatas tipo “Tuxpan” resistentes a organofosforados la cual presentaba una distribución amplia en la región este y noreste de México en la zona conocida como las Huastecas, por lo tanto confirmándose al mismo tiempo la ineficacia real de los productos organofosforados (Ortiz *et al.*, 1995).

## II. EL PROBLEMA DE LA RESISTENCIA EN MEXICO

En México a partir del monitoreo realizado en la década de los 80's en investigaciones realizadas en campo y en laboratorio mediante la técnica de dosis discriminantes de organofosforados y organoclorados, se obtuvieron las cepas “Tuxpan” resistente a organofosforados y “Tempoal” resistente a organofosforados y organoclorados (Aguirre *et al.*, 1991), las cuales fueron caracterizadas y purificadas y que sirvieron como cepas de referencia para la comprobación mediante evaluaciones biológicas de la efectividad de los diferentes productos piretroides que empezaron a solicitar su registro para su comercialización, normalizándose de esta manera la constatación biológica de los ixodicidas en México, asegurando la eficacia de los piretroides contra estas cepas que empezaban a dispersarse en las zonas ganaderas del país.

Para 1993 después de 8 años de uso continuo y sistemático con piretroides, se detectaron los primeros casos de resistencia a organofosforados y piretroides en algunos estados de México, mediante la técnica de dosis discriminantes (Stone & Haydock, 1962; Santamaria, 1992), obteniéndose la cepa “Mora” doble resistente (moderada a organofosforados y alta a piretroides) del estado de Tabasco en 1993, “Aldama” doble resistente (baja a organofosforados y moderada a piretroides con una alta resistencia a flumetrina) del estado de Tamaulipas en 1994 y “Coatzacoalcos”. doble resistente (mediana a organofosforados y moderada a piretroides con una mayor resistencia a cipermetrina) del estado de Veracruz en 1995 (Ortiz *et al.*, 1995). Situaciones similares de resistencia a organofosforados y piretroides se comprobaron durante los años de 1994 a 1995 en Venezuela, Colombia y Uruguay (Coronado *et al.*, 1994; Benavides, 1995; Cardozo, 1995; Kemp, *et al.*, 1998).

A partir de 1993 en México, un complejo de cepas de *Boophilus microplus* doble

resistentes a organofosforados y piretroides empezaron a emerger por lo que durante los años de 1995 y 1996 se realizaron una serie de trabajos que demostraron el incremento en el número de estados con reportes positivos a resistencia (Ortiz *et al.*, 1995; Fragoso *et al.*, 1996). Estos estudios continuaron y para el año de 1997 se analizaron muestras de garrapatas de 15 estados con una frecuencia de casos de 75, 36, 52 y 19 doble resistentes para Veracruz, San Luis Potosí, Tamaulipas y Tabasco, incorporándose para ese año los estados de Guerrero, Puebla y Sinaloa, con 209 casos doble resistentes totales (43.27%) y 124 susceptibles (25.67%) de un total de 483 análisis; en 1998 cuatro estados más se incluyeron al muestreo anterior que son Hidalgo, Michoacán, Nayarit y Querétaro, dando un total de 19 entidades con 261 casos doble resistentes totales (37.23%) y 255 susceptibles (36.37%) de un total de 701 análisis (cuadro 1). Por último hasta septiembre de 1999, la cifra de doble resistentes se incremento a 277 casos (37.53%) y 262 casos susceptibles (35.50 %) de 738 análisis (cuadro 2). Realizando un análisis del porcentaje acumulado de los años de 1995 a 1999 de los casos doble resistentes a organofosforados-piretroides y susceptibles, se observa que la doble resistencia se ha mantenido en un porcentaje de alrededor del 40 % y la susceptibilidad se incremento de un 16.9 a 20.6 % (cuadro 3). Lo anterior podría estar relacionado con el cambio generalizado que se ha dado de productos piretroides al amitraz, que implica un cambio en el sitio blanco de la garrapata, que ha provocado una modificación en la respuesta de resistencia de esta cepa en campo hacia los productos en desuso, dando oportunidad en estas poblaciones de disminuir la frecuencia alelica de resistencia, aunado a la recombinación con poblaciones susceptibles. Las consideraciones anteriores fueron hechas tomando en cuenta solo los casos de los estados de la región del Golfo de México, donde las condiciones ecológicas y de manejo son óptimas para el desarrollo de la garrapata *B. microplus*.

### III. SITUACION ACTUAL DE LA RESISTENCIA

Hasta mediados de 1999 se tenían monitoreados 21 estados de México de los cuales 19 han sido analizados y a 15 de estos se les detecto el mayor número de casos de doble resistencia con 98, 57, 36, 21 y 19 análisis para los estados de Veracruz, Tamaulipas, San Luis Potosí, Tabasco y Chiapas respectivamente, sin embargo en Veracruz, Tamaulipas, Tabasco y Chiapas, también se han detectado muestras susceptibles a ixodicidas de la familia de los organofosforados y piretroides, lo que demuestra que esta distribución de la resistencia se debe tomar con las debidas reservas ya que no se presenta de la misma manera con respecto a los tres tipos de resistencia (piretroides, organofosforados y piretroides-organofosforados) y no obstante en estados donde desde hace dos décadas se han venido utilizando productos organofosforados y piretroides aún se pueden controlar las poblaciones de garrapatas con cualquiera de estas familias químicas, en el mapa 1 se muestra la distribución geográfica de los tipos de resistencia y su porcentaje de frecuencia en los principales estados ganaderos de México.

Desde 1981 se han venido realizando trabajos que involucran la caracterización toxicologica en laboratorio de cepas de garrapatas *B. microplus* colectadas en campo, de las que la cepa "Tuxpan" fué el primer caso de resistencia a organofosforados en México

(Aguirre *et al.*,1983), posteriormente en 1985 se presentó la multiresistencia a organoclorados y organofosforados en una cepa llamada "Tempoal" (Aguirre, 1986). Para 1993 otra doble resistencia fue caracterizada pero hacia organofosforados y piretroides conocida como "Mora".

Los resultados de esta caracterización obtenida mediante la prueba de paquete de larvas se observa en los cuadros 4 y 6 para las cepas "Tuxpan" y "Mora" respectivamente. Los factores de resistencia obtenidos con la cepa "Tuxpan" en 1984 (cuadro 4), después de nueve generaciones de presión de selección para eliminar el mayor número de individuos heterocigotos fueron de 4, 10 y 11 para el coumafós, clorfenvinfos y diazinon. Para 1998 la misma cepa después de 15 años de una presión anual para mantener su alta frecuencia alelica de resistencia, fue analizada por paquete de larvas y los resultados obtenidos fueron de 3.4, 5.2 y 14.6 muy similares a lo observado en 1984. Para 1999 fueron comparados los datos de la cepa mantenida en el CENAPA con los de la misma cepa de *Boophilus microplus* "Tuxpan" donada hace aproximadamente 10 años a Cattle Fever Tick Research Laboratory en Mission, Texas en Estados Unidos, la cual desde esa fecha no ha tenido presión de selección con pesticidas, encontrándose valores similares en el caso del coumafós con 3.3, sin embargo los factores de 1.43 y 7.5 para clorfenvinfos y diazinon en la cepa de Texas, son menores a los calculados en la cepa "Tuxpan" de CENAPA. Esto demuestra que cuando no existe presión de selección con uno de los productos involucrados en ese tipo de resistencia como se observa en la misma cepa mantenida en Misión, Texas se puede obtener una regresión de la resistencia hacia estos productos, lo cual da la posibilidad de plantear estrategias de alternancia de ixodícidas para manejar y retardar la resistencia. Por otro lado, la conveniencia de mantener estas cepas en laboratorio bajo presión de selección es con la finalidad de que no pierdan sus características genéticas de resistencia y que al realizar los ensayos de evaluación biológica de ixodícidas con nuevas moléculas que solicitan su registro en México, los resultados que se obtengan sean confiables y repetibles.

Los factores de resistencia obtenidos para la cepa *B. microplus* "Aldama" resistente a organofosforados y piretroides (Cuadro 5) muestran poca variación con respecto a los organofosforados coumafós, clorfenvinfos y diazinon con 2.9, 3.5 y 2.9 respectivamente en 1994 y 2.4, 1.5 y 2.5 para cada caso en 1999. En el caso de los piretroides disminuyeron estos factores para deltametrina y cipermetrina y en flumetrina se incrementó de 65.9 a 67.5 de 1994 a 1999, no obstante, que no se realizó presión química durante los 5 años.

Los factores de resistencia calculados para la cepa "Mora" en el año de 1993 cuando se caracterizó por primera vez (cuadro 6), comparados con los que se tienen actualmente se han incrementado en el caso de los organofosforados de 5.05 a 9.2, de 0.0 a 8.4 y de 8.6 a 11.6 en coumafós, clorfenvinfos y diazinon respectivamente, mientras que los factores obtenidos con los piretroides mediante una dilución de la resistencia con una cruce con la cepa "Susceptible" fueron de 352.9, 104 y 118.75 para flumetrina, deltametrina y cipermetrina respectivamente (Ortiz *et al.*, 1995).

Esta comparación de la respuesta toxicológica de las cepas después de 6 años de mantenimiento en el CENAPA, permite asegurar un alto grado de los factores de resistencia, al presionar químicamente en tiempos determinados. Lo anterior también permite una adecuada constatación biológica de todos los productos ixodicidas convencionales, las alternativas como el fipronil (Soberanes *et al.*, 1999), vacuna contra la garrapata e inhibidores del crecimiento de los insectos que solicitan su registro en el país mediante la utilización de estas cepas cultivadas y mantenidas en laboratorio a través de presión de selección con el ixodicida correspondiente a la cepa.

#### IV. RESISTENCIA AL AMITRAZ

El problema que surgió de la doble resistencia a organofosforados y piretroides a partir de 1993 a la fecha, hace necesario conocer la situación de susceptibilidad de la garrapata *B. microplus* con respecto al amitraz, en regiones tales como Tabasco y Tamaulipas donde se presento por primera vez la doble resistencia (organofosforados-piretroides) en forma tan explosiva y en un grado de homocigosis tan elevado hacia estos compuestos.

Dada la importancia que en estos momentos tiene el amitraz para controlar cepas tipo "Mora" resistentes a organofosforados y piretroides, es necesario realizar acciones preventivas que nos permitan retardar y controlar la resistencia que podría generarse al amitraz, para poder afrontarla en su momento. En México, se ha iniciado un proyecto de evaluación de productos en campo y estrategias para el manejo de amitraz a nivel de laboratorio, establo y campo.

##### IV. 1. Pruebas con larvas

En laboratorio los resultados a nivel larval mediante la técnica de dosis discriminantes (Santamaría, 1992) con garrapatas *Boophilus microplus* colectadas en julio de este año en el rancho "La Mora" en Emiliano Zapata, Tabasco, después de más de 5 años de uso ininterrumpido y sistemático con amitraz, comparados con los resultados obtenidos en mayo de 1993, se muestran en el cuadro 7, donde para el caso de los organofosforados no existe variación en el porcentaje de mortalidad para coumafos con 17.33 % en 1993 y 16.85 % para 1999, en el caso del diazinon hay un incremento de más del doble con 5.74% y 14.2 % para 1993 y 1999 respectivamente, sin embargo, el cambio más importante se presento con el clorfenvinfos que de una mortalidad obtenida de 81.01 % en 1993, disminuyo a 52.88 % en 1999, esta situación podría explicarse debido a que en ese rancho se realiza un control de la mosca del cuerno *Haematobia irritans* con clorfenvinfos durante un periodo de 2 a 3 meses que son los de mayor infestación todos los años. En el caso de los piretroides los cuales en 1993 presentaban un 0.0 % de mortalidad, después de 6 años de no utilizarse, se observa una recuperación de la efectividad al cambiar de un 0.0 % de mortalidad en 1993 a un rango que fluctúa entre un 40-70 % de mortalidad actualmente. Esto podría deberse al cambio de molécula que tiene un sitio de acción en el caso de los piretroides diferente al amitraz, dando oportunidad a la población de campo de recombinación de la fracción alelica y al no existir presión con los piretroides los alelos resistentes se van combinando con los heterocigotos, dando como consecuencia una





disminución en la resistencia que se refleja en los resultados anteriormente mencionados.

## V. ESTUDIOS DE RESISTENCIA AL AMITRAZ

La resistencia al amitraz es un problema que se tendrá que enfrentar en algunos años en México, por tal motivo es necesario realizar acciones preventivas que permitan tener soluciones disponibles para solventar este problema, por lo que como se ha mencionado además del proyecto de evaluación de productos y estrategias para el manejo de la resistencia al amitraz el CENAPA cuenta con una cepa brasileña resistente al amitraz llamada "Santa Luiza". Con esta cepa se inició una serie de pruebas a nivel de larva, ninfa y adulto para conocer ampliamente su comportamiento y comprobar si efectivamente presenta diferencias en respuesta hacia los productos utilizados en México de la familia de los organofosforados, piretroides y principalmente al amitraz.

### V. 1. Pruebas con paquete de larvas

Los trabajos realizados en el CENAPA mediante la técnica de paquete de larvas (Stone & Haydock, 1962) con *B. microplus* "Santa Luiza" ha permitido determinar los factores de resistencia a los principales productos utilizados en México de organofosforados y piretroides como son (coumafós, clorfenvinfos, diazinon, y flumetrina, deltametrina, cipermetrina) encontrándose diferencias con la cepa "Mora" doble resistente siendo un poco más altos en general para la cepa mexicana.

Lo que se observa es que la cepa "Santa Luiza" presenta una gran fracción heterocigótica, que se debe a que no se ha realizado en laboratorio un proceso de presión de selección para eliminar la mayor fracción heterocigótica y que sea lo más homogénea posible hacia resistencia. Este proceso se realizara con la finalidad de no tener variaciones en los porcentajes de respuesta al ser utilizada como cepa de referencia cuando se desafie con productos que sean una alternativa para el control de cepas de garrapatas resistentes al amitraz en México (Cuadro 8).

### V.2. Pruebas de inmersión con hembras adultas

En el Cuadro 9 se presentan los porcentajes de control de la cepa mexicana "Mora" resistente a organofosforados y piretroides con los productos formulados más utilizados en México y los porcentajes de control con la cepa brasileña "Santa Luiza" que resulto ser resistente a las familias de organofosforados, piretroides y al amitraz.

Otro aspecto contemplado es la realización de evaluaciones de productos alternativos al amitraz en las principales zonas ganaderas donde se ha venido utilizando de forma ininterrumpida y sistemática este producto para el control de la garrapata, para posteriormente una vez determinada la situación de susceptibilidad ó resistencia que guardan las poblaciones de campo presionadas químicamente con amitraz, realizar la

implementación de estrategias de manejo integral del ectoparasito para ofrecer a los ganaderos un manejo operacional y el uso adecuado de productos alternativos cuando son obligatoriamente necesarios o en su caso la combinación de amitraz con un control de tipo inmunológico.

### **V.3. Evaluación de productos en campo**

Los resultados preliminares de la fase de evaluación de productos realizado durante el mes de julio de 1999 en el rancho "La Mora" donde se detecto por primera vez la resistencia a organofosforados y piretroides en 1993 en el municipio de Emiliano Zapata en el estado de Tabasco dentro del estudio tendiente a conocer el estado de susceptibilidad de la garrapata *B. microplus* al amitraz, se encontró para el organofosforado coumafos una efectividad global de 60.50 % al día 28 postratamiento, con una efectividad máxima alcanzada de 79.41 % para el día 14 y la mínima obtenida de 42.21 % el día 28.

Sobre la respuesta lograda con el amitraz este obtuvo una efectividad global de 90.99 % al día 28 postratamiento, sin embargo, la efectividad parcial obtenida para los días 3 y 21 fue de 100 % (cuadro 10) a pesar de usarse desde hace más de 5 años conserva una efectividad global aceptable.

Estos datos preliminares con respecto a la susceptibilidad de las poblaciones de garrapatas en zonas donde se ha venido utilizando en forma continua el amitraz, este todavía tiene un control adecuado y que además el periodo en que se dejo de usar organofosforados y piretroides ha permitido que las poblaciones de garrapatas cambien sus características de respuesta hacia una regresión a la susceptibilidad, como se observa en el porcentaje de efectividad global obtenido de 60.5 % con el coumafos, dando la posibilidad en pocos años cuando la resistencia se decremente hacia los organofosforados de poder implementar un manejo mediante la rotación de productos organofosforados y el amitraz evitando que las poblaciones expresen resistencia hacia una u otra familia y esto se pueda generalizar a otras zonas con estas características en México

### **V.4. Diagnostico en larvas para la detección de resistencia al amitraz**

Además de las acciones mencionadas anteriormente de evaluación y estrategias para retardar la resistencia al amitraz, el CENAPA en colaboración con personal técnico de USDA- ARS KBUSLIRL en Kerrville, Texas e INIFAP-CENID-PAVET están realizando la estandarizando e implementación de una técnica diagnostica de resistencia al amitraz en larvas de garrapatas que pueda ser utilizada para muestras de campo y que permita detectar el fenómeno antes de que se convierta en un problema de control.

En las diferentes partes del mundo donde se trabaja con garrapatas no existe una técnica confiable y repetible para el diagnóstico de susceptibilidad con el amitraz en larvas (Kunz & Kemp, 1994), sin embargo, en este momento con algunas modificaciones hechas a la prueba de paquete de larvas original (Stone & Haydock, 1962), en corto tiempo se tendrá estandarizada y disponible para ser utilizada como una técnica de diagnostico de rutina para detectar la resistencia al amitraz.

## VI. REFERENCIAS

- Aguirre, E.J. 1987. Detección de brotes de resistencia en las poblaciones de garrapatas durante una campaña de erradicación con especial referencia a las americas. Consulta de expertos sobre la erradicación de garrapatas. Méx. D.F.
- Aguirre, E.J.; Santamaría, V.M. ; Sobrino, A.L.; Ortiz, N.A.; Ortiz, E.M.; Neri, O.S. 1991. Estudios acerca de la genética y mecanismos de resistencia en garrapatas Ixodidae con origen en México. II Seminario Internacional de Parasitología. Garrapatas y enfermedades que transmiten . Oaxtepec, Morelos, México 78-87.
- Aguirre, E.J. .Santamaría, V.M. 1986. Purificación y caracterización toxicológica de garrapatas *B. microplus* resistentes a ixodicidas organofosforados y organoclorados. VII Reunión Anual Asoc. Mex. de Parasitología Veterinaria A.C. Cd. Victoria, Tamps. México.
- Aguirre, E.J.; Aburto, S. 1983. Determinación de concentraciones discriminantes como medio diagnóstico de susceptibilidad en garrapatas *Boophilus microplus*. Reunión Anual de Parasitología Veterinaria. FMVZ. UNAM. México.
- Benavides, O.E. 1995. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los acaricidas en Colombia. Un resumen de la situación actual. III Seminario Internacional de Parasitología Animal . Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria. Acapulco, Gro. Méx. 153-163.
- Cardozo, H. 1995. Situación de resistencia de *Boophilus microplus* en Uruguay. Medidas para controlarla. III Seminario Internacional de Parasitología Animal . Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria. Acapulco, Gro. Méx. 30-38.
- Coronado, A. 1995. Current status of the tropical cattle tick *Boophilus microplus* in Venezuela. III Seminario Internacional de Parasitología Animal . Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria. Acapulco, Gro. Méx. 22-29.
- Coronado, A.; López, A.; Ortega, P. y Sanchez, J. 1994. Detección de resistencia de *Boophilus microplus* a acaricidas organofosforados en Venezuela. XIV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Acapulco, México. Resumen. 511.
- Fragoso, S.H.; Soberanes, C.N.; Ortiz, E.M.; Santamaría, V.M.; Ortiz, N.A. 1995. Epidemiología de la resistencia a ixodicidas piretroides en garrapatas *Boophilus microplus* en la República Mexicana. III Seminario Internacional de Parasitología Animal . Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria. Acapulco, Gro. Méx. 45-57.
- Fragoso, S.H.; Soberanes, C.N.; Ortiz, E.M.; Santamaría, V.M.; Ortiz, N.A. 1996. Epidemiología de la resistencia a ixodicidas piretroides en garrapatas *Boophilus*

*microplus* en la República Mexicana. Memoria de la 5ta. Reunión Anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. 333-342.

- Guglielmone, A. 1995. Situación de la resistencia de poblaciones naturales del *Boophilus microplus* (Acari) y de la *Haematobia irritans* (Diptera) a los pesticidas químicos en la Argentina. III Seminario Internacional de Parasitología Animal. Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria. Acapulco, Gro. Méx. 39-44.
- Kemp, H.D.; Tullner, R.; Gale, R.K.; Nari, A. & Sabatini A.G. 1998. Report to the animal health services, AGAH, FAO, October 1998. CSIRO Tropical Agriculture, Long Pocket Laboratories, Private Bag No. 3, P O, Indooroopilly 4068 QLD Australia.
- Kunz, E.S.; Kemp, H.D. 1994. Insecticides and acaricides: Resistance and environmental impact. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 13 (4), 1249-1286.
- Nolan, J. & Roulston, W.J. 1979. Acaricide resistance as a factor in the management of acari of medical and veterinary importance. In Recent advances in Acarology. Vol. 2 (J.G. Rodriguez. de.) Academic Press, New York, 565.
- Nolan, J. & Schnitzerling, H.J. 1986. Drug resistance in arthropod parasites. In Chemotherapy of parasitic diseases (W.C. Campbell & R.S. Rew. eds.) Plenum Press. New York. , 603-620.
- Nolan, J. 1981. Current developments in resistance to amidine and pyrethroid tickicides in Australia. in Tick biology and control. (G.B. whitehead & J.D. Gibson eds.) Tick Research Unit. Rhodes University Grahamstown. 109-114.
- Nolan, J. 1990. Acaricide resistance in single and multi-host ticks and strategies for control. Parasitologia. 32, 145-153.
- Ortiz, E. M. 1991. Uso de ixodicidas en México. II Seminario Internacional de Parasitología. Garrapatas y enfermedades que transmiten. Oaxtepec, Morelos, México 57-65.
- Ortiz, E.M.; Aguirre, A.F.; Ramirez, F.A.; Santamaria, V.M.; Ortiz, N.A.; Franco, B.R. y Soberanes, C.N. 1996. Resistencia a los ixodicidas en la garrapata del bovino *B. microplus* en la zona sur del estado de Morelos. Memorias Reunión Nacional de Investigación Pecuaria. Morelos, Méx.
- Ortiz, E.M.; Santamaria, V.M.; Ortiz, N.A.; Soberanes, C.N.; Osorio, M.J.; Franco, B.R.; Martinez, I.F.; Quezada, D.R. y Fragoso, S.H. 1995. Caracterización de la resistencia de *B. microplus* a ixodicidas en México. Memorias III Seminario Internacional de Parasitología Animal. "Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia

veterinaria" SAGAR-CANIFARMA-FAO-IICA-INIFAP.

- Peréz, E. y Alvarez, V. 1995. Analysis of potential causes of acaricide resistance in *Boophilus* ticks in en Costa Rica. III Seminario Internacional de Parasitología Animal . Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria. Acapulco, Gro. Méx. 9-21.
- Santamaría, V.M. 1992. Determinación de las dosis discriminantes a tres piretroides sintéticos en la cepa *Boophilus microplus* susceptible Cenapa. II Congreso Nacional de parasitología Veterinaria, Veracruz, México.
- Soberanes, C.N.; Santamaría V.M.; Ortiz, E.M. Ortiz, N.A.; Osorio, M.J.; Martínez, I.F. Franco, B.R.; Delabra, V.G.; Quezada, D.R.; Fragosos, S.H. y Alva, R. 1999. Eficacia del Ectoline™ (Fipronil- fenilpirazolona) contra la garrapata del bovino *Boophilus microplus* (Can.) resistente a piretroides y organofosforados. XXXIV Congreso Nacional de Entomología. Aguascalientes, Ags. 233-238.
- Solano M. 1979. Determinación de resistencia de *Boophilus microplus* al acaricida coumaphos en Costa Rica. DVM Dissertation, School of Veterinary Medicine, Universidad Nacional, Heredia, 1-10.
- Solomon, K. R. 1983. Acaricide resistance in ticks. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 27. 273-296.
- Stone, B.F. & Haydock, K.P.1962. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus* (Can.) *Bull. Entomol. Res.* (53): 563-578.

Cuadro 1. Distribución geográfica de frecuencia acumulada de diagnósticos de doble resistencia a organofosforados y piretroides en la garrapata *Boophilus microplus* durante los años de 1997 a 1998 en México.

1. Chiapas		8	3	1. Chiapas		14	3
2. Coahuila		-	4	2. Coahuila		-	6
3. Colima		8	-	3. Colima		8	-
4. Guerrero*		-	25	4. Guerrero		20	143
5. Jalisco		1	3	5. Hidalgo*		2	3
6. Morelos		-	29	6. Jalisco		1	3
7. Nvo. León		-	4	7. Michoacán*		1	-
8. Oaxaca		6	20	8. Morelos		-	30
9. Puebla*		2	-	9. Nayarit*		-	2
10. S.L.P.		36	-	10. Nvo. León		1	5
11. Sinaloa*		-	1	11. Oaxaca		6	21
12. Tabasco		19	3	12. Puebla		3	1
13. Tamaulipas		52	6	13. Querétaro*		1	-
14. Veracruz		75	26	14. S.L.P.		36	-
15. Yucatán		2	-	15. Sinaloa		-	2
				16. Tabasco		20	3
				17. Tamaulipas		54	6
				18. Veracruz		92	27
				19. Yucatán		2	-
TOTAL	483	209	124	TOTAL	701	261	255

\* Estados con casos de resistencia incorporados al monitoreo en 1997 y 1998.

N.A.\*\* =Número de muestras analizadas.

OF/P= Organofosforados y piretroides.

SUSC= Susceptible.

Cuadro 2. Frecuencia acumulada de los casos de doble resistencia a organofosforados y piretroides en la garrapata *Boophilus microplus* hasta septiembre de 1999 en México.

ESTADO	No. de muestras analizadas	OF/P	SUSCEPTIBLE
1. Chiapas	31	19	3
2. Coahuila	6	-	6
3. Colima	15	8	1
4. Guerrero	184	20	143
5. Hidalgo	8	2	3
6. Jalisco	6	1	3
7. Michoacán	3	1	-
8. Morelos	30	-	30
9. Nayarit	7	-	7
10. Nvo. León	6	1	5
11. Oaxaca	56	7	21
12. Puebla	5	3	1
13. Querétaro	1	1	-
14. S.L.P.	46	36	-
15. Sinaloa	2	-	2
16. Tabasco	33	21	4
17. Tamaulipas	80	57	6
18. Veracruz	213	98	27
19. Yucatán	6	2	-
TOTAL	738	277	262

OF/P= Organofosforados y piretroides.

Cuadro 3. Porcentajes acumulados de casos doble resistentes y susceptibles de los años 1995 a 1999 en México.

AÑO	No. de muestras analizadas	OF/P	SUSCEPTIBLE
1995	283	112/(39.5%)	48/(16.9%)
1996	402	179/(44.5%)	89/(22.1%)
1997	458	209/(45.6%)	99/(21.6%)
1998	538	241/(44.7%)	112/(20.8%)
1999	575	257/(44.6%)	119/(20.6%)

OF/P= Organofosforados y piretroides.

Número derecha diagonal indica porcentajes de casos.

Número izquierda diagonal indica número de casos.

**Cuadro 4. Factores de resistencia obtenidos mediante la prueba de paquete de larvas (Stone & Haydock, 1962) a *Boophilus microplus* cepa "Tuxpan" resistente.**

<i>Boophilus microplus</i> "Tuxpan" resistente a OF						
Ixodicida	1984 Cenapa		1998 Cenapa		1999 Texas	
	CL <sub>50</sub> S	F.R.	CL <sub>50</sub> S	F.R.	CL <sub>50</sub> S	F.R.
Coumafós	0.028	4	0.027	3.4	0.027	3.3
Clorfenvinfos	0.030	10	0.019	5.2	0.037	1.43
Diazinon	0.017	11	0.012	14.16	0.02	7.5
Flumetrina	-	-	-	-	0.00078	-
Deltametrina	-	-	-	-	0.0014	-
Cipermetrina	-	-	-	-	0.01	-

OF= Organofosforados.

CL<sub>50</sub> S = Concentración letal 50 de la cepa "susceptible".

F.R.= Factor de resistencia.

Cenapa= Colonia mantenida en México.

Texas= Colonia mantenida en Mission, Texas.

**Cuadro 5. Factores de resistencia obtenidos mediante la prueba de paquete de larvas (Stone & Haydock, 1962) a una cepa de garrapatas *Boophilus microplus* resistente.**

<i>Boophilus microplus</i> "Aldama" resistente a OF y PS				
Ixodicida	1994		1999	
	CL <sub>50</sub> S	F.R.	CL <sub>50</sub> S	F.R.
Coumafós		2.9	0.027	2.4
Clorfenvinfos		3.5	0.037	1.51
Diazinon		2.9	0.02	2.5
Flumetrina		65.95	0.0008	67.5
Deltametrina		3.40	0.0013	1.23
Cipermetrina		2.83	0.01	1.9

OF y PS= Organofosforados y piretroides.

CL<sub>50</sub> S = Concentración letal 50 de la cepa "susceptible".

F.R.= Factor de resistencia.



**Cuadro 6. Factores de resistencia obtenidos mediante la prueba de paquete de larvas (Stone & Haydock, 1962) en *Boophilus microplus* cepa "Mora" doble resistente.**

<i>Boophilus microplus</i> "Mora" resistente a OF y PS				
Ixicida	1993 Cenapa		1998 Cenapa	
	CL <sub>50</sub> S	F.R.	CL <sub>50</sub> S	F.R.
Coumafos	0.019	5.05	0.027	9.2
Clorfenvinfos	0.030	0.0	0.019	8.4
Diazinon	0.017	8.60	0.012	11.6
Flumetrina	0.00051	352.9	0.00145	-
Deltametrina	0.009	104	0.013	-
Cipermetrina	0.032	118.75	0.05	-

OF y PS= Organofosforados y piretroides.

CL<sub>50</sub> S = Concentración letal 50 de la cepa "susceptible".

Cenapa= Colonia mantenida en México.

F.R.= Factor de resistencia.

**Cuadro 7. Porcentajes de mortalidad de *B. microplus* "Mora" cepa de campo, obtenidos mediante la técnica de dosis discriminantes (Santamaría, 1992) en larvas.**

Ixicida	Porcentaje de mortalidad (%)	
	1993	1999
Lindano (OC)	100	83.69
Coumafos (OF)	17.33	16.85
Diazinon (OF)	5.74	14.12
Clorfenvinfos (OF)	81.01	52.88
Flumetrina (PS)	0.0	41.66
Deltametrina (PS)	0.0	68.12
Cipermetrina (PS)	0.0	70.43

OC= Organoclorado.

OF=Organofosforado.

PS= Piretroide sintético.

Cuadro 8. Comparación de factores de resistencia de las cepas "Mora" y "Santa Luiza" a compuestos organofosforados y piretroides obtenidos mediante la prueba de paquete de larvas.

Ixodicida	<i>B. microplus</i> "Mora"		<i>B. microplus</i> "Santa Luiza"	
	CL <sub>50</sub> S	F.R.	CL <sub>50</sub> S	F.R.
Coumafos	0.019	5.05	0.025	2.4
Clorfenvinfos	0.030	0.0	0.01	6
Diazinon	0.017	8.60	0.02	3.63
Flumetrina	0.00051	352.9	0.00078	205.12
Deltametrina	0.009	104	0.0012	85
Cipermetrina	0.032	118.75	0.045	46.6

CL<sub>50</sub> S = Concentración letal 50 de la cepa "susceptible".

F.R.= Factor de resistencia.

Cuadro 9. Comparación de porcentajes de control de las cepas "Mora" y "Santa Luiza" a organofosforados y piretroides con la fase adulta de *B. microplus*.

<i>B. microplus</i> "Mora"		<i>B. microplus</i> "Santa Luiza"	
Ixodicida	% Control	Ixodicida	% Control
Coumafos	34.14	Coumafos	1.69
Clorfenvinfos	42.01	Clorfenvinfos	35.18
Clorpirifos	40.68		
Flumetrina	0.0	Flumetrina	22.12
Deltametrina	0.0		
Cipermetrina	0.0	Cipermetrina	10.62
Amitraz	100.00	Amitraz	33.96

Cuadro 10. Porcentajes de efectividad obtenidos con un organofosforado y amitraz sobre garrapatas *B. microplus* en el rancho "La Mora" en E. Zapata, Tabasco.

Coumafos (OF)		Amitraz	
Día	%E/R	Día	%E/R
1	42.27	1	99.21
3	73.88	3	100.00
5	71.52	5	100.00
7	48.20	7	100.00
14	79.41	14	93.28
21	65.99	21	100.00
28	42.21	28	29.61
Global	60.50	Global	90.99

OF= Organofosforado.

%E/R = Porcentaje de efectividad sobre la replesión.

## **ALGUNOS CONCEPTOS DE MANEJO INTEGRADO DE PLAGAS APLICADOS AL CONTROL DE GARRAPATAS EN EL GANADO BOVINO EN MÉXICO.**

### **INTEGRATED MANAGEMENT CONCEPTS OF PESTS APPLIED TO THE CONTROL OF THE CATTLE TICK IN MEXICO.**

HUERTA- PANIAGUA R. A. \*, VILLAGÓMEZ-CORTÉS J. A. S. \*\*

\* *Especialidad de Agroecología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Montecillo, Edo. de México.*

\*\* *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Veracruz.*

El uso irracional de garrapaticidas ha provocado contaminación ambiental y generado cepas de garrapatas resistentes a los ixodicidas de síntesis. Las consecuencias adversas del uso exclusivo y excesivo de ixodicidas despertaron interés por los principios básicos del control de plagas, acercando ideas sobre el combate de plagas al ámbito de la ecología. El punto de vista hacia el combate de estos ectoparásitos cambió y se buscaron otros métodos no convencionales. La filosofía sobre el control evolucionó y la búsqueda de la erradicación fue sustituida por la coexistencia. El objetivo de este trabajo es revisar algunos conceptos sobre el manejo integrado de plagas y proponer criterios para unificar y compartir el significado de los términos. Se revisaron conceptos de varios autores como "control integrado", "manejo protector de especies nocivas", "manejo de plagas", "control ecológico", "control ecológico integral", "control holístico" y "manejo integrado de plagas" (MIP). Se discuten elementos claves del MIP (fases de crisis, desastre, de combate supresivo o multitáctico y de manejo dirigido), conceptos de agroecosistemas, así como de control químico, mecánico, cultural, genético, legal, biológico, inmunológico y nuevas opciones. La teoría del MIP es el resultado lógico de los avances en toxicología, ecología, control biológico, genética y otras disciplinas, y el enfoque de sistemas de producción permite tener una visión de la situación imperante. Si bien ninguna definición de MIP es completa, la premisa fundamental de la filosofía del MIP es la coexistencia; empero, los ganaderos no tienen una cultura de MIP y conviven con las garrapatas porque son organismos enzoóticos. En conclusión, la ganadería se encuentra entre una fase de crisis y de combate supresivo, producto de que en el ámbito pecuario no es general la idea de coexistir con garrapatas y de que aun no se adoptan conceptos del MIP, por lo que se debe evitar el llegar a fase de desastre y establecerse en la de manejo dirigido. Además, es necesario tener una visión holística del problema y entender que para implementar cualquier acción se tiene que considerar el problema global de la ganadería a fin de evitar seguir modificando y dañando a los ecosistemas.

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DEL CUNDEAMOR (*MOMORDICA CHARANTIA L.*) (CUCURBITACEAE) SOBRE *Boophilus microplus* (CANESTRINI).**

**EVALUATION OF THE ACTIVITY OF CUNDEAMOR (*Momordica charantia L.*) (Cucurbitaceae) ON *Boophilus microplus* (Canestrini)**

HUERTA-PANIAGUA, R. A.\*, RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ C.\*, VILLAGÓMEZ-CORTÉS, J.A.S.\*\*

- \* *Especialidad de Agroecología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados. Montecillos, Edo. de México*
- \*\* *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Veracruzana. Veracruz.*

La aparición de resistencia en las garrapatas a los plaguicidas de síntesis, obliga a buscar otras opciones de control. Una posibilidad es la utilización de extractos acuosos de plantas con propiedades ixodicidas/ixodistáticas. Antes de la aparición de los plaguicidas químico-sintéticos, las plagas se combatían con productos inorgánicos y vegetales como piretro, tabaco, barbasco y rotenona. Estudios preliminares realizados por Huerta y Villagómez en 1988 mediante la técnica de inmersión directa, encontraron actividad letal de 100 % del extracto de cundeamor (en verde y macerado en agua al 20% del peso) sobre larvas de *B. microplus*, pero no sobre ninfas y adultos. El objetivo de este trabajo fue probar cuatro concentraciones (1, 3, 5 y 10 %) de extractos de cundeamor (*Momordica charantia L.*) sobre larvas y extracto al 5% + jabón al 2% sobre adultos de *B. microplus*. Esto se hizo de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-006-ZOO-1993 en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal de la SAGAR en Jiutepec, Mor. El porcentaje de mortalidad de larvas se evaluó por la técnica de Shaw con 5 ml de cada extracto por papel filtro. Se realizó también la inmersión de lotes de 10 hembras durante un minuto en cada extracto. Con ellas y su progenie, se evaluó el porcentaje de inhibición de la oviposición, el de eclosión y el de control. La mortalidad (%) de larvas fue de 62.2 con el extracto al 1%; 79.5 para el 3%; 29.9 para el 5% y 47.5 para el 10%. La inhibición de la oviposición (%) de hembras fue de 2.6 para el extracto al 5 % y de 5.2 para el extracto al 5 % + jabón al 2 %. La inhibición de la eclosión (%) de hembras fue de 18.9 para el extracto al 5 y de 14.9 para el extracto al 5 % + jabón al 2 %. En conclusión, la mortalidad máxima lograda sobre larvas (79.5%), sugiere que el Cundeamor tiene potencial para el control de esta fase, por lo que se recomienda tratar de purificar el ingrediente activo y ensayar formas de obtención y aplicación.

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE EXTRACTOS ACUOSOS DEL NIM  
(AZADIRACHTA INDICA (L.) JUSS.) (MELIACEAE) SOBRE *Boophilus microplus*  
(CANESTRINI).**

**EVALUATION OF WATER EXTRACTS ACTIVITY OF NIM (AZADIRACHTA  
INDICA (L.) JUSS.) (MELIACEAE) ON *Boophilus microplus* (CANESTRINI).**

HUERTA- PANIAGUA, R. A., RODRÍGUEZ-HERNÁNDEZ C.

*Especialidad de Agroecología, Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados,  
Montecillos, Edo. de México.*

Ante el creciente número de focos de aparición de resistencia a diversos ixodíctidos y los peligros en la contaminación del medio que esto implica, es necesario explorar otras alternativas para el control de garrapatas, tales como el uso de extractos acuosos de plantas con propiedades ixodíctidas/ixodistáticas, sobre las cuales existen pocas investigaciones recientes. El objetivo de este trabajo fue probar cuatro concentraciones (1, 3, 5 y 10 %) de extractos de semillas de nim (*Azadirachta indica*) sobre larvas y extracto al 5% + jabón al 2% sobre adultos de *B. microplus*.

El ensayo se hizo de acuerdo con la norma oficial mexicana NOM-006-ZOO-1993 en el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal de la SAGAR en Jiutepec, Mor. El porcentaje de mortalidad de larvas se evaluó por la técnica de Shaw con 5 ml de cada extracto en cada disco papel filtro. Las larvas tratadas se incubaron por 72 horas a 27°C y 80 % de humedad relativa. Se realizó también la inmersión de lotes de 10 hembras durante un minuto en los diferentes extractos. Con ellas y su prole, se evaluó el porcentaje de inhibición de la oviposición, el de eclosión y el de control.

La mortalidad (%) de larvas fue de 39.4 con el extracto al 1%; 0.0 para el 3%; 6.1 para el 5% y 27.3 para el 10%. La inhibición de la oviposición (%) de hembras fue de 0.3 para el extracto al 5 % y de 8.2 para el extracto al 5 % + jabón al 2 %. La inhibición de la eclosión (%) de hembras fue de 20.8 para el extracto al 5 y de 12.8 para el extracto al 5 % + jabón al 2 %. En conclusión, los extractos acuosos de nim no mostraron marcada actividad ixodíctida sobre *B. microplus* en la forma de extracto acuoso y a las concentraciones ensayadas, bien podría tenerla en otras formas y concentraciones.



**SIMULACION DE ROTACION SISTEMATICA DE POTREROS EN LA  
EVALUACION DE ESTRATEGIAS DEL MANEJO INTEGRADO DE  
GARRAPATAS (MIG) PARA EL CONTROL DE *Boophilus microplus* (Acari:  
Ixodidae) EN VENEZUELA**

**SIMULATION OF SYSTEMATICAL ROTATION PASTURES IN THE  
EVALUATION OF THE INTEGRATED TICKS MANAGEMENT (MIG) FOR THE  
CONTROL OF *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) IN VENEZUELA**

F. HERNÁNDEZ A. \*, P.D. TEEL \*\*, W.E. GRANT \*\*\*

\* *Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad del Zulia, Apdo. 526. Maracaibo, Venezuela*

\*\* *Department of Entomology, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA.*

\*\*\* *Department of Wildlife & Fisheries Sciences, Texas A&M University, College Station, TX 77843, USA.*

I.	Introducción.....	125
II.	Materiales y Métodos.....	126
III.	Resultados.....	127
IV.	Discusión.....	127
V.	Conclusión.....	127
VI.	Referencias.....	128

## I. INTRODUCCIÓN

La garrapata del ganado *Boophilus microplus* (Can.) está ampliamente diseminada en Venezuela y con distribución variable [9,13], habiendo sido encontrada en 92.6% en bovinos de la zona ecológica bosque seco tropical (bs-T) [9]. Las garrapatas producen pérdidas económicas y en Venezuela su control se ha efectuado basicamente usando tratamientos garrapaticidas. El Manejo Integrado de Garrapatas (MIG) a través de la rotación sistemática de potreros ofrece una posibilidad para el control de garrapatas [10] aún cuando la dispersión y dinámica poblacional de estos ectoparásitos en sistemas de manejo utilizando rotación de potreros es compleja [16]. Varios modelos de simulación computarizada de dinámicas poblacionales de garrapatas basadas en el ciclo de vida de *B. microplus* han sido desarrolladas [8,16] y están siendo utilizadas en la planificación de estrategias del MIG, tanto para esta especie de garrapata como para agentes patógenos que ella transmite. En este trabajo se desarrolla y usa un modelo de simulación para evaluar la rotación sistemática de potreros como un medio del MIG en la zona ecológica bs-T de Venezuela a fin de reducir el número de tratamientos garrapaticidas contra *B. microplus* y utilizando el ganado bovino criollo tipo Mosaico, el cual no tiene características propias sino que es el producto de cruzamientos indiscriminados de razas *Bos taurus* y *Bos indicus* presentes en la región.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

Descripción del modelo: el modelo de simulación se creó utilizando el programa STELLA II<sup>TM</sup> (Versión 3.0, High Performance System, Inc., Hanover, NH). El modelo esta compuesto por tres sub-modelos: el garrapata-bovino, el garrapata-potrero y el rotación sistemática de potreros.

Sub-modelo garrapata-bovino. Se fundamenta en el ciclo de vida de *B. microplus* en su fase parasítica y los parámetros utilizados fueron: la mortalidad larvaria fué 92% para el ganado tipo Mosaico [17]. La relación macho-hembra fué de 1:1,36 respectivamente [7]; el primer desprendimiento de garrapatas hembras gordas del bovino ocurrió el 19<sup>avo</sup> día con un período de caída de 9 días y con un pico de desprendimiento entre el 21<sup>avo</sup> y 22<sup>avo</sup> día [14], mientras que el porcentaje diario de ausencia de desprendimiento fué de 20% [15]. El período comprendido entre la fijación de la larva y el desprendimiento de la hembra gorda del bovino fué de 21 días [6].

Sub-modelo garrapata-potrero. Contiene los parámetros correspondientes al ciclo de vida de *B. microplus* fuera del hospedador durante las épocas de lluvia y sequía. Para la época de sequía los períodos de pre-oviposición, oviposición e incubación fueron de 3, 9 y 24 días respectivamente [2], mientras que para la de lluvia fueron 5, 10 y 25 respectivamente [12], siendo el promedio de postura de 2056 huevos por hembra [3]. La mortalidad durante la pre-oviposición fué de 10% (Teel, no publicado). La fecundidad de los huevos fue de 88% [11]. Una vez eclosionadas las larvas, se les dió un tiempo de maduración de 3 días para que subieran a los pastos en espera del hospedador [5]. La sobrevivencia de larvas en el potrero con pasto *Brachiaria decumbens* en las épocas de lluvia y seca fué de 44 y 60 días respectivamente [2], siendo 50% la sobrevivencia en las primeras tres semanas y 10% a la cuarta semana, valores que constituyeron la base para calcular la sobrevivencia esperada a nivel de campo mediante análisis de regresión y 95% de confianza [18]. El porcentaje de la larva para encontrar hospedador fué de 0.123 [15]. La carga de garrapatas en el potrero usada para iniciar la simulación fue de 500 hembras gordas por animal [1].

Sub-modelo rotación sistemática de potreros. Se basa en información obtenida en la zona ecológica bs-T de Venezuela. La secuencia de pastoreo:descanso del potrero durante la estación de sequía fué 36:36 a 6:36 y durante la época de lluvia de 24:24 a 6:24, con un sistema de manejo de rotación sistemática usando 2-6 potreros [4].

*Evaluación del modelo.* Simulaciones con pastoreo continuo y con rotación sistemática de potreros mostraron la dinámica poblacional de garrapatas esperada en las épocas de lluvia y de sequía y 5 generaciones por año de *B. microplus* [2]. Un crecimiento sostenido de la población de garrapatas durante una simulación para cuatro años fué obtenido en los casos de pastoreo con uno y dos potreros en ambas épocas estacionales. Por el contrario, cuando se usaron 3 o mas potreros usando rotación sistemática de potreros se obtuvo una declinación sostenida de la población de garrapatas también en ambas estaciones.

*Análisis de sensibilidad de resistencia del hospedador.* Una serie de simulaciones a cuatro años usando un solo potrero y mortalidades larvianas de 92% a 97% fueron efectuadas a fin de examinar la sensibilidad del modelo a cambios de resistencia de



1 hospedador a las garrapatas, teniendo como elemento de medida el número de garrapatas hembras standard producidas por día. La reducción de hembras standard obtenida fue directamente proporcional al aumento de la mortalidad larvaria, mientras que el número de generaciones de *B. microplus* se mantuvo inalterado con 5 por año.

*Simulación del sistema de rotación de potreros para evaluar el MIG.* Se efectuaron una serie de simulaciones con pastoreo continuo usando 1 potrero y pastoreo con rotación sistemática usando 2, 3, 4, 5 y 6 potreros tanto para la época de sequía como para la lluviosa con *B. microplus* y usando el calendario Juliano. El período de época de sequía duró 103 días y el de lluvia 220 días. No se aplicó ningún tipo de tratamiento garrapaticida durante las simulaciones.

### III. RESULTADOS

Usando 1 potrero y pastoreo continuo y 2 potreros con rotación sistemática se obtuvo un crecimiento sostenido de la población de garrapatas. Por el contrario, cuando se utilizaron 3 a 6 potreros con rotación sistemática, se obtuvo una declinación sostenida de la población de garrapatas con tendencia hacia la extinción de las mismas. Esta declinación fue directamente proporcional al número de potreros, es decir, a mayor número de potreros, mas rápida fue la declinación. En todos los casos sin excepción se obtuvieron 5 generaciones de garrapatas por año. En cuanto a la abundancia de garrapatas debidas a la época del año, los resultados ofrecieron un patrón poblacional de garrapatas apropiado de acuerdo a la época estacional.

### IV. DISCUSIÓN

El crecimiento continuo y sostenido de la población de garrapatas usando 1 y 2 potreros se debió a que el modelo carece de límites de crecimiento poblacional. En la realidad lo que ocurre es que el animal puede morir en un momento dado debido al exceso de garrapatas. La declinación creciente de la población de garrapatas usando 3 o mas potreros se debe al incremento de los períodos de descanso de los potreros, lo cual concuerda con los resultados de Wharton y col. [19] e Ivancovich [10], aún cuando éste último utilizó tratamientos garrapaticidas esporádicamente de acuerdo a su necesidad. Gran cantidad de datos para la construcción del modelo se obtuvieron de fuentes muy diferentes a la zona ecológica donde se hizo la simulación en lo que a condiciones bio-eco-climatológicas se refiere; hecho que puede conllevar a incurrir en fallas de precisión y que a su vez podría constituir una debilidad del modelo.

### V. CONCLUSIÓN

El modelo de simulación de rotación sistemática de potreros como estrategia del MIG para el control de *B. microplus* mostró ser una herramienta confiable para predecir la

dinámica poblacional de *B. microplus* en la zona ecológica bosque seco tropical de Venezuela. La utilización de 3 o mas potreros con manejo sistemático sugiere que este tipo de sistema puede ser una util herramienta para el control de *B. microplus*.

## VI. REFERENCIAS.

- Aycardi, E., Benavides, E., Garcia, O., Mateus, G., Henao, F., and Zuluaga, F., 1984. *Boophilus microplus* tick burdens on grazing cattle in Colombia. Trop. Anim. Hlth. Prod. 16: 78-84.
- Benavides, E., 1983. Observaciones sobre la fase no parasítica del ciclo evolutivo de *Boophilus microplus* en la altillanura plana Colombiana. Rev ICA. 18: 513-524.
- Benavides, E., 1984. Biología oviposicional de la garrapata *Boophilus microplus* en condiciones de los Llanos Orientales de Colombia. Rev. ICA. 19: 25-32.
- Clavero, F., 1993. Fac. de Agronomía. Universidad del Zulia. Venezuela. Personal communication.
- Davey, R.B., 1986. Daily dynamics of egg development and fecundity and effect of age of larvae on attachment rate to cattle in *Boophilus annulatus*. Southwest. Entomol. 11:17-22.
- Davey, R.B., Garza, J. and Thompson, G.D., 1982. Seasonal observations on the development and ovipositional capability of *Boophilus annulatus* and *B. microplus* (Acari: Ixodidae) reared on bovines. J. Med. Entomol. 19: 24-28.
- Davey, R.B. and Cooksey, L.M., 1988. Sex ratios of *Boophilus* tick (Acari:Ixodidae) reaching adulthood. J. Med. Entomol. 25: 82-14.
- Haile, D.G., Mount, G.A. and Cooksey, L.M., 1992. Computer simulation of *Babesia bovis* (Babes) and *B. bigemina* (Smith & Kilborne) transmission by *Boophilus* cattle ticks (Acari:Ixodidae). J. Med. Entomol. 29: 246-258.
- Hernández, F., 1986. Garrapatas (Acarina:Ixodoidea) del ganado bovino y controles utilizados en el Distrito Perijá, Estado Zulia, Venezuela. Rev. Fac. Cs. Vet., Univ. del Zulia, Venezuela. 51 p.
- Ivancovich, J.C., 1979. Control de la garrapata mediante manejo. INTA. Est. Exp. Agrop. El Colorado (FSA) 4: 1-10.
- Legg, J., 1930. Some observations on the life history of the cattle tick (*Boophilus australis*). Pro. Roy. Soc. Queensland. 41: 121-132.
- Mateus, G., 1981. Bioecología de las garrapatas. En: IICA, I Reunión de Directores de Salud Animal Resandina I. Ponencias, Resultados y Recomendaciones de Eventos Técnicos No. 240: 47-59. Ed. G. Gómez y E. Torres. Colombia.
- Power, L. and Silvestri, R. 1985. Incidencia de *B. microplus* y *A. cajennense* en explotaciones bovinas de los estados Barinas, Falcón, Lara y Yaracuy. Rev. Fac. Cs. Vet. Univ. Central de Venezuela. 32: 1-4
- Roberts, J.A., 1968. Resistance of cattle to the tick *Boophilus microplus* (canestrini). I. Development of ticks on *Bos taurus*. J. Parasitol. 54: 663-666.

- Sutherst, R.W., Dallwitz, M.J., Utech, K.B.W and Kerr, J.D., 1977. Aspects of host finding by the cattle tick *Boophilus microplus*. Aust. J. Zool. 25: 159-174.
- Teel, P.D., Grant, W.E., Marin, S.L. and Stuth, J.W., 1997. Simulated temporal and spatial dynamics of the cattle fever tick infestations as influenced by graze:rest sequence in rotational grazing systems. J. Range Mgmt (In press).
- Utech, K.B.W., Wharton, R.H. and Kerr, J.D., 1978. Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. Aust. J. Agric. Res., 29: 885-895.
- Utech, K.B.W., Sutherst, R.W., Dallwitz, M.J., Wharton, R.H., Maywald, G.F. and Sutherland, I.D., 1983. A model of the survival of larvae of the cattle tick *Boophilus microplus*, on Pasture. Aust. J. Agric. Res., 34: 63-72.
- Wharton, R.H., Harley, K.L., Wilkinson, P.R., Utech, K.B. and Kelley, B.M., 1969. A comparison of cattle tick control by pasture spelling, planned dipping, and tick resistant cattle. Aust. J. Agric. Res. 20: 783-797.



# PASADO, PRESENTE Y FUTURO DE LA VACUNACION CONTRA GARRAPATAS

## PAST, PRESENT AND FUTURE OF VACCINATION AGAINST TICKS

PETER WILLADSEN AND DAVID KEMP

*CSIRO Tropical Agriculture  
Molecular Animal Genetics Centre  
Level 3*

*Gehrmann Laboratories  
University of Queensland  
St Lucia Qld 4072*

*Phone: 61 7 3214 2467 Fax: 61 7 3214 2480*

*Email: Peter.Willadsen@tag.csiro.au*

I.	History of vaccine development.....	131
II.	Vaccines in the field.....	132
III.	Technical prospects for enhanced vaccine efficacy.....	132
IV.	Vaccines for other species: extensions of the technology.....	134
V.	Commercial imperatives.....	134
	Cost of entry.....	135
	Market size.....	136
	Competitive position.....	136
VI.	Vaccines and acaricides.....	136
VII.	Vaccines, tick immunology and the transmission of disease.....	137
VIII.	Summary.....	138
IX.	References.....	138

### I. HISTORY OF VACCINE DEVELOPMENT

Investigation of the immunology of the tick-host interaction has a long and interesting history, spanning at least sixty years (Willadsen, 1980; Wikel, 1996; Wikel and Bergman, 1997). Nevertheless, serious progress in the development of a vaccine was not made until the early 1980's when the advent of biotechnology offered the prospect of producing tick antigens in commercial quantities at acceptable prices. This acted as a stimulus to the identification of such antigens. The time scale for the development of the *Boophilus microplus* vaccine is instructive. Work began in 1982. The first purified single antigen capable of inducing worthwhile immunity in vaccinated cattle was identified in 1986. Hence the name Bm86. The first trials with recombinant proteins were carried out in 1987,

the first field trials in 1990-91. Full registration and the first commercial sales took place in 1994 (Willadsen *et al.*, 1995). This twelve-year period is relatively rapid for the development and commercialization of a novel veterinary product, particularly one which began as a completely untried idea. A number of additional antigens have been identified since, both by the Australian group and by other workers, though these have yet to make their way into commercial recombinant vaccines. Further experimental work is beginning to extend these observations into other tick species, but the rate of progress is being slowed by the lack of a strong commercial driver. This will be discussed below.

## II. VACCINES IN THE FIELD

In Australia, the tick vaccine continues to make progress in the traditional acaricide market, with the advantages of freedom from chemical residues and relatively low cost, compared, for example, with some of the newer macrocyclic lactones (Willadsen *et al.*, 1995). In the countries of South America, reports continue to appear on the efficacy of the Cuban vaccine, for example in Brazil (Mora Hernandez *et al.*, 1998; Rodriguez *et al.*, 1995a) and Cuba (Rodriguez *et al.*, 1995b; de la Fuente *et al.*, 1998).

## III. TECHNICAL PROSPECTS FOR ENHANCED VACCINE EFFICACY

Improvements in the existing vaccine may come from three directions: variation in the nature of the core recombinant antigen Bm86; addition of new antigens and enhancement of the immunological response. Cuban workers have reported that the Bm86 in their vaccine, which differs from that in the Australian vaccine by only four bases and one amino acid, is effective against a range of tick isolates from central and south America, but of very limited efficacy against two isolates from Argentina. Sequencing the Argentinian isolates showed approximately 20 amino acid differences between the Cuban and Argentinian molecule. Expression of the Argentinian Bm86 gave a vaccine, not only effective against the local tick strains but equally effective against the Cuban strains, suggesting this expressed protein has more "universal" applicability (Garcia-Garcia *et al.*, 1988; Cuban patent CU 24/98; NCBI Accession no. AF 150891). The simple explanation, that one or more of the amino acid substitutions contributes to a critical protective epitope on the molecule, seems unlikely. There is some evidence that the protective epitopes are distributed in multiple sites in the molecule (Tellam *et al.*, 1992) and it seems therefore more likely that the difference in the recombinants will lie in gross overall conformational differences. The link between sequence variation and vaccine efficacy may prove to be complex. Australian tick isolates show up to 17 amino acid differences between genes but these do not translate into profound differences in vaccine susceptibility. One Mexican tick isolate has yielded a Bm86 differing by 27 amino acids from the reference Australian strain. Recombinant antigens from both Australian (Yeerongpilly) and Mexican ticks were equally effective against both of the parent strains (Cobon, 1997).

During the identification of the Bm86 antigen, which is the active component of the TickGARD and GAVAC vaccines, it was observed that various vaccination fractions had significant effects on engorging ticks, through reductions in engorged tick numbers, weights or egg laying capacity. Not all of these seemed to contain Bm86. Some fractions were extremely effective, more so than the final vaccine (Willadsen *et al.*, 1988; Willadsen *et al.*, 1989), though these in our experience contained the Bm86 antigen as well as other components. The rationalization of these observations was, firstly, that there were a number of antigens or antigenic moieties and secondly, that some antigens, taken in combination, could be more effective than even the Bm86 antigen on its own. There was however, a caveat. Although the primary target of vaccination seemed to be the tick gut, it was possible to produce antibodies that reacted with the surface of the tick gut but which nevertheless failed to significantly damage feeding ticks (Tracey-Patte, unpublished observation). In addition, a number of individual proteins located on the surface of gut digest cells were found to be immunogenic, but not protective (Tellam *et al.*, 1992) and neither do all protective antigens necessarily reside in the gut. That is, the effective antigens were a subset, and probably a small subset, of the immunogenic molecules that were accessible to ingested antibody.

There is evidence that the addition of some purified antigens to the existing TickGARD vaccine can enhance its efficacy. Two antigens, BMA7 and Bm91, have been studied in detail (Riding *et al.*, 1994; Jarney *et al.*, 1995; Willadsen, 1997, McKenna *et al.*, 1998). The best effects to date suggest a doubling of efficacy with either native BMA7 or recombinant Bm91. A very limited experiment with recombinant Bm86 and native BMA7 and Bm91 suggest that this mixture might be much more potent (Willadsen, unpublished). The difference may well lie in the glycosylation. While there is evidence that the glycosylation of Bm86, though immunogenic, does not play a significant protective role (Willadsen and McKenna, 1991), the same may not apply for other antigens. It is interesting, for example, that although native Bm91 as a single immunogen induces a protective immunological response, limited evidence suggests that recombinant protein fails to do so. The effects of recombinant Bm91 are seen solely in a mixture with Bm86 (Willadsen *et al.*, 1996).

Theoretically therefore, expression of recombinant antigens with tick-like glycosylation may have significant advantages. Whether, given commercial considerations (see below), this will be done in the near future is a questionable.

While knowledge is slowly accumulating about the molecules of the tick gut and tissues which might be targets for a protective immunological response, far less has been done to exploit the antigens and potential antigens secreted by the tick. Two recent discoveries go some way to rectifying this. A number of tick species have been found to possess high affinity histamine-binding proteins with homology to the lipocalins (Paesen *et al.*, 1999). Though the effect of these proteins as antigens has still to be determined, because of their putative role in the tick-host interaction, they are obvious vaccine candidates. More directly, the characterization of a salivary extracellular matrix-like

protein of 29kDa from *Haemaphysallis longicornis* has been reported. It is effective as an antigen in rabbits (Mulenga *et al.*, 1999).

The search for other antigens will hopefully continue, and they may come from work in other pest-host or parasite-host systems. For example, the H11 protease of *Haemonchus contortus* is an established protective antigen, found to be effective in a number of host – parasite systems. Gut bound aminopeptidases, perhaps related to H11, are found in ticks. Their vaccine efficacy appears not to have been tested. Many other potential targets can be imagined, though experimental evidence for their importance is lacking.

#### IV. VACCINES FOR OTHER SPECIES: EXTENSIONS OF THE TECHNOLOGY

With the vast increase in the availability of genomic information, it is becoming increasingly clear that significant conservation of functional molecules across phyla is the norm, not the exception. There is a specific example for this with the tick antigens, where the antigen Bm91, a carboxydipeptidase (Riding *et al.*, 1994), is functionally and structurally conserved in Diptera (Wijffels *et al.*, 1996) as well as in man and other vertebrates. Not surprisingly therefore, the Bm86 antigen is also conserved, in ticks at least. A close homologue exists in *Hyalomma anatolicum*, and significant cross-protection between the *B. microplus* vaccine and *B. decoloratus* has been observed (F. Jongejan, unpublished; Willadsen and Jongejan, 1999). More strikingly, almost 100% protection has been found by several groups testing the *B. microplus* vaccine against *B. annulatus* (Fragoso *et al.*, 1998; E. Pipano unpublished, Willadsen and Jongejan, 1999). In no case yet has the Bm86 molecule from the homologous species been expressed and tested for its efficacy, though this is the obvious next step. Certainly, the levels of cross-protection seen between the *B. microplus* antigen and other tick species should mark the lower limit of vaccine-induced protection.

If it is established that the expression of antigen homologues is a valid approach to the development of further vaccines, (and it would seem that there is already sufficient evidence for this) then rapid and cost – effective advances in the control of a number of tick species using immunological methods might be readily made.

#### V. COMMERCIAL IMPERATIVES

Three major determinants of the commercial viability of tick vaccines, in common with other commercial products, are the cost of entry into a particular market, the market size and the competitive position of the product. Together they go far to explaining a lack of enthusiasm from commercial companies for products which farmers may regard as desirable, whether they be drugs or vaccines. Many factors which impinge on these three determinants cannot easily be varied. Others may change in the long term and so point a way to the future. It is therefore worthwhile considering several of these factors in more detail, from the viewpoint of a scientist interested in the adoption of technology.



## **Cost of entry**

For novel veterinary products, major components of the cost of entry are the cost of development, manufacture and registration. This is particularly so for products as novel as tick vaccines. The cost of research and development needed for the vaccine against *B. microplus* was considerable since it spanned a ten year period. Although the scientific team responsible for the development was small, costs of experimentation (biotechnology and large animal research) were high. Currently the number of identified, effective antigens is very small and scientifically the desirability of identifying more is unquestionable. The deterrent is the cost of doing so, particularly with tick species of lesser economic impact than *B. microplus*. Cleverer and hence more cost effective ways of identifying critical antigens are needed. The cost of doing such research is also the greatest impetus to making the most of the few antigens we have, for example, by exploring homologues in other species as described above.

The cost of manufacture of a recombinant vaccine can be very low, assuming it does not require an expensive, mammalian cell expression system or expresses at very low levels. Moreover, for relatively small markets (say, for less than a few million doses) facilities able to carry out fermentations on an adequate scale are common, often being offered on a contract basis. That is one of the attractions of a recombinant protein product: the use of low cost, generic manufacturing capacity.

The cost of registration is a very significant issue for any novel veterinary product, particular for an animal entering the human food chain. This is one of the core problems: despite wide recognition of the costs of individual national registrations for veterinary products, this is still demanded in most countries as is, very often, evidence for efficacy under local conditions. The attitude is understandable but the ultimate effects may disadvantage both farmers and consumers. In principle, vaccines, particularly killed or defined antigen vaccines, have some significant advantages which make the costs of registration much lower than for a veterinary chemical. A vaccine like the tick vaccine, which uses a very small amount of highly purified protein to induce an antibody-mediated immune protection, is regarded as intrinsically unlikely to cause pathology in cattle or, particularly considering the rapidity with which proteins are degraded when injected, any reaction at all in the final human consumer of meat or milk. Since toxicity and safety testing are the most expensive part of the registration process, the requirement for minimal or no such testing for a tick vaccine is a large cost saving. On the other hand, the demonstration of efficacy may be difficult, particularly for a product which aims for long term herd control of a parasite, rather than immediate control on the individual animal, and which must work in a very wide spectrum of production systems. The Australian tick vaccine was tested in over 18000 cattle before registration.

## **Market size**

One indicator of the market size for a novel pest control product is the size of the existing market for established technology; for a tick vaccine, this means the market for acaricides. Any new product can expect to get a portion of that market, determined by its cost, efficacy, convenience, acceptability and other qualities. This gross market estimate may be increased if the new product has unique characteristics that make it more attractive than any competition. For example, a product with very sustained efficacy may be used in extensive animal husbandry systems where less persistent products have made no inroads. Other factors may decrease the attractiveness of a vaccine. Pesticides are likely to be less species specific than vaccines. Such relative lack of specificity has disadvantages. Differential sensitivity in some "target" pest species may lead to the development of resistance. Broad specificity for non-target species may increase the environmental impact. Nevertheless, broad specificity is also a commercial advantage, since it means that a farmer may be able to control multiple pests with a single treatment. Such lack of specificity also explains why many veterinary pesticides for production animals are derived from products used on other animals or even for crop pest control, a considerable cost saving for the company developing the product. Setting such complications aside, the gross markets for acaricides, as an indicator of the potential, total market for a vaccine, are relatively small. The economic losses due to *B. microplus* in Australia has been variously estimated at \$100 million p.a., but acaricide sales are only \$10million, shared among a range of commercial companies. The benefit of tick control to farmers is clear, but relatively little of that benefits accrues to the acaricide or vaccine manufacturer.

## **Competitive position**

Many factors which affect the relative attractiveness of vaccines vis a vis acaricides have been mentioned above. Finally, the two greatest determinants of attractiveness to farmers are relative cost and ease of use. The former varies from country to country. The latter is a function of both familiarity and product characteristics. For example, a vaccine, though relatively easy to use, must be used differently to a chemical acaricide or it will fail.

Intellectual property protection is also a key issue for companies developing a vaccine. If such protection is available, the transient monopoly it grants will assist a company to recover its research and development costs; without such protection, the attractiveness of major R&D investment is decreased. Part of the present lack of enthusiasm of companies for protecting their products from resistance is the relatively short time before the patent-derived monopoly lapses and cheaper generic drugs enter the market.

## **VI. VACCINES AND ACARICIDES**

With current tick vaccines, the effect on ticks is postponed until good antibody titres are developed, typically six weeks after the first injection of a new host, or two weeks after a secondary or booster vaccination. Since the major effects are on tick engorgement and

egg laying, the effects on tick populations in the field are further delayed. For this reason, use of the registered product in Australia has always been accompanied by the recommendation that a short acting acaricide could be used simultaneously with vaccination should the cattle be heavily tick infested or should field populations of larvae be high. The same strategy has been reported to be very effective in Mexico (Redondo *et al.*, 1998).

More interesting, in a scientific sense at least, is the possibility of synergistic action of vaccine with some acaricides. This will be discussed elsewhere.

## VII. VACCINES, TICK IMMUNOLOGY AND THE TRANSMISSION OF DISEASE

One of the major economic impacts of ticks is as vectors of viral, rickettsial and protozoal diseases. Typically, a tick will release an array of bioactive molecules at its attachment site to facilitate its attachment and feeding. In turn, the host will generate an array of immunological responses that may or may not be protective. The disease organism will be transmitted by the tick into this milieu, and be taken up by the feeding tick from this milieu, typically into the tick's gut, where it may undergo further differentiation or, at least, penetration into the vector. In this exceedingly complex system, numerous effects are possible. These include:

Enhancement of transmission between co-feeding vector ticks, as seen for viruses and *Borrelia* (Labuda *et al.*, 1997; Ogden, Nuttall and Randolph, 1997)

Inhibition of transmission in previously tick-exposed animals as seen for *Borrelia* (Wikel *et al.*, 1997)

Inhibition of transmission by ingestion of an antibody reacting with the life stage present in the tick gut, as seen for *Borrelia* (Kurtenbach *et al.*, 1997; Zhong *et al.*, 1997)

Tick-induced immunosuppression of the host as a factor in disease susceptibility, as seen for Dermatophilosis (Ambrose *et al.*, 1999).

Dependence of the disease agent on unidentified components of the tick gut for its development, as is seen for *Babesia bigemina* (Gough, Jorgenson and Kemp, 1998).

With such complex situations, reduction in tick numbers through vaccination or acaricide treatment may reduce the incidence of tick-transmitted disease. Alternatively, if the incidence of clinical disease is reduced by early exposure during a period of maternally-derived immunity or age-related, relatively low susceptibility, it may lead to increased disease incidence. In addition, there is the intriguing possibility that vaccination, by drastically altering the gut physiology, may have an effect on disease transmission unrelated to the direct effect on the tick population. Under such circumstances, it is interesting that use of the GAVAC vaccine has been correlated with reduced incidence of babesiosis and anaplasmosis, at least in some districts of Cuba (de la Fuente *et al.*, 1998). Studies on the epidemiology of several tick borne diseases show that immunity and

endemic stability require a level of transmission to young animals. The tick vaccine has some theoretical advantage over acaricides in that the younger stages (immature instars) of the tick which transmit the diseases are largely unaffected. For the most serious tick borne disease, East Coast Fever, there is mortality in cattle due to very high infection rates during some "tick seasons". Tick vaccine (if available for the vector tick *Rhipicephalus appendiculatus*) may be a more epidemiologically sound and just as effective a treatment as intensive acaricide use. These possibilities will need research.

#### VIII. SUMMARY

Two recombinant vaccines against the tick *B. microplus* have been available commercially for approximately 5 years. These are the Australian vaccines sold as TickGARD and TickGARDPlus and the Cuban vaccine sold as Gavac and GavacPlus. Both rely on a single recombinant antigen, Bm86, in an adjuvant. Both vaccines are still making steady though relatively slow inroads into the traditional market for acaricides. An increase in the use of vaccine and a concomitant decrease in the use of chemical acaricides are likely to come from three directions. The first will be the improvement in efficacy, either through achievement of a more sustained antibody response, or more probably through the incorporation of additional recombinant antigens. The number of potentially useful antigens continues to increase, though relatively slowly. Secondly, there is likely to be an extension of the vaccine to other tick species. Evidence is accumulating that such extension could be relatively straightforward and there are very exciting results in the control of *Boophilus annulatus* using the *B. microplus* vaccine from four laboratories in different parts of the world. Thirdly, there is the unexplored potential for a reduction in chemical usage through the synergistic action of vaccines and chemical acaricide. Another area of potential enormous long-term benefit is in the control of tick-borne disease. The study of the complex of interactions between host, tick and transmitted parasite is producing some fascinating, though still preliminary results.

The greatest constraint in the practical application of much of this science is likely to come not from the science itself, but from the commercial imperatives which play a decisive role in registration and adoption.

#### IX. REFERENCES

- Ambrose, N., Lloyd, D. and Maillard, J.-C. (1999) Immune response to *Dermatophilus congolensis* infections. *Parasitol. Today* 15, 295-300.
- Cobon, G.S. (1997) An anti-arthropod vaccine: TickGARD – a vaccine to prevent cattle tick infestations in "New Generation Vaccines", M.M. Levine, G.C. Woodrow, J.B. Kaper and G.S. Cobon Eds., Marcel Dekker Inc., New York, pp. 1145-1152.

- Fragoso et al., (1998)** Protection against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *Boophilus microplus* Bm86-containing vaccine GAVAC. Vaccine 16, 1990-1992.
- Fuente J. de la et al. (1998)** Field studies and cost-effectiveness analysis of vaccination with Gavac<sup>TM</sup> against the cattle tick *Boophilus microplus*. Vaccine 16, 366-373.
- Garcia-Garcia, J.C. et al., (1998)** Sequence variations in the *Boophilus microplus* Bm86 locus and implications for immunoprotection in cattle vaccinated with this antigen. Biotecnologia Habana '98. Abstracts.
- Gough, J.M., Jorgensen, W.K. and Kemp, D.H. (1998)** Development of tick gut forms of *Babesia bigemina* in vitro. J. Euk. Microbiol. 44, 298-306.
- Jarmey, J. et al. (1995)** Carboxydipeptidase from *Boophilus microplus*: a "concealed" antigen with similarity to angiotensin-converting enzyme. Insect Biochem. Mol. Biol. 25, 969-974.
- Kurtenbach, K. et al. (1997)** Vaccination of natural reservoir hosts with recombinant lipidated OspA induces a transmission-blocking immunity against Lyme disease spirochaetes associated with high levels of LA-2 equivalent antibodies. Vaccine 15, 1670-1674.
- Labuda, M. et al. (1997)** Tick-borne encephalitis virus transmission between ticks cofeeding on specific immune natural rodent hosts. Virology 235, 138-143.
- McKenna, R.V. et al. (1998)** Vaccination of cattle against the tick *Boophilus microplus* using a mucin-like membrane glycoprotein. Parasite Immunol. 20, 325-336.
- Mora Hernandez, C.A. et al. (1998)** Evaluation of field tick infestation in cattle vaccinated with recombinant Bm86 vaccine Revista Brasileira de Medicina Veterinaria 20, 165-168 (CAB Abstracts).
- Mulenga, A. et al., (1999)** Molecular characterization of a *Haemaphysalis longicornis* tick salivary gland-associated 29-kilodalton protein and its effect as a vaccine against tick infestation in rabbits Infect. Immun. 67, 1652-1658.
- Ogden, N.H., Nuttall, P.A. and Randolph, S.E. (1997)** Natural Lyme disease cycles maintained via sheep by cofeeding ticks. Parasitology 115, 591-599.
- Paesen, G.C. et al. (1999)** Tick histamine-binding proteins: isolation, cloning and three-dimensional structure. Molecular Cell 3, 661-671.
- Redondo, M. et al. (1998)** Control of chemically resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle vaccinated with Gavac in Mexico. Biotecnologia Habana '98. Abstract.
- Riding, G.A. et al. (1994)** A protective "concealed" antigen from *Boophilus microplus*: purification, localization and possible function. J. Immunol. 153, 5158-5166.

- Rodriguez M. *et al.* (1995b) Control of *Boophilus microplus* populations in grazing cattle vaccinated with a recombinant Bm86 antigen preparation. *Vet. Parasitol.* 57, 339-349
- Rodriguez, M. *et al.* (1995a) Effect of vaccination with a recombinant Bm86 antigen preparation on natural infestations of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross bred cattle in Brazil. *Vaccine* 13, 1804-1808.
- Tellam, R.L. *et al.* (1992) Vaccination against ticks. Chapter 12 in "Animal Parasite Control Utilizing Biotechnology", W.K. Yong, (ed.), CRC Press, Boca Raton, pp. 303-331.
- Wijffels, G. *et al.* (1996) The cloning and characterization of angiotensin-converting enzyme from the dipteran species, *Haematobia irritans exigua*, and its expression in the maturing male reproductive system. *Eur. J. Biochem.* 273, 414-423.
- Wikel, S.K. (1996) Host immunity to ticks. *Ann. Rev. Entomol.* 41, 1-22
- Wikel, S.K. and Bergman, D. (1997) Tick-host immunology: significant advances and challenging opportunities. *Parasitol. Today* 13, 383-389.
- Wikel, S.K. *et al.* (1997) Infestation with pathogen-free nymphs of the tick *I. scapularis* induces host resistance to transmission of *Borrelia burgdorferi* by ticks. *Infect. Immun.* 65, 335-358
- Willadsen, P. (1980) Immunity to ticks. *Adv. Parasitol.* 18, 293-313
- Willadsen, P., McKenna, R.V. and Riding, G.A. (1988) Isolation from the cattle tick, *Boophilus microplus*, of antigenic material capable of eliciting a protective immunological response in the bovine host. *Int. J. Parasitol.* 18, 183-189.
- Willadsen, P. *et al.* (1989) Immunologic control of a parasitic arthropod. Identification of a protective antigen from *Boophilus microplus*. *J. Immunol.* 143, 1346-1351.
- Willadsen, P. and McKenna, R.V. (1991) Vaccination with 'concealed' antigens: myth or reality? *Parasite Immunol.* 13, 605-616.
- Willadsen, P. *et al.* (1995) Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* 110, S43-S50.
- Willadsen, P. *et al.* (1996) Comparative vaccination of cattle against *Boophilus microplus* with recombinant antigen Bm86 alone or in combination with recombinant Bm91. *Parasite Immunol.* 18, 241-246.
- Willadsen, P. (1997) Novel vaccines for ectoparasites. *Vet. Parasitol.* 71, 209-222.
- Willadsen, P. and Jongejan, F. (1999) Immunology of the tick-host interaction and the control of ticks and tick-borne diseases. *Parasitol. Today* 15, 258-262.
- Zhong, W.M. *et al.* (1997) Therapeutic passive vaccination against chronic lyme disease in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* 94, 12533-12538

**EVALUACION DE LA VACUNA CONTRA LA GARRAPATA Bm86 (Gavac)  
PARA EL CONTROL DE *Boophilus annulatus***

**EVALUATION OF THE TICK VACCINE Bm 86 (Gavac) IN INFESTED CATTLE  
WITH *Boophilus annulatus*.**

H. FRAGOSO SANCHEZ, M. ORTIZ ESTRADA; G. DE LABRA VACA Y A. ORTIZ  
NAJERA.

*Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal, Dirección General de  
Salud Animal, CONASAG, SAGAR., Carretera Cuernavaca-Cuautla Km. 11.5, Jiutepec,  
Morelos. CP 62250, México.*

M. RODRIGUEZ, M. REDONDO y J. DE LA FUENTE.  
*Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología. P.O. Box 6162., Havana, Cuba.*

V. HERNÁNDEZ PEREZ  
*Revetmex S.A. de C.V., Calz de la Viga 1937. Col. Prado Churubusco, D.F. México.*

I. Introducción.....	141
II. Metodología .....	142
A Prueba de establo, infestación artificial.....	142
B. Prueba de campo infestación natural .....	143
III. Resultados .....	143
IV. Discusión .....	144
V. Resumen .....	145
VI. Agradecimientos .....	145
VII. Referencias .....	145
Cuadros 1, 2, 3.....	147

## I. INTRODUCCION

Uno de los principales ectoparásitos en el ganado bovino es la garrapata *Boophilus* spp. la cual se encuentra ampliamente difundida en el mundo en las regiones tropicales y subtropicales y que debido a las graves pérdidas tanto directas como indirectas que ocasiona ha sido motivo de control oficial desde los años 60's (Woodham *et al.*, 1983). Las dos especies presentes en México son *B. microplus* y *annulatus* de las cuales la segunda se

localiza principalmente en los estados del Noreste aunque también es observada en aquellos de la vertiente del pacífico desde Guerrero hasta el Norte de Sinaloa e incluso en escasa proporción en Chihuahua, Baja California Norte y Sur (Solís, 1991)

El control tradicional sobre las garrapatas se ha basado en el uso de acaricidas químicos aplicados sobre el cuerpo del animal a intervalos definidos. Este procedimiento fue de gran utilidad en la Campaña Nacional Contra la Garrapata realizada en México y permitió grandes avances para reducir las infestaciones promedio por animal y las pérdidas económicas (Woodham *et al.*, 1983).

En busca de nuevas alternativas para el control, se desarrolló una vacuna en Australia llamada rBm86 de un antígeno intestinal de *B. microplus* obtenido por medio de la tecnología del DNA recombinante (Willadsen *et al.*, 1991). Siguiendo los mismos procedimientos pero utilizando un diferente vector de expresión se desarrolló en Cuba una vacuna similar con el mismo antígeno. (Rodríguez *et al.*, 1994) Ambas vacunas han demostrado su eficacia en programas de control integral Vacuna-Baño sobre *Boophilus microplus* en Australia, Cuba, Brasil y México (De la Fuente *et al.*, 1995, Willadsen *et al.*, 1995), sin embargo debido a la falta de conocimiento del efecto de la vacuna sobre la garrapata *B. annulatus* y a los buenos resultados observados en campo para el control de infestaciones mixtas se desarrolló por parte del CENAPA de la SAGAR en colaboración con el CEIGB de Cuba dos ensayos, uno de infestación artificial y otro de infestación natural en ganado bovino de razas susceptibles.

## II. METODOLOGIA

### A Prueba de establo, infestación artificial

Se utilizaron seis bovinos angus de primera infestación de 14 meses de edad. Los animales se asignaron aleatoriamente a dos grupos experimentales: vacunados y control. El inmunógeno (rBm86, Gavac<sup>R</sup>) se aplicó al grupo vacunado la 1<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> semana a dosis de 2 ml por vía intramuscular. A cada animal se le colocaron cuatro cámaras de tela en los costados, sitio donde después de la octava semana posterior a la 1<sup>a</sup> vacunación se depositó en cada una de ellas aproximadamente de 1500 a 2000 larvas de 15 a 30 días de edad de *B. annulatus* cepa "quemado" en tres infestaciones (días 1, 2 y 3).

Del día 21 al 35 después de la primera infestación se efectuó la colecta de garrapatas hembras adultas repletas mismas que se contaron, pesaron, separaron por lote e incubaron todos los días a 27 °C y 80 % de humedad relativa. Los huevos ovipositados se separaron de las garrapatas, se pesaron y colocaron de nueva cuenta en incubación. Las larvas nacidas de los huevos se sacrificaron mediante calentamiento a 40°C por 5 horas y se contaron comparando como en los casos anteriores el lote tratado y el lote testigo. Con esos datos se calculó los porcentajes de disminución de la repleción, de la oviposición y de la fertilidad para finalmente estimar la eficacia global de la vacuna (De la Fuente *et al.*, 1995).



Las diferencias entre los grupos se analizaron mediante la prueba de "t" para determinar la significancia estadística.

### B. Prueba de campo infestación natural

El trabajo fue efectuado en un rancho comercial localizado en el municipio de Hidalgo, al norte del estado de Coahuila fronterizo con los E.U.A., para el estudio se utilizaron 20 animales raza Beefmaster de diferentes sexos, todos ellos de entre 14 y 18 meses y peso superior a 250 Kg. Los bovinos se escogieron previa inspección que se efectuó para comprobar que todos tuvieran garrapatas hembras de *B. annulatus* (U.S. Department of health ed. and welfare, 1978) adultas o en proceso de repleción (4 a 7 mm), se efectuó la asignación aleatoria a dos grupos experimentales: vacunado y control. El biológico (rBm86, Gavac<sup>R</sup>) se aplicó al grupo vacunado la 1<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 7<sup>a</sup> y 24<sup>a</sup> semana a dosis de 2 ml por vía intramuscular. Los dos grupos se asignaron a diferentes potreros para su seguimiento postvacunación. La alimentación consistió en pastoreo natural a base de zacate bufell, bermuda, zacates nativos y nopal, la fuente de agua era de embalses naturales y arroyo. La revisión de los animales se realizó con periodicidad mensual durante 7 ocasiones buscando garrapatas hembras adultas semirepletas o repletas. Cuando la infestación de los animales fue de 15 o más garrapatas o bien la infestación por ninfas se encontrara elevada se aplicó un baño de inmersión con el producto que se usaba tradicionalmente en el rancho (permetrina-clorpirifos). Las garrapatas colectadas se trasladaron al laboratorio para calcular los porcentajes de disminución de la repleción, de la oviposición y de la fertilidad; mediante esos porcentajes se determinó la eficacia global del producto (De la Fuente *et al.*, 1995).

## III. RESULTADOS

Los resultados mostraron una alta efectividad de la vacuna en el control de las infestaciones por *B. annulatus* en la prueba de establo (cuadro 1) El mejor efecto del biológico observado fue sobre el número de garrapatas repletas colectadas en los animales por efecto del tratamiento. La colecta total de garrapatas adultas obtenida durante los 14 días en el grupo testigo fue de 3999 mientras que en el vacunado solo fue de 34, lo anterior significó un porcentaje de reducción global en el desprendimiento de garrapatas del 99.14%. Esta observación no se tuvo en los casos de las pruebas de *B. microplus* ya que en ellas la reducción era notablemente menor alcanzando solo 43.13 y 18.83% en dos pruebas realizadas con diferentes cepas. (Fragoso *et al.*, 1995)

El efecto sobre la repleción observado en los 7 días en que se colectaron garrapatas fue favorable a la vacuna en 4 de ellos resultando garrapatas con peso promedio inferior en el grupo tratado los días 10, 11, 12 y 14. Solo en la colecta del día 5 el peso de las garrapatas fue notablemente superior al del grupo testigo. El peso promedio de la masa de huevos en los animales vacunados fue inferior en los 7 días observados. El porcentaje global de

disminución en la oviposición y disminución en la eclosión fue de 85.02 y 85.56% respectivamente. A partir de los datos obtenidos se calculó la eficacia global la cual fue del 99%. Los resultados en los tres animales vacunados fueron consistentes ya que en todos ellos se observó el efecto sobre los diferentes parámetros. Al análisis estadístico mediante una prueba de "t" se demostró diferencias entre el promedio de los tratamientos de las garrapatas colectadas y el promedio de la masa ovipositada ( $p < 0.05$ ).

En la prueba de campo los resultados reflejaron buena eficacia del biológico con mayores conteos de garrapata y mayor número de baños en los animales control, en estos últimos la colecta mensual fue siempre mayor (cuadro 2), sin embargo en las dos últimas visitas no se encontraron garrapatas debido a tratamiento mosquicida aplicado a base de permetrina. La 5ª visita fue en la que mayor infestación se encontró, adicionalmente en la 3ª se observó una elevada infestación de metaninfas.

Los baños aplicados en el grupo control fueron a los 72 días el primero y posteriormente cada 32 días. En el grupo tratado durante los siete meses de prueba se dio un solo baño a los 198 días. Los porcentajes de disminución de la oviposición, eclosión y fertilidad fueron de 62.7, 84.6 y 77.3% respectivamente. La eficacia global fue de 97% (cuadro 3).

#### IV. DISCUSION

La eficacia de la vacuna Bm86 para el control de la garrapata *Boophilus microplus* ha sido ampliamente documentado en diversos artículos y revisiones bibliográficas, sin embargo la mayoría de los estudios ubican al biológico con porcentajes de control cercanos al 60%. Por ello el uso de la vacuna se ha sugerido fundamentalmente como un programa de control utilizándose en compañía de ixodicidas para lograr a mediano plazo una reducción en el número de tratamientos en un periodo determinado. (De la Fuente *et al.*, 1995, Willadsen *et al.*, 1995).

Considerando que la proteína utilizada para la preparación del antígeno fue originalmente aislada de *Boophilus microplus* (Willadsen *et al.*, 1991) era difícil esperar una mejor eficacia con *B. annulatus* sin embargo, la reducción en el número de garrapatas y la alta efectividad global observada en la prueba de establo permitía suponer una respuesta similar en la prueba de campo. Los resultados demostraron una eficacia similar en las dos pruebas, sin embargo la baja infestación en los animales no permitió observar los exitosos resultados esperados. El hecho de haber observado un alto porcentaje global de control en ambas pruebas puede atribuirse entre otras cosas a: 1) una mayor capacidad de alimentación de las larvas de *B. annulatus* resultando en una más rápida ingestión de anticuerpos anti-Bm86 y otros componentes del sistema inmune los cuales provocarían un efecto dramático en el número de garrapatas que completaron su ciclo de vida. 2) un menor contenido de proteasas en la saliva de *B. annulatus*

lo que acarrearía una mayor concentración de anticuerpos funcionales anti-Bm86 que alcanzarían el sitio blanco en el intestino de la garrapata o 3) ambas.( Fragoso *et al.*, 1998)

Los resultados de eficacia similares entre este estudio y una prueba efectuada en Irán con una cepa de ese país (Fragoso *et al.*, 1998) sugieren como con *B. microplus* un alto grado de similitud entre los locus de diferentes aislados de garrapatas *B. annulatus*. Más aún estos resultados de eficacia presentan la similitud entre garrapatas *Boophilus* de diferentes especies.

Estos resultados sugieren la posibilidad de ensayar el efecto de la vacunación con el antígeno Bm86 en el control de infestaciones por garrapatas de otras especies y lograron demostrar la eficacia de la vacuna Bm86 para el control de infestaciones por *B. annulatus*, lo anterior permite aplicar el biológico en el caso de infestaciones mixtas con diferentes especies de *Boophilus*.

## V. RESUMEN

El presente trabajo se realizó con el objetivo de evaluar el efecto de la vacuna Bm 86 de origen cubano (Gavac) aplicada en bovinos para el control de la garrapata *Boophilus annulatus* mediante una infestación artificial en prueba de establo y otra infestación natural en prueba de campo. Se utilizaron 6 animales de raza angus divididos en dos grupos tratado y control en la prueba de establo y 20 en la de campo de raza Beefmaster con los mismos dos grupos. La vacuna fue aplicada el día 1, 28 y 49, adicionalmente en el trabajo de campo se revacunó el sexto mes. En ambos grupos y experimentos se determinaron los porcentajes de disminución de garrapatas adultas, de la repleción, de la oviposición y de la fertilidad. La eficacia global de la vacuna fue de 99.97% en el primer estudio y de 97% en el segundo, se demostró la gran utilidad del biológico para el control de infestaciones por *B. annulatus*.

A stable and field trial were done to evaluate the efficacy of *Boophilus* Bm 86 vaccine from cuba (Gavac<sup>R</sup>) used to control *Boophilus annulatus* infestations in cattle. The stable trial was done with 6 angus breed animals divided in control and vaccinated group, the field trial

## VI. AGRADECIMIENTOS

Se agradece la importante colaboración del personal técnico del Departamento de Ectoparásitos y Dípteros del CENAPA. De la misma forma se agradece la donación de la cepa de *B. annulatus* cepa Quemado por el Laboratorio de Insectos de USDA-ARS en Kerville , Texas.

## VII. REFERENCIAS

- De la Fuente J.; Rodriguez, M.; Fragoso H.; Ortiz M.; Massard C.L.; García O.; García-García J.C.; Leonart, R. Efficacy of vaccination with "Gavac" in the control of *Boophilus microplus* infestations. Recombinant Vaccines for the control of Cattle tick.. 1995. 177-186. Ed. *Elfos, Cientiae*
- Fragoso H.; Ortiz M. Rodriguez M. y De la Fuente J. Evaluation of the efficacy of the recombinant vaccine (Gavac) in cattle artificially infested with *Boophilus microplus* (Can). 1995. 229-237. Ed. *Elfos, Cientiae*
- Fragoso H., Hoshman-Rad P, Ortiz M., Rodriguez M., Redondo M., Herrera L. and De la Fuente J. Protección against *Boophilus annulatus* infestations in cattle vaccinated with the *B. microplus* Bm86-containing vaccine Gavac. *Vaccine* 1998, **16**, 1990-1992.
- Rodriguez, M., Rubiera, R., Penichet, M. Montesino, R., Cremata, J. Falcon, V. Sánchez, G. Bringas, R. Cordovéz, C. Valdéz, M. Leonart, R. Herrera, L and De la Fuente, J. High level expression of the *Boophilus microplus* Bm86 antigen in the yeast *P. Pastoris* forming highly immunogenic particle for cattle. *J. Biotech.* 1994, **33**, 135-146.
- Solís S.S. ,Epidemiología de las garrapatas *Boophilus* spp. y *Amblyomma* spp. en México. *Memorias del II Seminario internacional de Parasitología.* 1991. pp. 19-30.
- U.S. Department of health education and welfare. 1978. Ticks of public health importance and their control. Public Health Service. Center for Disease Control. Bureau of Tropical Diseases.
- Willadsen P.; Bird P.E.; Cobon G.D.; and J. Hungenford J. Commercialization of a recombinant vaccine against *Boophilus microplus*. *Parasitology* 1995; **110**:43-50.
- Willadsen P, McKenna R.V. Vaccination with "concealed" antigens: myth or reality? *Parasite Immunology* 1991; **13**:605-616.
- Woodham, C.B. ; Gonzalez Origel, A. ; López León, A y Güereña Morales, R. Progresos en la erradicación de las garrapatas *Boophilus* en México 1960-80. *Rev. Mun. de Zoot.* **48**: 18-24, 1983.

**Cuadro1. Eficacia de la vacuna Bm86 (Gavac) contra la garrapata B. annulatus, prueba de infestación artificial**

Garr. cepa	Animales	% de Reducción				
		DG	DO	DR	DF	
“Quemado”	6	99.1	85	57.8	85.6	99.98

DG: disminución de garrapatas; DO: disminución de la oviposición; DR: disminución de la repleción; DF: disminución de la fertilidad

**Cuadro2. Conteo mensual de garrapatas B. annulatus prueba de campo, Coahuila, México.**

	1°	2°	*3°	4°	5°	6°	7°
Control	7	9	1	2.4	37.4	0	0
Vacunado	9	1	2	1.8	3	2	0

\*abundantes metaninfas en los animales control

**Cuadro 3. Eficacia de la vacuna Bm86 (Gavac) contra la garrapata B. annulatus, prueba de infestación artificial**

Garr. cepa	Animales	% de Reducción			Eficacia
		DO	DR	DF	

Campo	20	84.6	62.78	77.3	99.98
-------	----	------	-------	------	-------

DG: disminución de garrapatas; DO: disminución de la oviposición; DR: disminución de la repleción;  
DF: disminución de la fertilidad

## **POLITICAS PARA EL CONTROL DE RESISTENCIA A PESTICIDAS EN LA INDUSTRIA PECUARIA: CASO MEXICO.**

### **POLICY FOR THE CONTROL OF PESTICIDE RESISTANCE IN THE CATTLE INDUSTRY: MEXICO CASE.**

**GONZÁLEZ COSSIO A.**

*Bayer de México SA de CV. Miguel Angel de Quevedo 259 C.P. 11520, México, D.F.*

El control de la resistencia a los pesticidas en las explotaciones pecuarias se ha realizado a través del establecimiento de programas en las explotaciones afectadas. Pero es importante considerar el papel que juega las autoridades gubernamentales a través de la ejecución de la normatividad que se establecen para el uso de los pesticidas en el campo así como los programas de prevención a través de la asistencia técnica ofrecida por el estado, así como los programas de investigación establecidos en esta temática. Otro organismo importante es la industria productora de los pesticidas, los cuales ofrecen a su clientes la solución a su problemática en situaciones del campo y son retribuidos con una ganancia económica, y que son regulados por las normas del estado. Por último los productores que a través de sus organizaciones se promueve el uso de los pesticidas para mejorar las condiciones de producción y productividad de sus agremiados.

Como observamos todos estos organismos juegan un papel importante en el éxito o fracaso de la correcta utilización de los pesticidas en el campo y determinan el tiempo de efectividad de los productos en el país.

Conscientes de esta problemática en México se ha iniciado un programa para coadyuvar a la mejor utilización de los productos pesticidas por los organismos interesados, que son : Estado a través de la SAGAR, Industria Farmacéutica, INFARVET y Productores Confederación Nacional Ganadera cuyo objetivo es asesorar sobre los lineamientos que intervienen en la normatividad, comercialización ética, y asesoramiento técnico a los productores pecuarios para el mejoramiento del uso adecuado de los pesticidas utilizados en la industria pecuaria.

En 1995 se estableció el Comité Nacional de Ixodidas con la participación de las siguientes instituciones: Dirección General de Salud Animal (normativa) en la que participa la Dirección de Constatación y Departamento de la Campana Contra la Garrapata, Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias y Forestales (investigación) Centro nacional de Investigaciones Disciplinarias en Parasitología Veterinaria, Cámara Nacional de la Industria Farmacéutica Sección Veterinaria (INFARVET) (Producción y comercialización) con la

participación de 10 empresas productoras de ixodicidas y la Confederación Nacional Ganadera (Productores Pecuarios).

Los resultados obtenidos hasta Octubre de 1999 son:

- A. Capacitación: se realiza con la participación de la industria y el sector oficial con pláticas y cursos a profesionistas y productores. No de cursos 50?
- B. Revisión de Normas de la Campana Nacional contra la Garrapata.
- C. Participación anual en el Consejo Nacional de Salud Animal.
- D. Elaboración de Boletín Informativo trimestral sobre uso y problemas de los pesticidas.
- E. Participación económica y técnica en los monitoreos de resistencia en garrapatas B. microplus a nivel nacional, coordinados por el gobierno.
- F. Elaboración del uso folletos actualizados sobre el correcto uso de los ixodicidas.
- G. Participación en seminarios internacionales sobre resistencia en garrapatas y moscas con objeto de actualizar a los técnicos y conocer los avances científico y tecnológicos en el mundo.

Los resultados cuantitativos han sido satisfactorios pero es necesario hacer una evaluación cualitativa con objeto de medir el real impacto que estas acciones tienen a nivel de campo, para solucionar el problema. Se ha estimado que se ha hecho consciencia entre los productores tecnificados del problema de la resistencia así como en los profesionales que atienden a los productores, pero debido al tamaño del país ha sido difícil cubrir todo el territorio y es necesario hacer un mayor esfuerzo para establecer una mejor coordinación entre los diversos organismos federales, estatales, industria y productores.

La participación en los monitoreos de la resistencia ha permitido conocer con mayor precisión la frecuencia y distribución de la resistencia así como las “nuevas” apariciones de resistencia cuando un nuevo producto ha sido introducido en el mercado nacional. Para el mejoramiento de este comité es importante una mayor participación crítica constructiva sobre la normatividad de la Campana Contra la Garrapata que merece un mayor apoyo por parte del estado con objeto de mejorar el control de la garrapata B. microplus en el país.



**FUNDAMENTO Y MANEJO PARA RETARDAR LA RESISTENCIA DE *Boophilus microplus* Y *Haematobia irritans* EN EL CONTINENTE AMERICANO.**

**FUNDAMENT AND MANAGEMENT FOR RETARD RESISTANT OF *Boophilus microplus* AND *Haematobia irritans* IN AMERICAN CONTINENT.**

CARLOS O. CORDOVÉS.

*Bolsista CNPq.*

*Empresa Productos Veterinários Ouro Fino.*

*Rua- Marechal de Moraes, 200, Lagoinha.CEP. 14095-120. Ribeirão Preto.S.P.Brasil.*

*E-mail: ourofinovet@ourofinovet.com.br*

I.	Introducción y/o Fundamento.....	151
II.	Conceptos y Definiciones.....	153
III.	Desarrollo o Evolución de la Resistencia.....	154
IV.	Consecuencias Principales de la Resistencia.....	158
V.	Manejo de la Resistencia.....	159
VI.	Estratégias Prácticas de Manejo para Retardar la Resistencia.....	162
	Tabla 1.....	164
	Tabla 2.....	165
	Tabla 3, 4 .....	166
VII.	Resumen.....	167
VIII.	Literatura Consultada.....	167

**I. INTRODUCCIÓN Y/O FUNDAMENTO**

La resistencia a plaguicidas es una consecuencia inevitable del uso intensivo de plaguicidas en el control de una población entomológica.

Desde hace algunos años venimos estudiando en Cuba y en Brasil los puntos esenciales del problema resistencia de parásitos dentro de las características del manejo de bovinos. Dicho enfoque tuvo implícito, la necesidad del diagnóstico y registro adecuado de la resistencia, así como utilización de medidas de manejo que completan la actividad de los ectoparasitoides dentro de la Estación experimental de Parasitología de Cuba, Laboratorio de Parasitología del Centro de investigaciones Veterinárias, Desiderio Finamor, El Dorado

do Sul/RS.Brasil, así como en las granjas bovinas del municipio Alegrete/RS las cuales algunas presentan la mayor gravedad de quimiorresistencia de garrapatas en el Brasil.

Para el productor primario o usuario, resistencia significa pérdida parcial o total del control de parásitos internos o externos. Independientemente de los fenómenos de tipo ambiental, genéticos y de manejo que generalmente no son considerados integralmente por los productores primarios y algunos profesionales.

Como sabemos la resistencia no evoluciona en la misma velocidad en todos los organismos que se someten a presión de selección, en algunos puede desarrollarse rápida o lentamente o no desarrollarse en otras especies. Dentro de la misma especie se desarrolla más rápidamente en dependencia al tipo de población. Muchos factores de la categoría genética no están bajo control del hombre, por lo que la importancia de algunos de ellos no se puede determinar hasta que la resistencia se haya expresado. Solo una vez que ocurre, podemos obtener alguna idea acerca de la frecuencia inicial de alelos que confiere resistencia. Tampoco es posible medir la dominancia hasta que no aislemos alelos y efectuemos cruzamientos apropiados.

Sin embargo otros factores que influyen en la evolución de la resistencia, se encuentran bajo el control humano, especialmente los que están relacionados al tiempo, dosis de aplicaciones y formulación de los insecticidas.(Factores operacionales).

El problema consiste en identificar y determinar la mejor forma de manipular la resistencia dentro del contexto de las restricciones Genéticas y Biológicas/Ecológicas existentes, con el objetivo de retardar su evolución.

El abuso sistemático del uso de insecticidas, a veces no intencional, constituye parte de los graves problemas que el ser humano tiene actualmente y tendrá con su medio ambiente.

Debido a que la resistencia a insecticidas se ha vuelto un problema serio en los últimos años, se tiene muy claro que tan solo cambiar a un insecticida cuando el que se usa es ineficiente, no es la decisión más adecuada. El "manejo integrado", el cual casi siempre involucra algún uso de plaguicida, es actualmente considerado como una estrategia esencial. El reconocimiento y la manipulación de los factores que pueden retrasar la evolución de la resistencia debe ser una parte integral de dichos programas.

Se destaca que la persistencia ambiental de pesticidas y las malas prácticas de aplicación son factores que incrementan los genes resistentes en la población.

Dado que los casos de resistencia van en aumento y la cantidad de insecticidas y acariciadas en el mercado decrecen, es oportuno e inteligente señalar de que el combate químico como se practica en la actualidad, no es sustentable, en esta era de la resistencia a los insecticidas y acariciadas. Por tal razón es menester conocer mejor los detalles de la quimiorresistencia para así manejarla mejor eventualmente. No debemos olvidar de que la correcta o incorrecta aplicación de insecticidas es sin duda alguna un evento catastrófico para la población de insectos.Las aplicaciones por aspersiones o fumigaciones, inmersiones Pour-on inyecciones calendarizadas a intervalos frecuentes y en el peor de los casos Bolos de liberación continua en rumiantes e aplicaciones de formulaciones sistematicas con alta

**persistencia en el organismo, provocan un efecto profundo en la composición genética de la población.**

**Este trabajo resume en parte, investigaciones, criterios, y recomendaciones actuales que han aportado especialistas para distintas especies de parásitos, garrapatas y mosca de importación veterinaria, plagas vegetal y de salud pública, e intenta integrar un enfoque global sobre el problema de resistencia dentro de los conocimientos actuales disponibles con un mayor énfasis en ectoparásitos de interés médico veterinario con el objetivo de retardar la resistencia de *Boophilus microplus* y *Haematobia irritans* en nuestro continente.**

## II. CONCEPTOS Y DEFINICIONES

**Abuso de pesticidas :** Consiste en la aplicación de un pesticida sin el correspondiente cumplimiento de la dosis y requisitos recomendados por el laboratorio productor. Por otra parte el abuso también implica prácticas incorrectas tales como formulaciones caseras, a través de pecuarista, agricultor o persona lega.

**Adulticida :** Sustancia química que selectivamente provoca muertes en el estadio adulto del ciclo parasitario.

**Ecosistema :** Es un sistema formado por la interacción de una comunidad de organismos o individuos con su medio.

**Larvicida :** Sustancia química que actúa matando larvas de parásitos mediante diferentes mecanismos de acción.

**Manejo integrado de plagas :** Es el sistema por el cual se logra reducir significativamente una población en este caso de ectoparásitos con un nivel de completo control, este combate químico tiene que ser parte integral de un conjunto de acciones y prácticas preventivas correctivas del medio ambiente incluyendo la introducción de controles biológicos y biotecnológicos, razas de cruzamientos resistentes etc.

**Manejo de la resistencia :** Es la contención de la frecuencia de genes de resistencia abajo de un límite aceptable. Estos se puede lograr al escoger estratégicamente al insecticida, dosis, el modo de aplicación, y frecuencia de uso. El conocimiento que se requiere para diseñar estrategias de la resistencia son de dos tipos : el primero refiere a los mecanismos de resistencia en cada individuo, y el segundo, a la dinámica de la resistencia en poblaciones.

**Migración :** Movimientos de individuos de una población para otra, pudiendo alterar las frecuencias alélicas de la nueva población.

**Nivel de daño económico :** Es la menor densidad de población de una plaga o agente etiológico que podría causar daño económico. En este caso esta menor densidad de población conlleva a que el costo y el beneficio de la actividad operacional sean iguales.

**Resistencia :** Oposición a la acción de una fuerza. Acción de los microorganismos ectoparásitos u otro agente biológico frente a sustancias químicas mediante la producción de enzimas inhibidoras o detoxificadoras etc.

**Residuo** : Constituido por la cantidad de compuestos, radicales o elemento químico de forma libre o no en los tejidos - animal, vegetal o humano.

**Resistencia Colateral** : Se plantea cuando la resistencia a un producto es el resultado de la selección de otro producto con el mismo modo de acción.

**Resistencia Múltiple** : Se define cuando la resistencia es el resultado de la selección de otra droga con modos de acción diferentes.

**Resistencia Cruzada** : Se presenta en dos o más productos de igual química con el mismo mecanismo de acción.

**Reversión de resistencia** : Consiste en la disminución de los individuos resistentes dentro de una población a la que se há evitado presionar con el agente causal de su selección.

**Resistencia estable** : Permanente, que no se elimina fácilmente, duradera.

**Resistencia inestable** : Que se elimina, se controla y regresa con el tiempo.

**Resistencia a insecticidas, acaricidas y antihelmínticos** : Tiene un origen genético-bioquímico y definida como un aumento significativo de los individuos de una población de parásitos capaces de tolerar dosis de droga(s) que han probado ser letales para la mayoría de individuos de la misma especie, existiendo grados o matices que aveces no son fácilmente detectables en condiciones de campo.

**Umbral económico** : Es la densidad de población de una plaga o agente etiológico, a la cual las medidas de control, deberian aplicarse, para prevenir que su incremento alcance el nivel de daño económico considerable.

### III. DESARROLLO O EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA

Georghiou 1986, senaló que mientras la presencia de la resistencia fue un fenómeno raro durante la mitad de la decada del 50, es la población susceptible la que es rara durante la decada del 80, continuando escasa en la última decada del siglo XX esta población susceptible; Cordovés 1998 en trabajos desarrollados en Brasil desde 1996 hasta entonces en mas de 105 cepas de campo testada, no encontró cepas de garrapatas con 100% de sensibilidad frente a los acaricidas clasicos (OF, Carbamatos, Amidinas, Piretroides) lo que indica la disminución gradual de genes sensibles en la garrapata *Boophilus microplus* presente en granjas de Rio Grande do Sul, Minas Gerais y Valle de Paraiba (São Paulo), estados pertenecientes al Brasil.

La aparición de resistencia constituye el precio que se tiene que pagar por la utilización de químicos, es en realidad un fenómeno complejo donde la ecología parasitaria y el manejo juegan un papel importante.

Dentro del cualquier ecosistema integrado por parásitos, existen dos sub-poblaciones Nari y Cardoso 1987. Una de ellas se encuentra desarrollando su fase parasitaria, la otra es la que se mantiene en estado libre. Ambas Sub-poblaciones son interdependientes y conectadas a través de tasas de contaminación y de traslación hacia el rebaño.

La sub-población de estadios libres (huevo, larvas, pupas etc.) no son directamente afectada por la aplicación de insecticidas, acaricidas o antihelmínticos, por lo cual se dice que se encuentra en “refugio”.( Waller, 1985 ). Esto ocurre siempre independientemente de la composición genotípica de la sub-población y de que existan, al comienzo, individuos en muy baja frecuencia capaces de resistir niveles más altos del químico (etapa de establecimiento).

Muchos individuos en estado libre, pueden perderse como consecuencia de condiciones ambientales (rayos solares, calor, déficit de humedad), depredadores o simplemente porque no tuvieron éxito con el huésped.(Bovino etc).Una vez en el animal, los individuos quimiorresistentes estarán también sujetos a pérdidas provocadas por las defensas inmunitarias del propio huésped o por la barrera impuesta por huéspedes inespecíficos. Finalmente sólo aquellos, individuos que han sido presionados con químicos y que hayan desarrollado exitosamente su fase parasitaria, tendrán relevancia epizootológica. De esta manera produzcan nuevas generaciones que incrementan la frecuencia de individuos resistentes (etapa de desarrollo).

Es muy importante considerar la resistencia como un fenómeno de población más que de individuos, dentro de la población de individuos resistentes, pueden encontrarse individuos sensibles. Esto significa que, cuando la población en “refugio” es pequeña, el uso de químicos puede conllevar a una rápida selección de resistencia y al contrario, cuando la población en “refugio” es grande, la selección para resistencia es menor de manera que los individuos susceptibles producirán un mayor efecto de dilución.

Para comprender, las implicaciones prácticas que tiene el tamaño de una sub-población en refugio, debemos conocer que :

- (a) Una gran sub-población, permite mayor probabilidad de aumentar la tasa de mutación de genes de resistencia. Su gran tamaño también puede dilatar la emergencia del fenómeno (efecto de dilución).
- (b) Una Sub-población pequeña, reduce la probabilidad de producir mutaciones genéticas o de encontrar genes ya existentes determinantes de resistencia, siempre que su origen no sea consecuencia de la aplicación sistemática de químicos. El pequeño tamaño aumentará la presión de selección para resistencia, cada vez que se incremente la población de químicos.

El tipo de evolución genética que sigue a la quimiorresistencia indican que, para un número importante de drogas, el tipo sería poligénico y para otro monogénico, en el caso de ser poligénico, la evolución es más gradual y lenta mientras que de ser determinada por un solo gen la selección es brusca y de aparición más rápida. La situación relativa de las dos subpoblaciones dentro y fuera de los animales también es importante. Ambas Sub-poblaciones son dinámicas y varían cuali y cuantitativamente en sucesivas estaciones y

años. Incrementar en ambas sub-poblaciones, de forma que el empleo de químicos se haga grandemente ineficiente.(etapa de emergencia).

Estudios para determinar si las diferentes quimiorresistencias desarrolladas por ectoparásitos o parásitos en general frente a la presión química es mono o poligénica es actual, debido a la variedad de drogas existentes.

La emergencia de la resistencia a químicos, no solo depende de la población de individuos sobrevivientes a los tratamientos, sino también al tamaño y composición de las poblaciones en refugio.(susceptibles).

La frecuencia de tratamientos químicos está ampliamente demostrada. Esto no significa que las dosificaciones induzcan mutaciones sino que su acción repetida en el tiempo, facilita la sobrevivencia de individuos resistentes o el incremento del factor de resistencia.

Es importante conocer que, debido a las propias características de las poblaciones de parásitos en refugio, es prácticamente imposible tener la certeza de que se ha erradicado determinada cepa resistente. Como consecuencia práctica de esta situación, si bien podemos esperar reversión (o reversión negativa) no tendremos certeza de que si utilizamos nuevamente la droga problema no tendremos nuevamente resistencia (incluso a una tasa de desarrollo superior).

Los conocimientos actuales sobre la evolución y dinámica de resistencia a químicos, indica que el camino menos riesgoso para la prevención y control, lo constituye el empleo de métodos integrados de control (manejo, drogas de diferentes moderación, control biológico etc.) basados en la situación epizootiologica de cada granja, propiedad, región o país.

La resistencia de artrópodos es un fenómeno que tiene bases genéticas, por lo tanto la búsqueda de soluciones al problema de la resistencia a insecticidas y acaricidas, debe ser a través de criterios dentro de la genética poblacional.

Si partimos del criterio que la resistencia sea monofactorial, o sea, que está ligada a un sólo gen (Conway & Comins, 1979), pueden existir tres tipos de combinación genética en una población :

1. Homocigotos susceptibles (SS). Presentes muy frecuentemente en aquellas poblaciones donde no existe historia de aplicación del producto químico.
2. Heterocigotos susceptibles-resistentes (SR). Precisa conocerse si el gen resistente es dominante o no. La resistencia sería totalmente dominante si el grado de resistencia del híbrido fuera igual a la resistencia del homocigoto resistente, y es totalmente recesiva, si el nivel de susceptibilidad del híbrido es igual al del homocigoto susceptible (Stone, 1972).Se acepta que ocurre resistencia incompleta, cuando el heterocigoto presenta una resistencia intermedia.

La frecuencia de individuos resistentes se incrementa de manera progresiva y el insecticida en ocasiones pierde su efectividad biológica, por eso es necesario comprender de que el "Abuso" es el uso o tratamiento inadecuado, y que los genes de susceptibilidad constituyen un recurso que debemos conservar, de lo contrario en nuestro universo, la "era de la resistencia a los insecticidas y acaricidas" será gravemente inevitable.

A diferencia de la evolución de los caracteres morfológicos, los cuales requieren quizás miles de años de selección, la resistencia a insecticidas y acaricidas evoluciona en forma relativamente rápida y constituye primeramente un fenómeno bioquímico-genético. Se basa en la selección de genes que codifican enzimas involucradas en el metabolismo de insecticidas, o bien que confieren insensibilidad a ellos.

El grado de resistencia puede ser extremadamente alto, un insecto es capaz de sobrevivir a una dosis alta. El tiempo de selección que se requiere para el desarrollo de la resistencia es variable por ejemplo, este puede durar en garrapatas de 7-10 generaciones mientras que en moscas son de 15-20 o más generaciones, dependiendo de la naturaleza química del insecticida, grado de presión de selección que se aplica, así como condiciones del ecosistema. Desde el punto de vista evolutivo se trata de un tiempo relativamente corto. Esta microevolución acelerada implica costos adicionales para el insecto, la síntesis de una gran cantidad de enzimas detoxificantes, se produce a costa de otros caracteres importantes asociados con la capacidad biótica del insecto, tales como:

- (a) Tasa de crecimiento
- (b) Maduración
- (c) Longevidad
- (d) Reproducción

En un programa de control debe tenerse muy bien en cuenta la especie que se quiere controlar, y además las otras existentes en el ecosistema que tenga relación, Ejemplos: *Boophilus microplus*; *Amblyomma cajennense*; *Haematobia irritans*; *Dermatobia hominis*; *Stomoxys calcitrans*; *Cochliomyia hominivorax*, etc, de lo contrario se controla una y se sub-dosifican otras especies creandose nuevos y serios problemas.

La subdosificación condiciona la supervivencia de heterocigotos resistentes, por lo que el uso intensivo y desmedido de estas aplicaciones disminuye individuos susceptibles, incrementandose los genes resistentes, de igual manera la alta residualidad y persistencia, (características investigadas y deseadas por algunos laboratorios), facilita también la proliferación de los genes resistentes. Los insecticidas y acaricidas con capacidad de producir depósitos residuales, seleccionan fácilmente con rapidez, resistencia a dicho producto (Wood 1981, De Nholm y Rowland 1992). En raras ocasiones la resistencia se ha asociado al uso de insecticidas no residuales.

El empleo incorrecto de los productos insecticidas y acaricidas en el manejo de baños, fumigaciones, favorecen la producción y la manifestación sintomatológica de alelos resistentes en la población, apesar de no ser el origen de la quimiorresistencia.

La resistencia a insecticidas no se presenta exclusivamente en los insectos, ocurre tambien relativamente en organismos simples como bacterias, virus, también en vertebrados y plantas. Este fenómeno involucra a Antibióticos, Coccidiostáticos, Antimaláricos, Tripanocidas, Antiparasitarios Internos, Fungicidas, Rodenticidas, herbicidas, etc. Es evidente que mientras la capacidad para desarrollar resistencia es universal, aquellas sustancias químicas que aplicamos como insecticidas han ido mas allá de interaccionar con los insectos y han provocado el desarrollo de resistencia practicamente en todos los tipos de organismos, desde los virus hasta los mamíferos.

Desde el primer caso de resistencia que se detecto en la Escama de San José, en 1905 donde estuvo involucrado el sulfuro de calcio ( Melander,1914) el número de especies resistentes se incremento grandemente hasta 12 a comienzo de la decada del 40, posteriormente exhibió crecimiento exponencial hasta nuestros dias.

#### IV. CONSECUENCIAS PRINCIPALES DE LA RESISTENCIA

1. Crea un serio problema en el control de vectores que transmiten agentes patógenos productores de graves enfermedades de la salud pública asi como en cualquier tipo de producción Agrícola y Pecuaria.
2. Deteriora la eficacia de productos.
3. Abandono de la producción pecuaria y de cultivos por la carencia de insecticidas alternativos eficientes, así como escasez de conocimiento técnico para retardarla
4. Incremento en los costos del combate, debido a aplicaciones mas frecuentes (mayor consumo) y a la necesidad de cambiar insecticidas alternativos mas caros.
5. Incremento en los costos de la investigación tendientes a desarrollar un plagucida nuevo (10-20 millones de dólares) y demora entre 5-7 años para su registro y comercialización.
6. El usuario ( productor primario ) es quien paga todas las consecuencias negativas de los costos de producción asociados a la resistencia, sin que tengamos en cuenta la residualidad en los productos de origen animal que consumimos y que son dañinos para la salud humana.( Resíduos )
7. Incremento de la incidencia de miasis (*Cochliomyia hominivorax*) en zonas endémicas y principalmente en épocas de alta estacionalidad de mosca en explotaciones bovinas.



8. Incremento del número de bovinos muertos y grande disminución en la producción de carne y leche motivado por las constantes graves infestaciones de garrapatas, derivandose como consecuencia profundos daños en los cueros.
9. Disminución en la presentación de enfermedades hemoparasitarias en bovinos debido a la intensa transmisión de *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale* en bovinos con la consecuente inmunidad no estéril, adquirida naturalmente.
10. Eliminación de insectos benéficos
11. Surgimientos de especies de plagas que tienen a su favor tasa reproductiva mas alta, una habilidad natural para metabolizar insecticidas de manera mas eficientes. Sin embargo es la resistencia a insecticidas y acaricidas la que tendrá mayor atención, debido a su obvio impacto desfavorable sobre la producción agrícola, pecuária y salud publica.
12. Dificulta el mercado internacional. ( Residuos - LMR )
13. Caída de rendimiento y productividad a mediano y largo plazo.

En el Brasil se estima que las pérdidas producidas por garrapatas anualmente estan en el orden de 1000 millones de reales Horn (1983). Sin embargo se considera que mas del 20% de los garrapaticidas son empleados debido a altos grados de infestación en los bovinos por altos factores de resistencia presentes en las cepas de garrapatas y altas infestaciones de *Haematobia irritans* en el pico de su dinámica poblacional (Enero-Febrero) o (Abril-Mayo).

En virtud de la gravedad creciente del problema de la resistencia, estamos obligados a tomar en cuenta las tácticas y estrategias que retarden o prevengan para que éste fenómeno no alcance límites alarmantes.

En Brasil en 1995 y 1997 se introdujeron comercialmente, Akatac (Fluazuron) y Topline (Fenilpirazole) respectivamente, en especial para el control de garrapatas (*Boophilus microplus*) quimiorresistente, el costo de estas nuevas moléculas de formulación Pour-On es elevado, recientemente (1999) se comenzó a comercializar una formulación de Ivermectina con dosis de 600mc/Kg, es decir, tres veces superior a la dosis de todas las Ivermectinas inyectables existentes en el mercado Brasileiro. Esta formulación tiene como principal características el tiempo de persistencia en el organismo animal.

## V. MANEJO DE LA RESISTENCIA

El manejo de la resistencia es un procedimiento técnico en el cual se aplica los diferentes métodos químicos y no químicos después de un diagnóstico preferentemente laboratorial, teniendo en cuenta sistemas de explotación, razas, condiciones del ecosistema para retardar resistencia de los ectoparasitos mediante el concepto de preservar los genes de susceptibilidad o eliminar los de resistencia.

El manejo de la resistencia sugun Georghiou 1983, presenta tres categorias

1. Manejo por moderación
2. Manejo por saturación
3. Manejo por ataque múltiple

#### 1.- Manejo por moderación :

En el manejo por moderación se reconoce que los genes de susceptibilidad son un recurso valioso, por lo que es importante conservarlos mediante el uso de dosis que no maten a todos los individuos susceptibles. Otras medidas dentro de este sistema es el uso de plaguicidas poco persistentes, aplicaciones poco frecuentes, preservaciones de refugios de insectos susceptibles o preservaciones de áreas o grupos de animales sin tratar, empleando más adulticidas que larvicidas. Las medidas del manejo por moderación son extremadamente conservadoras y deben completarse con medidas importantes de combate no químico tales como uso de ganado resistente, variedades resistentes, control de la época de plantación y cosecha.

Mientras que el manejo por moderación está muy cerca de satisfacer los estándares ambientales y es menos destructivo a los agentes de control biológico, este pudiera no ser el más adecuado cuando se trata de proteger animales o cultivos altamente afectados o en aquellos casos que se quiera erradicar insectos ( artrópodos) de forma rápida recientemente introducidos en una región o país . En éste último caso, el manejo por saturación o ataque múltiple podrían ser más adecuado.

El uso de vacunas anti-garrapatas GAVAC, TICK GARD, TICK GARD PLUS así como biopesticidas elaborados con hongos *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, pueden jugar un papel importante en esta categoría de manejo.

#### 2.- Manejo por saturación :

El término saturación no implica la saturación del medio ambiente con plaguicidas; mas bien quiere decir la saturación de los mecanismos de defensa del insecto con dosis suficientemente altas como para vencer la resistencia. Este enfoque es importante cuando los genes de resistencia son raros, y de existir se encuentran en estado heterocigotico, Ej; durante los primeros estadios de la selección con el garrapaticida o mosquicida.

El manejo por moderación podría ser adecuado en un ambiente forestal. El manejo por saturación sería factible en invernaderos, graneros, o en aspersiones mezcladas con atrayentes, también en sistemas de explotación intensiva.

Las formulaciones que pueden liberar dosis altas en los organismos plaga son los microencapsulados, los atrayentes como los que se usan en el control de la mosca tsetse} (*Glossina ssp*) {Diptera: Glossinidae}; las cuales provocan que el insecto adquiera una dosis de insecticida que es letal para los heterocigotos.

Otras maneras de suprimir las defensas de los insectos consiste en usar sinergistas. El Butóxido de piperonilo (PB) se ha usado por muchos años como sinergista de las piretrinas en atomizadores caseros, y más recientemente en piretroides para el control de plagas agrícolas. Así como en las primeras formulaciones desarrolladas en la década del 80 contra garrapatas y mosca de los cuernos. El butóxido de piperonilo suprime el sistema de oxidasas de función mixta en cual está involucrado el metabolismo de los piretroides. El PB elimina de manera eficiente las ventajas selectivas de este mecanismo de resistencia. Dicho enfoque no puede usarse cuando existan rutas de desintoxicación alternas, {e.g. cuando el mecanismo de resistencia a piretroides conocido como resistencia al derribo (kdr) esté presente (Ranasinghe y Georghiou 1979).

### **3.- Manejo por ataque múltiple :**

Este manejo por ataque múltiple es la premisa de que el control se puede alcanzar mediante la acción de varios factores que actúan de manera independientes, incluyendo a los insecticidas donde cada uno ejerce una presión de selección que está bajo del nivel que puede conllevar al desarrollo de la resistencia. En un sentido amplio este enfoque incluye la aplicación de insecticidas o acaricidas en mezclas o en rotaciones. Georghiou 1983, 1990, Roush y Mc Kenzie 1987, Tabashnik 1989. En el uso de mezclas se asume que los mecanismos de resistencia a cada plaguicida, existen inicialmente en frecuencia tan baja que no ocurren junto en ningún individuo en particular dentro de la población. Por lo tanto el insecto que sobrevive a uno de los insecticidas de la mezcla, es eliminado por el otro insecticida. El uso de pesticidas en rotación se basa en el conocimiento de que los individuos resistentes, tienen en la mayoría de los casos una capacidad biótica mas baja que los individuos susceptibles, por lo que su frecuencia tiende a decrecer cuando se usa grupo químico alterno.

**Mezclas de pesticidas :** Se ha comprobado que subpoblaciones que se seleccionan con un solo compuesto, desarrollaron resistencia a dicho compuesto pero no a las demás. Uso secuencial de insecticidas demuestran que la resistencia a OF y Piretroides pudo ser inhibida cuando cuales quieran de estos compuestos se usaron en secuencia.

El uso de insecticidas en rotación o en secuencia descansa en la premisa de que la frecuencia de individuos resistentes baja durante las generaciones de la plaga en que el pesticida en cuestión deja de usarse. Por lo tanto, la eficiencia del uso de pesticidas en forma alternada o en secuencia debe determinarse por la reducción en el nivel de resistencia que ocurre cuando un pesticida deja de usarse. Los estudios realizados a nivel de laboratorios sobre el manejo directo de la resistencia mediante el uso de mezclas, rotaciones y uso secuencial de insecticidas, revela la complejidad de éste fenómeno.

Existen buenas razones para pensar que se pueden desarrollar prácticas de combates químicos que sean sostenibles, a pesar de la fuerte posibilidad de la resistencia que es evidente en poblaciones de parásitos.

Desde 1996 hemos establecido en el Brasil éste criterio de ataque múltiple, con resultados promisorios, también de incorporar el empleo de Avermectinas inyectables en aquellos momentos cuando ocurren super infestación de garrapatas, en los picos de la dinámica poblacional o cuando coincide graves lluvias con altas infestaciones en el ganado.

La posibilidad de usar los insecticidas y acaricidas en rotación, mezcla o en secuencia para el manejo de la resistencia no se ha examinado profundamente. El uso de esta práctica en diferentes especies de insectos a conllevado a conclusiones divergentes. Es obvio que el éxito de cada enfoque dependerá de muchos factores, por ejemplo en el uso debe tomar en cuenta su modo de acción, los mecanismos potenciales de resistencia que seleccionan, antes de exponer la población objetivo a la presión de selección, y a la presencia de diferencias significativas en capacidad biótica entre individuos susceptibles y resistentes, así como otros.

El éxito de los principios y las prácticas para el manejo de la resistencia según Georghiou (1983), depende de un profundo conocimiento que se tenga de los mecanismos y dinámica de la resistencia en poblaciones naturales. Entonces el objetivo primordial e importancia del manejo de la resistencia de no existir condiciones para la erradicación, consiste en mantener el nivel de susceptibilidad de la plaga dentro de los límites umbral económico, que permita el uso continuo de plaguicidas.

El grado de resistencia a cada plaguicida, y el número de generaciones que se necesita para desarrollarla, muestra diferencias considerables. La resistencia se desarrolla muy rápidamente y en un nivel más alto hacia el piretroide (permetrina) y más lentamente y a un nivel más bajo hacia el complejo de toxinas que produce la bacteria *Bacillus thuringiensis israelensis*. Estas toxinas y otros productos similares derivados de organismos que son patógenos a insectos, son muy prometedores debido a su origen natural, más importante aun, debido a que es posible mejorarlos mediante técnicas Biomoleculares e Ingeniería Genética, de aquí las numerosas investigaciones que se realizan en muchas universidades y centros científicos a nivel mundial.

Para el manejo de la resistencia es necesario disponer de un procedimiento práctico para detectar la presencia de cada mecanismo de resistencia en un individuo en particular. De esta forma la frecuencia de la resistencia en una población dada se pudiera inspeccionar, por lo que sería posible evaluar la efectividad de determinada estrategia de manejo de la resistencia.

## VI. ESTRATEGIAS PRACTICAS DE MANEJO PARA RETARDAR LA RESISTENCIA.

Desde las últimas dos décadas numerosos investigadores han resumido sobre los enfoques o criterios para manejar la quimiorresistencia en la sanidad animal, vegetal e

**higienico ambiental, agrupandolos en tres categorías ya descritas anteriormente: Manejo por moderación, Manejo por saturación, y Manejo por ataque múltiple.**

Las principales estrategias que asumimos a continuación estan basadas en trabajos de Wood (1971-1981) Metcalf 1975 (1989), Georghiou y Taylor (1977), Sutherst y Comins (1979), Georghiou (1983,1990), Ford et al (1987), Tabashnir (1989), Denholm y Rowland (1992), Me gaughey y Whalon (1992), Curtis et al 1993), Forrester et al (1993), Thullner (1997) y otros.

1.- Comprobar que el acaricida se aplica correctamente (concentración, volumen requerido por animal, o área afectada por la plaga, revisar el uso correcto de implementos adecuados),comprobar parámetros fisico-químico de los productos.

2.- Evaluar en un laboratorio competente garrapatas, moscas, parásitos, insectos plagas para determinar grado de susceptibilidad a diferentes grupos de productos o principio activo.

3.- Posterior de un analisis técnico profesional sobre los puntos 1 y 2 establecer varias alternativas; manejo por moderación, saturación y ataque multiples, uso de métodos no químicos de control (Vacunas, biopesticidas, razas resistentes, rotación de pastos, cultivos).

4.- Las recomendaciones para un uso racional de insecticidas han sido planteadas hace más de 100 años, todavia algunas válidas (Woodworth, 1890); estas son (a) utilice insecticidas úicamente cuando sean necesarios; (b) aplique productos a una concentración efectiva;

Trate luego de realizar una cuidadosa evaluación; y (d) trate de obtener un cubrimiento efectivo en la población objeto.

5.- Incrementar la supervivencia de los homocigotos susceptibles. Puede lograrse mediante la reducción tiempo de exposición de los acaricidas y alargando la frecuencia de aplicación.

6.- Reducir el vigor y la aptitud competitiva de individuos resistentes. Esto se alcanza disminuyendo las ventajas de genes de resistencia; en muchos casos la resistencia un problema multifactorial con la coexistencia de mecanismos y patrones de resistencia cruzada, que protegen a los organismos contra los insecticidas y acaricidas de igual o diferentes clases(Denholm & Rowland, 1992).

7.- Trate solo cuando las plagas alcancen el umbral económico.

8.- Use plaguicidas en dosis mínimas efectivas.

9.- Deje algunas generaciones sin seleccionar.

10.- Evite uso de formulaciones de alta persistencia.

- 11.- Cuando un plaguicida deje de ser efectivo, no aumente la dosis ni el número de aplicaciones.
- 12.- Posteriormente alterne plaguicidas que presenten resistencia cruzada negativa entre ellos.
- 13.- Recorra al uso de la mayor cantidad de medidas no químicas de combate de plagas.
- 14.- Use solo plaguicidas (Formulaciones autorizadas).
- 15.- Evalúe la efectividad biológica de los plaguicidas autorizados sistemáticamente.
- 16.- Inicie las aplicaciones con los plaguicidas que menos afecten los agentes de control.
- 17.- Continúe con plaguicidas que presenten resistencia cruzada limitada.
- 18.- Reduzca el uso de plaguicidas con elevada propensión a resistencia.
- 19.- Mantenga un registro detallado de las actividades de combate químico.

Desafortunadamente, en muchos casos la resistencia pone en estado de crisis el control y el experto en la materia no cuenta con ningún tipo de información sobre uso de plaguicidas. En consecuencia, el diagnóstico del problema se hace más difícil. El diseño de estrategias de manejo de la resistencia se complica más al no poder inferir la correlación que existe entre el uso de plaguicidas y el desarrollo de poblaciones resistentes.

Es tal vez triste afirmar que no existe una solución fácil para enfrentar la resistencia a pesticidas, por lo que debe hacerse énfasis en la aplicación de estrategias que retarden su aparición.

El próximo milenio que el control químico continuará aún por mucho tiempo como el método más importante de control en garrapatas y moscas de los cuernos, será necesario convertir este control químico de forma más eficiente y menos contaminante. Esto lo logramos disminuyendo la dependencia e intensidad de aplicación para controlar (tratamientos sobre niveles críticos "Umbral económico") además de introducir las distintas categorías de control no químicos, donde sea posible : a). Uso de animales resistentes b). Rotación y descanso de praderas. c). Mejoramiento del manejo aplicación en las fincas. d). Empleo de vacunas biotecnológicas contra garrapatas para esto, trabajo conjunto de productores, industria y gobierno desarrollando programas integrales de control a nivel de campo será imprescindible.

Por último analizando los trabajos serios que históricamente se han desarrollado en el Centro Nacional de Parasitología Animal (CENAPA), México, orientaciones de J.Concepción Rodríguez Maciel 1997, recomendaciones del estimado colega Colombiano Benavides 1995 y publicación reciente de la Dr. F.Thullner 1997, señalando los lineamientos de trabajo global más importante para retardar, eliminar, controlar la

resistencia a plaguicidas y teniendo en cuenta las recomendaciones emanadas del panel de expertos efectuado por la FAO en Porto Alegre, Brasil 1994 coincido al igual que Kunz y Kemp 1994 de que el “problema de resistencia” y residuos estan inseparablemente ligados, siendo la mayor barrera para el mercado entre los paises cuando los niveles exceden del Límite Máximo de Residuo y como consecuencia, se crean las restricciones para la importación y exportación del producto agropecuario con destino al consumo humano.

**Tabla.1.- FACTORES QUE INFLUYEN SOBRE LA EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA.**

<b>G ENÉTICOS</b>	<b>BIOLÓGICOS</b>	<b>OPERACIONALES</b>
<p>Número de genes de R  Frecuencia de genes de R  Dominancia de los genes resistentes.  Penetración, expresividad de los genes de R.  Historia de la selección con insecticidas relacionados.  Integración de genes resistentes con la capacidad biótica.</p>	<p>Duración de la generación  Generaciones por año  Cantidad de descendientes por generación.  Calidad, descendencia por generación.  Presencia de refugios .  Aislamiento.  Movilidad y dispersión.</p>	<p>Química del plaguicida (grupo).  Persistencia de los residuos.  Umbral de aplicación.  Umbral de selección .  Dosis de plaguicidas.  Cubrimiento incompleto.  Selección poco frecuente o alternada</p>

**Georghiou (1997)**

**Tabla. 2.- PRINCIPIOS PARA EL MANEJO DE LA RESISTENCIA.**

Concepto	Enfoque	Medidas
<b>Moderación</b>		
Los genes de susceptibilidad constituyen un recurso valioso que debe preservarse mientras se efectúa un control económico.	Baja presión de selección.	Uso de dosis bajas que produzcan menos del 100% de mortalidad de los genotipos SS. Incrementar la densidad poblacional necesaria para aplicar. Aplicaciones localizadas. Preservación de refugios. Dejar algunas generaciones sin tratar. Uso de formulaciones poco persistentes.
<b>Saturación</b>		
Eliminar la ventaja selectiva de los fenotipos resistentes al saturar los mecanismos de defensa.	Eliminación de genes de R Suprimir las enzimas detoxificadores.	Uso de dosis altas para hacer que los genes de R se comporten como recesivos. De esta manera RS=SS. Uso de sinergistas para bloquear enzimas específicas y eliminar las ventajas selectivas de RS y RR.
<b>Ataque múltiple</b>		
Ataque Multidireccional, haciendo selección en varios sitios de acción de manera simultanea reduzca el nivel de presión que se ejercería usando un solo agente de control.	Mantener el grado de selección de cada insecticida un nivel bajo que no conlleve al desarrollo de la resistencia.	Mezcla de insecticidas. Rotación. Insecticidas que actúan en varios sitios de acción.

**SS = homocigoto susceptible; RS = heterocigoto; RR = homocigoto resistente; R = resistente**

Georghiou (1994)



**Tabla. 3.- MORTALIDAD DE BOVINOS HEREFORD, POR GRAVE INFESTACIÓN DE GARRAPATAS RESISTENTES *Boophilus microoplus*. (CEPA CAVALCANTI). BRASIL.**

		1995	1996	1997	1998	Total
Santa Luiza	Alegrete/RS	38	41	49	8	136
Santo Antonio	Alegrete/RS	27	19	22	9	77

En la medida que se incrementó la infestación de garrapatas descontroladamente, se incrementaron las muertes provocadas por las garrapatas, a excepción de 1998 donde fue controlada la resistencia de las mismas.

Las tablas anteriores muestran de forma clara y precisa de que a menor infestación de garrapatas habrá una mayor presentación de enfermos por hemoparasitosis (*Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*), y a mayor infestación de garrapatas habrá mayor transmisión de hemoparásitos, como consecuencia, tendremos menos bovinos enfermos y muertos por hemoparasitosis, sin embargo la cantidad de muertos debido a grandes infestaciones de garrapatas se incrementa unido a los casos de (gusano barrenador) (*Cochliomyia hominivorax*) en aquellas zonas de resistencia y endémicas a moscas.

**Tabla. 4.- MUERTES POR HEMOPARASITOSIS EN FINCAS CON GANADO HEREFORD, Y SU RELACIÓN CON ALTA INFESTACIÓN DE GARRAPATAS QUIMIORRESISTENTES. (CEPA CAVALCANTI). ALEGRETE,R/S.BRASIL.**

Granja	Muertes por hemoparasitosis					
	1993	1994	1995	1996	1997	
<b>1998</b>						
Santa Luisa	56	31*	10	2	0	0
Santo Antonio	41	11*	3	0	0	0
Las Palmas	NR	NR	11	5*	0	0
Das Palmas	NR	NR	NR	5*	0	0

**Leyenda:** NR = Ocurrio sin registro

\* = Inicio Resistencia Generalizada.

En la medida que se incrementó la infestación permanente y generalizada en los rebafios, disminuyó significativamente las muertes por hemoparasitos.

## VII. RESUMEN

Se analiza el fundamento que origina la resistencia en los ectoparásitos haciendo énfasis en *Boophilus microplus* y *Haematobia irritans* para América.

Se establece tres categorías de manejo (Moderación, Saturación y Ataque múltiple). Se enfatiza la necesidad de orientar los trabajos científicos en el sentido de retardar o eliminar los genes resistentes, conjugando el tratamiento químico con el control biológico, vacunas y medidas no químicas.

## VIII. LITERATURA CONSULTADA

- Curtis, C. F., N. Hill, y S. H. Kassim. 1993. Are there effective resistance management strategies for vectores of human diseases? *Biol. J. Linn. Soc.* 48: 3-18.
- Conway, G. R. y H. N. Comins. 1979. Resistance to pesticides: lessons in strategy from mathematical models. *Span* 22:53-55.
- Cordovés, C.O.; M. O. L. Souza.; H. Lorenzini.; Y. B. Pontes.; R.J. P. Baltodano. (1998) Epizootología e eficácia da Cipermetrina 5% Formulação "Pouon" em infestações naturais de *Haematobia irritans*. *Ahora Veterinária* Año 18, No 105 Set/out.
- Denholm, I., y M. W. Rowland. 1992. Tactics for managing pesticide resistance in arthropods: Theory and practice. *Annu. Ver. Entomol.* 37: 91-112.
- Ford, M. G.; D. W. Holloman.; B. P. S. Khambay, y R. M. Sawichui. (ed) 1987. Combating resistance to xenobiotic. Ellis Horwood, Cheshchester, Engand. 320 pp.
- Forrester, N. W., M. Cahill, L. J. Bird and J. K. Layland. 1993. Management of pyrethroid and endosulfan resistance in *Heliothis armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in Australia. *Bull. Entomol. Res. Suppl.* 1.
- Georghiou, G. P. 1983. Management of resistance in arthropods, pp 769-792. En: *Pest Resistance to Pesticides*. G. P. Georghiou y T. Saito, eds., New York, Plenum Publishing.
- Georghiou, G. P. 1986. The magnitude of the resistance problem, pp 14-43. En: *Pesticide Resistance: strategies and tactics for management*. Proc. Symposium on Management of Resistance to Pesticides. National Acad. Sci., Washington, D.C.
- Georghiou, G. P. y C. E. Taylor 1977. Genetic and biological influences in the evolution insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.*, 70: 319-23.

- Georghiou, G. P. y C. E. Taylor 1997. Operational influences in the evolution of insecticide resistance. *J. Econ. Entomol.* 70: 653-58.
- Georghiou, G. P. 1990. Overview of insecticides resistance. Pages 18-41 En: M. B. Green, H. M. LeBaron, y W. K. Moberg (eds). *Managing resistance to agrochemicals. From fundamental research to practical strategies.* Am. Chem. Soc. Symp. Ser. 421m Washington, D.C.
- Georghiou, G. P. 1990. Resistance potential to biopesticides and consideration of countermeasures. In : *Pesticides and Alternatives.* J.E. Casida ed : pp 409-420.
- Georghiou, G. P. 1994. Principles of insecticide resistance management. *Herbicide Resistance Work Shop, Edmonton 1993.* *Phytoproduction* 75 (Suppl.) : 51-59.
- Horn, S. C. Prov-aveis prejuizos causados pelos carrapatos. *Bol. Def. San. Animal, Brasilia,* 79 P. 1983.
- Kunz, S.E. and Kemp, D. H. 1994. Insecticidas and acaricidas Resistance and Environmen impact. *Ver. Sec. Tec. Off int. Epiz;* 13: 1249- 1286.
- Melander, <sup>a</sup> L. 1914. Can insects become resistant to sprays? *J. Econ. Entomol.,* 7: 167-173.
- Metcalf, R. L. 1975. Insecticides in pest management, pp. 235-273. In R. L. Metcalf and W. Luckman [eds.] *Introduction to insect pest management.* John Wiley & Sons, New York.
- Metcalf. R. L. 1989. Insect resistance to insecticides. *Pestic Sci.* 26:333-358.
- McGaughey, W. H. y M. E. Whalon. 1992. Manangig insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *icense (Washengton D. C)* 258 : 1451- 1455.
- Nari, A y Cardoso, H. Enfermedades causadas por parásitos internos. 1. Nematodes gastrointestinales. IN Bonino. J.; Durán del Campo. <sup>a</sup> y Nari, J. J. eds. *Enfermedades de los Lanares.* Editorial Hemisferio Sur- Montevideo, Uruguay, pp 1-57, 1987.
- Roush, R. T. and J. <sup>a</sup> McKenzie, 1987. Ecological genetics of insecticides and acaricide resistance. *Annu. Ver. Entomol.* 32: 361-380.
- Rodriguez Maciel, J. C. 1997. Manejo de la Resistencia a insecticidas. Colegio de Postgraduado instituto de fitosanidad. Junio. 147 Pgs. Mexico.
- Ranasinghe, L. E., G. P. Georghiou. 1979. Comparative modification of insecticide resistance spectrum of *Culex p. fatigans* Wied. By selection with temephos and temephos/synergist combinations. *Pestic. Sci.* 10: 502-508.
- Stone, B. F. (1972) The genetics of resistance by ticks to acaricides. *Australian Veterinary Journal* 48, 345-350.

- Sutherst, R. W., y H. N. Comins. 1979. The management of acaricide resistance in the cattle tick. *Coophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae), in Australia. *Bull. Entomol Res.* 69:519-537.
- Tabashnik, B. E. 1989. Managing resistance with multiple pesticide tactis; theory, evidence and recommendations. *J. Econ. Entomol.* 82: 1263-1269.
- Thullner, F. 1997. Impact of pesticide resistance and network for global pesticide resistance management based on a regional structure.
- Wood, B. J. 1971. Development of integrated control programs for pest of tropical perennials crops in Malaysia, pp.442-457. In C. B. Huffaker [ed.], *Biological control*. Plenum Press, New York.
- Waller, P. J. Resistance to anthelmintics and their implications for animal production. In Anderson N. and Waller. P. J. eds. *Resistance in Nematodes to anthelmintic drugs*. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization. Australia, pp 1-11, 1985.
- Wood, R.J. (1981) Strategies for conserving Susceptibility to insecticides. *Parasitology*, 82, 69-80.
- Woodworth, C. W (1890) Catton Worm Prospects. En : Arkansas Industrial University, Ark. Agri, Expt, Sta; Bull, 12, A 10-12.

**LA EFICACIA DE IVERMECTIN ANHELA - INTERINA INYECCION (LAI)  
CONTRA ECTOPARASITOS DEL GANADO.**

**THE EFFICACY OF IVERMECTIN LONG-ACTING INJECTION (LAI)  
AGAINST ECTOPARASITES OF CATTLE.**

ALVA R \*, CRAMER LG \*\*, CARVALHO LA\*\*\*, BRIDI AA \*\*\*, COX JL \*\*, SOLL  
MD \*\*

\* *Merial, 115 Trans Tech Drive, Athens, Georgia, USA.*

\*\* *Merial, 2100 Ronson Road, Iselin, New Jersey, USA.*

\*\*\* *Merial, Uruguaiana, Brazil.*

I.	Introduction.....	171
II.	Studies.....	172
	Ticks - <i>Boophilus microplus</i> .....	173
1.	Lice	
	A. <i>Linognathus vituli</i>	
	B. <i>Haematopinus eurysternus</i>	
	C. <i>Solenopotes capillatus</i>	
	D. <i>Damalinia bovis</i>	
3.	Mites <i>Psoroptes ovis</i> .....	174
	A. <i>Sarcoptes scabiei var bovis</i>	
	B. <i>Chorioptes bovis</i>	
4.	Flies - Parasitic Stages.....	174
	A. <i>Dermatobia hominis</i>	
	B. <i>Cochliomyia hominivorax</i>	
III.	Summary and Conclusions.....	175
IV.	Bibliography.....	176

**I. INTRODUCTION**

The therapeutic efficacy of ivermectin against common parasites of cattle has been extensively reported by researchers around the world during the last two decades<sup>1-6</sup>. The persistent efficacy of parasiticides has been exploited to extend the prophylactic potential of existing antiparasitic drugs including ivermectin<sup>7-10</sup>. A new formulation of ivermectin was developed that provides therapeutic efficacy and extended protection against reinfection with most common parasites of cattle. This new formulation of ivermectin was developed by Merial and tested in universities and research institutions in the United States, Germany, United Kingdom, France, Canada, Brazil, Argentina and Mexico. The efficacy of this long-acting injection (LAI) formulation was tested in more than 55 studies. In this paper, efficacy against external parasites is reviewed.

## II. STUDIES

### **Ticks - *Boophilus microplus***

Four studies were conducted to evaluate the efficacy of ivermectin LAI against *Boophilus microplus*. Studies A and B were carried out to evaluate the therapeutic and prophylactic efficacy of this formulation, and Studies C and D evaluated the prophylactic efficacy.

In Study A, 16 Holstein male calves were infested with 2500 larvae at two to three-day intervals from Day -32 to Day 0 prior to treatment. The cattle were allocated by restricted randomization on tick counts (Day -3 to Day -1) to an untreated control group or ivermectin LAI at 630 mcg/kg administered once subcutaneously on Day 0. After treatment, four replicates (Replicates 2, 3, 6 and 8) selected at random were challenged with 5000 *B. microplus* larvae on Days 21 and 35. The remaining replicates were challenged on Days 28 and 42. Adult female ticks were recovered from each animal and were weighed and counted on Days -3, -2, -1, 1, 2 and every one to three days until Day 70. A random sample of up to 10 female ticks, if available, from each collection was weighed and incubated for two weeks for oviposition. Egg masses were then weighed and incubated for four weeks to determine the proportion hatching. The Index of Reproduction (IR) was calculated using the following formula<sup>4</sup>:  $IR = (TWT * EWT * HT) / WTIN$  where TWT=total weight of ticks, EWT=weight of eggs produced, HT=proportion of eggs hatching and WTIN=weight of ticks incubated. Percent efficacy was calculated as  $[(Y_c - Y_t) / Y_c] * 100$ , where  $Y_t$  and  $Y_c$  are the geometric means of total tick count, total tick weight or IR for treated and control group, respectively, within time intervals. Cattle treated with LAI had significantly ( $p < 0.01$ ) lower tick counts, total tick weight and index of reproduction than the controls for the interval Day 1 to Day 31. This period expressed the therapeutic efficacy against all stages present at the day of treatment. Cattle treated with LAI had significantly ( $p < 0.05$ ) lower tick counts, total tick weight and index of reproduction for the intervals Day 40 to Day 47, Day 47 to Day 54 and Day 61 to Day 68. In addition, these cattle had significantly ( $p < 0.05$ ) lower index of reproduction for the interval Day 54 to Day 61. All these intervals after Day 40 were used to demonstrate the prophylactic efficacy against larval challenges made after treatment. Efficacy of LAI for all intervals through Day 68 ranged from 93% to >99% for tick counts, total tick weight and index of reproduction.

In Study B, ten penned Holstein steers were artificially challenged with 2500 unfed tick larvae three times a week from Day -44 up to Day -1. On the day of treatment (Day 0), steers were allocated by restricted randomization based on tick counts from Day -3 to Day -1 to the following treatments: untreated controls or ivermectin LAI at 630 mcg/kg administered once subcutaneously on Day 0. After treatment, cattle were challenged with 5000 unfed tick larvae at approximately two to three-week intervals from Day 14 up to Day 126. Female ticks were recovered from each animal daily until Day 151. All laboratory procedures and calculations were the same as those described in Study A.

Cattle treated with LAI had significantly ( $p<0.05$ ) lower tick counts (intervals from Day 5 to Day 129), total tick weight (intervals from Day 5 to Day 151) and index of reproduction (intervals from Day 5 to Day 151) than the controls. Efficacy of LAI was  $>90\%$  for total tick count up to Day 115 and for total tick weight and index of reproduction up to Day 129.

Studies C and D were each conducted using 12 experimentally infested penned Holstein steers. All cattle were infested with 2500 unfed tick larvae on three occasions prior to treatment. Based on pretreatment tick counts, steers were randomly allocated to an untreated control group or to treatment with ivermectin LAI administered at 630 mcg/kg once subcutaneously on Day 0. After treatment, cattle were challenged with tick larvae approximately every other day from Day 1 through Day 35 (Study C) or Day 28 through Day 106 (Study D). Female ticks dropping from each calf were recovered daily from Day 17 to Day 70 (Study C) or Day 44 through Day 106 (Study D). All laboratory procedures and calculations were the same as those described in Study A. In Study C, steers treated with LAI had a significant ( $p<0.01$ ) reduction of  $>99\%$  for tick counts, total tick weight and index of reproduction when compared to untreated controls for the interval from Day 17 to Day 70. In Study D, the percent reduction from controls for cattle treated with LAI was  $>95\%$  for tick counts and index of reproduction until Day 86. Percent reduction was  $>90\%$  until Day 94 for tick counts and until Day 92 for index of reproduction.

### **Conclusions**

These results demonstrate that ivermectin LAI administered at the recommended dose of 630 mcg/kg provides effective control of established infestations of *Boophilus microplus* and prevents development of ticks acquired for 75 days after treatment. Further, reproductive capabilities of ticks are significantly reduced for up to three months after treatment. Ivermectin LAI, therefore, is a valuable tool for use in a tick control program.

## **1. LICE**

**A. *Linognathus vituli***

**B. *Haematopinus eurysternus***

**C. *Solenopotes capillatus***

**D. *Damalinia bovis***

Six studies were conducted to evaluate the efficacy of ivermectin LAI against existing or induced infestations with lice. In each study, cattle were infested with one to three louse species. Each study included an untreated group and a group treated with ivermectin LAI at 630 mcg/kg administered once subcutaneously on Day 0. Each treatment group consisted of five or six cattle, and animals were randomly allocated to treatment groups based on pretreatment lice counts. Cattle were penned or tethered individually. Lice were counted prior to treatment and at approximately weekly intervals for eight weeks.

Cattle treated with ivermectin LAI had no *Linognathus vituli* ( $p<0.01$ ), *Haematopinus eurysternus* ( $p<0.05$ ) and *Solenopotes capillatus* ( $p<0.01$ ) from Day 7 through Day 56

compared to control cattle which retained their infestations throughout the studies. Treated cattle had significantly ( $p < 0.01$ ) less *Damalinia bovis* than did the controls from Day 14 to Day 56.

### **Conclusions**

Ivermectin LAI was 100% effective against infestations of the sucking lice *Linognathus vituli*, *Haematopinus eurysternus* and *Solenopotes capillatus*. Ivermectin LAI aids in the control of existing infestations of the biting louse *Damalinia bovis*.

## **3. Mites**

### **A. Psoroptes ovis**

### **B. Sarcoptes scabiei var bovis**

### **C. Chorioptes bovis**

Six studies were conducted to evaluate the therapeutic efficacy of ivermectin LAI against existing mite infestations, and two studies were conducted to determine the duration of activity (prophylactic efficacy) against *Psoroptes ovis*. Each trial consisted of an untreated control group and one or more groups treated with ivermectin LAI at 630 mcg/kg administered subcutaneously once on Day 0. Each treatment group in each study consisted of six cattle. Cattle were primarily allocated to treatment groups from within replicates formed based on pretreatment mite count (therapeutic efficacy) or body weights (prophylactic efficacy). Cattle were penned or tethered individually. Mites were counted prior to and after treatment in the studies evaluating therapeutic efficacy. In the studies examining the duration of activity (prophylactic efficacy), cattle were challenged with *P. ovis* 28, 35, 42 or 56 days after treatment. Skin scrapings for mite counts were taken approximately two, three and four weeks after challenge. Ivermectin LAI was 100% effective ( $p < 0.05$ ) in eliminating *P. ovis* and *S. scabiei* mites from treated cattle. *C. bovis* counts were significantly ( $p < 0.05$ ) lower after treatment compared to the controls. Cattle treated with ivermectin LAI and challenged with *P. ovis* mites up to 56 days after treatment were mite free (100% efficacy) when evaluated two to four weeks after challenge.

### **Conclusions**

The results of these studies demonstrate that ivermectin LAI administered at the recommended dose of 630 mcg/kg provides complete control of established infestations of *Psoroptes ovis* and *Sarcoptes scabiei var bovis* and further prevents reinfestation of *P. ovis* for 56 days after treatment. Ivermectin LAI also aids in the control of existing infestations of *Chorioptes bovis*.

## **4. Flies – parasitic stages**

### **A. Dermatobia hominis**



Three studies were conducted to determine the therapeutic and prophylactic efficacy of ivermectin LAI against *Dermatobia hominis* grubs infesting cattle. Animals were naturally infested with the parasite at the beginning of each trial and were kept on pasture after treatment where they were naturally reexposed to the parasite. In each study, Brahman x Holstein steers were formed into replicates based on Day 0 *Dermatobia hominis* larval counts. All three larval stages were present on the animals at Day 0. A minimum of six replicates was formed in each study. Within each replicate animals were randomly assigned to an untreated control or a group administered ivermectin LAI at 630 mcg/kg once subcutaneously on Day 0. Animals were grazed together on pasture for 147 to 203 days following treatment. The number of live larvae on both sides of each animal was recorded on Day 10, when they were expressed to determine viability and larval stage. Reinfestation was assessed by counting larvae periodically through the end of the trials. No live grubs ( $p < 0.01$ ) were present on treated cattle as soon as ten days after treatment which demonstrated 100% efficacy against all stages present at the time of treatment. The number of grubs on treated animals was significantly ( $p < 0.05$ ) less than the number on controls throughout each of these three trials for at least 147 days (all three trials), at least 184 days (two trials) and 203 days (one trial).

#### **B. *Cochliomyia hominivorax***

The efficacy of ivermectin LAI against *Cochliomyia hominivorax* was determined in two studies. Cattle were allocated to an untreated group or to a group receiving ivermectin LAI at 630 mcg/kg administered subcutaneously once on Day 0. In these trials, cattle were either castrated on the same day of treatment and challenged with laboratory-raised screwworm flies for four hours for the first three days, or had a surgical incision made in the skin one day prior to treatment and challenged with newly-hatched larvae. Cattle were maintained on pasture where they were naturally exposed to *C. hominivorax* and were observed for approximately two to three weeks after challenge. Nine of 16 control cattle developed myiasis that required salvage treatment five to seven days after challenge. Only one of 16 ivermectin-treated cattle developed myiasis. Cattle treated with ivermectin LAI had significantly ( $p < 0.01$ ) lower incidence of myiasis than controls.

#### **CONCLUSIONS**

The administration of ivermectin LAI at the recommended dose of 630 mcg/kg provided 99% to 100% control of *D. hominis* larvae for at least 119 days after treatment and greater than 90% control for at least 140 days after treatment. This ivermectin formulation also protected cattle against establishment of myiasis caused by *C. hominivorax* when given at the time the cattle are first subject to infestation, e.g. castration.

### **III. SUMMARY AND CONCLUSIONS**



**Williams JC, Loyacano AF, Broussard SD, et al. Duration of anthelmintic efficacy of doramectin and ivermectin injectable solutions against naturally acquired nematode infections of cattle. *Vet Parasitol.* 1997; 72(1):15-24.**



## **CONTROL MICROBIOLOGICO DE GARRAPATAS.**

### **MICROBIAL CONTROL OF TICKS.**

**ELYES ZHIOUA, KLAUS HEYER, HOWARD GINSBERG, ROGER LEBRUN.**

*Fisheries Animal and Veterinary Sciences, 127 Woodward Hall, University of Rhode Island, Kingston, RI 02881, USA*

The use of the organophosphate coumaphos in the cattle dipping operations raises serious environmental concerns. Furthermore, the spread of synthetic pyrethroid resistance by ticks in many parts of the world signals possible limitations for future use of chemical acaricides in tick management programs. Certainly, alternatives to chemical acaricides are needed.

The present research objectives are to evaluate the pathogenicity of *Bacillus thuringiensis* against ticks. The long-term goal of this research is to develop biological alternatives to chemical acaricides. /

Pathogenicity of the entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstaki* was tested against the blacklegged tick, *Ixodes scapularis*. Engorged larvae dipped in a solution of 10<sup>8</sup> spores per ml showed 96% mortality, 3 weeks post-infection. The LC<sub>50</sub> value for engorged larvae (concentration required to kill 50% of ticks) was 10<sup>7</sup> spore per ml.

We have shown that entomopathogenic bacterium *Bacillus thuringiensis* is highly pathogenic to *Ixodes scapularis* and thus, is a promising candidate as biological alternatives to coumaphos.

## **INFLUENCIA DEL HOSPEDERO EN EL DESARROLLO DE *Anocentor nitens***

### **INFLUENCE OF THE HOST IN THE DEVELOPMENT OF *Anocentor nitens***

GRACIELLA DÍAZ\*, RAFAEL DE LA VEGA\*\*, GLADYS CHÁVEZ\*

\* *Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba*

\*\* *Laboratorios Biológicos Farmacéuticos (LABIOFAM), Ave. Independencia Km 16½, Boyeros, Ciudad Habana, Cuba*

Un aspecto importante en el estudio de un parásito es conocer como varían sus parámetros biológicos en dependencia del hospedero sobre el cual se desarrolla. Con el fin de comparar diferentes variables de la fase no parasitaria se trabajó con dos grupos de hembras repletas de *Anocentor nitens*, uno de ellos obtenido de bovinos y otro obtenido de equinos. Todas las adultas se pesaron inicialmente y se dispusieron en subgrupos a dos temperaturas 26°C y 32°C y cuatro humedades relativas 100, 80, 75.5 y 70%, para un total de ocho combinaciones de temperatura y humedad relativa para las garrapatas de bovinos e igual número de combinaciones para las garrapatas de equinos, colocándose de 12 a 15 hembras por variante. En todos los grupos se determinó el inicio de la oviposición, la eficiencia de la puesta y el tiempo mínimo de eclosión. Se realizaron análisis de varianza (ANOVA) para las variables: peso de las garrapatas, pre-eclosión (tiempo de preoviposición más tiempo mínimo de eclosión) y eficiencia de la puesta. Como factores se incluyeron la temperatura, la humedad relativa, la interacción entre ambos y el hospedero. También se realizó un análisis de varianza multivariado (MANOVA) utilizando las mismas variables y los mismos factores de los ANOVA. Tanto en el caso de los análisis de varianza como en el caso del MANOVA los factores considerados resultaron significativos. El hospedero influyó tanto en el peso de las hembras repletas como en las variables del ciclo consideradas en este trabajo.

# **METODO DE MUESTREO DE GARRAPATAS PARA PEQUEÑAS GRANJAS LECHERAS.**

## **A TICK SAMPLING METHOD FOR SMALL DAIRY FARMS**

**RAFAEL DE LA VEGA\*, ANDRÉS CAMEJO\*, GRACIELLA DÍAZ\*\*, ISRAEL GARCÍA\*\*\***

- \* *Laboratorios Biológicos Farmacéuticos, Ave. de Independencia Km 16½, Boyeros, C. Habana, Cuba*
- \*\* *Facultad de Biología, Universidad de la Habana, Cuba*
- \*\*\* *Instituto Pedro Kouri, C. Habana, Cuba*

Ticks' control is facing a real challenge because resistance to acaricides is a widespread phenomenon. Besides, cost of new products is very high, especially for small producers. It is necessary to look for a way to make the struggle against ticks more rational. The use of a tick sampling method could help to get this goal. In this paper an application of a sampling method developed by the authors, was done. A farm with 20 to 30 Jersey cows in production was selected. A first sampling determined the proportion of ticks (*Boophilus microplus*) equal or larger than 6 mm in each of the predetermined 28 regions of the body surface of the cows. The sampling was done between 7 and 8 am the day the animals were going to received the acaricidal bath. It was determined the udder, rear leg, "perineum" and tail as sampling regions. The surface examined corresponded to the 32.6 % of the complete animal. Thirteen samplings were done. The results shown the way the acaricidal treatment was or not been successful and therefore actions could be taken according to these results. Half of the 273 animals sampled during the work had 10 or less ticks' number and could not receive the treatment. In the case that the cost of the acaricidal bath per cow was \$0.10 a herd of 100 cows could save \$260 US a year if the criterion to bath the animals with more than 10 ticks is adopted. The systematic use of such a method could be of great importance for the integral ticks' control.





**DINAMICA POBLACIONAL DE *Haematobia irritans* EN UN HATO DE BOVINOS DE SOTO LA MARINA, TAMAULIPAS, MEXICO.**

**POPULATION DYNAMICS OF *Haematobia irritans* IN A BEEF HERD IN SOTO LA MARINA, TAMAULIPAS, MEXICO.**

CASTILLO S. S., ALMAZÁN G.C., MEDELLÍN L A., LOREDO O. J.

*Departamento de parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Km 5 carretera Victoria-Mante, Cd. Victoria, Tam. CP 87000*

La mosca del cuerno, *Haematobia irritans* es actualmente el ectoparásito de mayor importancia que afecta al ganado bovino en México, esta mosca se encuentra distribuida ampliamente en el país y ha pasado de ser un problema estacional a permanente. Debido a la escasa información sobre la fluctuación poblacional de *H. irritans* en México se decidió realizar el presente trabajo en un hato de ganado bovino localizado en el municipio de Soto la Marina, Tam., con el objeto de determinar la dinámica poblacional de *H. irritans* y evaluar la relación de la curva poblacional con las condiciones ambientales de temperatura (t) y precipitación pluvial (pp).

Del total del hato se escogieron 12 bovinos al azar, sobre los cuales se efectuó un conteo de moscas con ayuda de binoculares y diapositivas, los conteos se realizaron semanalmente durante un año de septiembre de 1998 hasta agosto de 1999. Estos animales no recibieron tratamiento mosquicida y se mantuvieron en un predio de 40 has. El total de moscas por animal se obtuvo del conteo de un costado de cada bovino y el resultado se multiplicó por dos, se obtuvieron los promedios mensuales, se graficó la curva poblacional y se realizó un análisis de correlación múltiple con las variables de t y pp obtenidas en la estación metereológica de la zona.

Los resultados obtenidos fueron los siguientes: *H. irritans* estuvo presente en todos los animales durante el período de estudio con ligeras variaciones, en septiembre de 1998 el promedio de moscas/animal fue mayor de 200 y comenzó a disminuir paulatinamente para mantenerse bajo hasta febrero del siguiente año, incrementándose en el mes de marzo hasta julio cuando se encontró el mayor incremento y declinar hasta el fin del estudio. El coeficiente de correlación entre la población de moscas y las variables de t y pp fue de 0.84, ( $p < 0.05$ ), por lo que se concluye que existe una alta correlación entre la dinámica poblacional de la mosca del cuerno con las variables climatológicas en estudio.



**RASGOS BASICOS DE LA INFESTACION POR MOSCAS *Stomoxys calcitrans* Y *Haematobia irritans* EN GANADO LECHERO ESTABULADO DE AGUASCALIENTES, MEXICO.**

**BASIC CHARACTERISTICS IN *Stomoxys calcitrans* AND *Haematobia irritans* FLIES INFESTATION IN CONFINED DAIRY CATTLE IN AGUASCALIENTES, MEXICO.**

CRUZ-VÁZQUEZ, C\*, VITELA, M. I\*, RAMOS, P.M\*, GARCÍA, V. Z\*\*, QUINTERO, M. M. T.\*\*\*

- \* *Instituto Tecnológico Agropecuario de Aguascalientes. AP. 1439, C. Camionera. 20270. Aguascalientes, Ags. México.*  
\*\* *Facultad de Ciencias Agropecuarias UAEM.*  
\*\*\* *Depto. Parasitología. FMVZ-UNAM.*

I.	Introducción.....	183
II.	Identificación de moscas que parasitan al ganado lechero de Aguascalientes.....	184
III.	Algunos rasgos generales de la dinámica poblacional de <i>Stomoxys calcitrans</i> y <i>Haematobia irritans</i> . ....	185
	Agradecimientos.....	186
IV.	Resumen.....	186
V.	Summary.....	187
VI.	Referencias.....	187

## I. INTRODUCCIÓN

*Stomoxys calcitrans* (L), conocida como mosca del establo o brava y *Haematobia irritans* (L), denominada mosca del cuerno, son ectoparásitos hematófagos del ganado bovino que se encuentran ampliamente distribuidos en el continente americano (Foil y Hogsette, 1994). Estas moscas causan importantes problemas de salud animal tanto por la pérdida de sangre que provocan al alimentarse como por las molestias que causan al hacerlo, sus piquetes irritan fuertemente al ganado y causan reducción en el tiempo dedicado a alimentarse, interfieren con la digestión y asimilación de nutrientes y se incrementa el gasto de energía para ahuyentarlas, esto se suma a un estado general de stress que finalmente incide en la producción de leche y carne. Las pérdidas económicas debidas a daños directos, indirectos y costos de programas de control, especialmente químico, son importantes (Byford, et. al, 1992); en México no existen estimaciones al respecto, sin

embargo, se reconoce la importancia del problema y su fuerte impacto en la ganadería nacional.

El control de estas infestaciones ha sido realizado principalmente a través del uso de compuestos químicos con propiedades insecticidas; el uso intensivo e irracional de los mismos ha llevado a la aparición del fenómeno de la resistencia a diversos insecticidas en diferentes poblaciones de moscas en el mundo, incluyendo a México, particularmente en el caso de *H. irritans* (Kunz y Kemp, 1994; Kunz, et al., 1995).

Cada una de estas moscas posee un ciclo de vida independiente aunque comparten hospedero y ambiente, así, el manejo del problema debe de ser diferente en cada especie, pero integrando a ambas, sin embargo, en la práctica esto no sucede debido entre otras causas a la falta de información acerca del comportamiento de las infestaciones en las diferentes regiones ganaderas.

En México y particularmente en el estado de Aguascalientes, existe escasa información acerca de *S. calcitrans* y *H. irritans*, de su biología, ecología y epidemiología, aspectos básicos que deben conocerse para poder comprender al parásito y así hacer uso racional y sustentable de las diversas alternativas de control que existen actualmente para combatir esta plaga.

## II. IDENTIFICACION DE MOSCAS QUE PARASITAN AL GANADO LECHERO DE AGUASCALIENTES.

La región lechera del estado de Aguascalientes, México, se encuentra localizada en la zona centro-norte de la República Mexicana, ubicada a 1885 msnm, con una temperatura promedio de 16.9°C y 475 mm de lluvia al año, la cual es estacional, presentándose en el verano, su clima es semiseco templado y extremoso. Esta región lechera está integrada por los municipio de Aguascalientes, Jesús María, San Francisco de los Romo y Pabellón de Arteaga.

Con la finalidad de identificar a las moscas que se encontraban parasitando a los bovinos lecheros adultos en producción en la región lechera del estado, se llevó a cabo la selección al azar de 60 establos los cuales se visitaron una vez por mes durante el periodo de mayo a julio de 1997. Todos los establos, independientemente de su nivel tecnológico, mantienen a su ganado, de la raza Holstein, en confinamiento permanente, en el sistema de estabulación libre y bajo condiciones de manejo y alimentación características de las regiones semiáridas de México.

En cada visita se procedió a elegir al azar 10 animales, los cuales fueron sujetados y con ayuda de una trampa entomológica, se procedió a capturar moscas de diferentes regiones del cuerpo, los especímenes se colocaron en frascos con alcohol al 70% y se trasladaron al laboratorio del ItaA para su posterior identificación taxonómica.

Este estudio permitió identificar la presencia y amplia distribución de *H. irritans*, en la región bajo estudio y confirmar la de *S. calcitrans*. La primera de ellas tiene gran importancia en ganado pastoreado en zonas tropicales y subtropicales de México, sin embargo, en regiones de clima templado y semiárido su importancia no ha sido establecida, mucho menos en ganado estabulado dado que no se considera una plaga de este medio de producción. La mosca del establo, llamada así precisamente por localizarse habitualmente en este tipo de instalaciones pecuarias, es una plaga usual y económicamente importante, en el mismo estudio se identificaron tres especies de moscas lamedoras, *M. domestica*, *F. canicularis* y *M. stabulans* (Cruz-Vázquez, et al., 1999). Para comprender la presencia de estas moscas se debe considerar que las condiciones de alojamiento y manejo del estiércol y otros residuos orgánicos en los establos de Aguascalientes al parecer favorecen el desarrollo de ambas moscas y de las lamedoras identificadas sobre los animales, asimismo, se debe de reconocer la capacidad de adaptación de *H. irritans* para desarrollarse bajo las condiciones prevalecientes en los establos en estudio.

Los productores de leche de la región reconocen la existencia de la mosca “brava” como aquella que “pica” al ganado, pero en la generalidad de los casos les es difícil identificar que se trata de dos especies diferentes, motivo por el cual las medidas de control ejercidas por ellos son aplicadas como si se tratara de una sola especie de díptero, lo que lleva a un inadecuado uso de los recursos (Vitela y Cruz, 1997).

### III. ALGUNOS RASGOS GENERALES DE LA DINAMICA POBLACIONAL DE *Stomoxys calcitrans* Y *Haematobia irritans*.

Con el objetivo de conocer algunos rasgos de la dinámica poblacional de *H. irritans* y *S. calcitrans* en su estado parásito en la región lechera de Aguascalientes, se diseñó un trabajo de monitoreo de poblaciones adultas llevado a cabo en una etapa inicial de febrero de 1997 a febrero de 1999. Durante este periodo se visitaron semanalmente seis establos de la zona, en donde se seleccionaron al azar 10% de los animales adultos en producción en cada ocasión, en ellos se realizó un conteo directo del número total de moscas de cada especie estudiada, observadas con ayuda de binoculares cuando fue necesario, descansando o alimentándose en el animal, para *H. irritans* se observó el animal completo y para *S. calcitrans* sólo el frente de las piernas (Foil y Hogsette, 1994).

La dinámica poblacional observada en el estudio muestra la posible existencia de diapausa en los meses de invierno, los niveles poblacionales inician una curva ascendente de la última semana del mes de marzo hasta septiembre en ambas especies, más importante en *H. irritans* que en *S. calcitrans*, la población decrece de finales de octubre a las dos últimas semanas de diciembre. En los establos estudiados se observó un 100% de infestación del mes de julio a octubre en el caso de *H. irritans* y de agosto a octubre para *S. calcitrans*. Durante este tiempo fue posible detectar la mayor intensidad de infestación con niveles económicamente importantes de moscas por animal en ambas especies. Se detectó

una estrecha relación de la temperatura con los niveles poblacionales de *H. irritans* y de la temperatura y humedad en *S. calcitrans*, los cuales habían sido previamente sugeridos (Cruz-Vázquez, et al., 1999b,c).

Estas observaciones preliminares permiten apreciar que la dinámica poblacional tiende a la estacionalidad, esta característica ha sido reportada en los Estados Unidos, por ejemplo en Texas para *H. irritans*, la temporada abarca de mayo a octubre con picos poblacionales en el verano cuando la temperatura y humedad son más favorables para el desarrollo de estas moscas, en Canadá, la temporada es más corta debido a las condiciones climáticas, de julio a octubre, sin embargo en ese corto tiempo las poblaciones alcanzan niveles económicamente importantes en el caso de *S. calcitrans* (Thomas y Kunz, 1985; Lysyk, 1993).

Es importante resaltar que los estudios acerca de la dinámica poblacional son importantes para conocer en cada región el comportamiento de estas moscas, tanto en los estados parasíticos como en los de vida libre, la influencia de factores climáticos, así como el sistema de producción empleado, la raza y otros como el manejo de los alojamientos, del estiércol y de otros residuos orgánicos, son relevantes en la epidemiología de estas enfermedades parasitarias, dichos estudios deben de realizarse por periodos continuos de cuando menos 5 años, para tener una perspectiva real del fenómeno. El conocimiento de estos elementos pueden ayudar a manejar más eficientemente y de manera sustentable un programa de manejo integrado de plagas en estos ectoparásitos, meta obligada en la actualidad en la entomología veterinaria.

#### AGRADECIMIENTOS

El presente proyecto es financiado por el Cosnet-SEP (312.96-P), por la D.G.E.T.A (PI-98) y por I.F.S. (B/2588-1). Se agradece a los ganaderos productores de leche de Aguascalientes que han facilitado el acceso a sus establos para la realización de estos trabajos.

#### IV. RESUMEN

Se ha detectado la presencia y amplia distribución de *Haematobia irritans* y *Stomoxys calcitrans*, parasitando al ganado bovino productor de leche estabulado de Aguascalientes, México. En los establos lecheros también se encontraron parasitando al ganado a *Musca domestica*, *Fannia canicularis* y *Muscina stabulans*. La información preliminar con que se cuenta con respecto a la dinámica poblacional de las moscas hematófagas presentes en la región permiten observar que la infestación no es continua, iniciándose a finales de marzo y terminando a finales de diciembre, la diapausa se presenta durante el invierno. La infestación por *H. irritans* siguió un patrón más dinámico en su crecimiento poblacional que *S. calcitrans*. En ambos casos los factores climáticos, temperatura y humedad son importantes en la dinámica poblacional.

Palabras clave: moscas, *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans*, ganado lechero estabulado.

## V. SUMMARY

It was observed the presence and widely distribution of *Haematobia irritans* and *Stomoxys calcitrans* flies in confined dairy cattle in Aguascalientes, Mexico. In the dairy farms were also identified over the animals body *Musca domestica*, *Fannia canicularis* and *Muscina stabulans*. The preliminary information recopied in the region about biting flies population dynamics demonstrated that the infestation is not continuous, begin in later march and finish in later december, the diapause is present in winter. *H. irritans* infestation has a most dynamic increase population than *S. calcitrans*. In both cases climatic factors, temperature and humidity are important in the population dynamics.

Key words: biting flies, *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans*, confined dairy cattle.

## VI. REFERENCIAS

- Byford,R.L., Craig,M.E. and Crosby,B.L. 1992. A review of ectoparasites and their effect on cattle production. J. Anim. Sci. 70:597-602.
- Cruz-Vázquez,C., Vitela,M.I., Ramos,P.M., Quintero,M.M.T. y García,V.Z. 1999a. Presencia de *Haematobia irritans* (L)(Diptera:Muscidae) en ganado lechero estabulado de Aguascalientes, México: Informe preliminar. Vet. Mex. 30(2).
- Cruz-Vázquez,C., Bautista,H.J., Vitela,M.I., Ramos,P.M., Quintero,M.M.T. y García,V.Z. 1999b. Distribución anual de *Haematobia irritans* (L)(Diptera:Muscidae) en ganado lechero estabulado de Aguascalientes, México. Vet. Mex. (en revisión).
- Cruz-Vázquez,C., Martínez,R.S., Vitela,M.I., Ramos,P.M., Quintero,M.M.T. y García,V.Z. 1999c. Niveles poblacionales de la mosca del establo, *Stomoxys calcitrans* (L)(Diptera:Muscidae) en ganado lechero de Aguascalientes, México. Folia Entomol. Mex. (en revisión).
- Foil,L.D. and Hogsette,J.A. 1994. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 13:1125-1158.
- Kunz,S.E. and Kemp,D.H. 1994. Insecticides and Acaricides: Resistance and enviromental impact. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 13:1249-1286.

- Kunz,S.E., Ortiz-Estrada,M. and Fragoso-Sánchez,H. 1995. Status of *Haematobia irritans* (Diptera:Muscidae) insecticide resistance in northeastern Mexico. J. Med. Entomol. 32:726-729.
- Lysyk,T.J. 1993. Seasonal abundance of stable flies and house flies (Diptera:Muscidae) in dairies in Alberta, Canada. J. Med. Entomol. 30:888-895.
- Thomas,D.B. and Kunz,S.E. 1985. Effects of season and density on the fecundity and survival of caged populations of adult horn flies (Diptera:Muscidae). J. Econ. Entomol. 78:106-109.
- Vitela,M.I. y Cruz-Vázquez,C. 1997. Diagnóstico de las prácticas de manejo de las infestaciones por moscas en ganado lechero de Aguascalientes. En: Memorias del VIII Congreso Nacional de Investigación y Desarrollo Tecnológico Agropecuario. Morelia, Mich. p: 208.



# CONTROL NATURAL DEL COMPLEJO DE MOSCAS DEL ESTABLO EN CUAUTLA, MORELOS, MEXICO

## NATURAL CONTROL OF FLY COMPLEX ON STABLE IN CUAUTLA, MORELOS, MEXICO.

MA. ELENA VALDEZ E , LUCILA ALDANA LL , LAURA MARTINEZ M , MANUEL  
MORALES S. \*\*

*Centro de Desarrollo de Productos Bióticos IPN. Apartado Postal 24 Yautepec, Morelos.*

*\* Becarias COFAA*

*\*\* Instituto Profesional de la Región Oriente UAEM.*

El complejo de moscas comprende a especies hematófagas como *Stomoxys calcitrans* y *Haematobia irritans* que causan daños en forma directa a los animales; además de moscas chupadoras, como *Musca domestica* que actúan como vectores de patógenos entre el ganado. A estas moscas se les combate continuamente por medio del control químico, sin embargo el uso inadecuado de este método ha ocasionado resistencia entre las poblaciones de moscas, problemas de contaminación ambiental y problemas de salud, lo que obliga a buscar nuevas estrategias de control. Una alternativa viable es el uso de enemigos naturales como parte de un manejo integrado de plagas, por lo que el objetivo del presente trabajo es conocer los enemigos naturales que se encuentran parasitando a las pupas de moscas de establo.

Se realizaron muestreos semanales en un establo lechero en Cautla, Morelos; colectando al azar 100 pupas del estiércol, se llevaron al laboratorio y se colocaron en frascos de plástico de 25 cm para su incubación bajo condiciones ambientales; se realizaron observaciones diarias para ver la emergencia de adultos de moscas o parasitoides.

Los enemigos naturales observados fueron parasitoides de la familia Pteromalidae con tres especies que fueron: *Spalangia sp.*, *Muscidifurax sp.* y *Nasonia sp.* Estos parasitoides se presentaron de julio a septiembre. La mayor cantidad de pupas parasitadas se colectaron en la última semana de julio, mes con abundante precipitación con un 25% de parasitoides. La especie más frecuente y abundante fue *Spalangia sp.* presentándose de julio a principios de noviembre, con su máxima poblacional a finales de julio y *Muscidifurax sp.* se presentó esporádicamente en julio, septiembre y diciembre. Por lo que el control mediante el uso de parasitoides es una alternativa en el manejo integrado del complejo de moscas.



# PRESENCIA DE PARASITOIDES EN LAS MOSCAS DEL ESTABLO EN YAUTEPEC, MORELOS, MEXICO

## PARASITOIDES FOUND IN STABLE FLY IN YAUTEPEC, MORELOS, MEXICO

LUCILA ALDANA LL\*, MA. ELENA VALDEZ E\*, LAURA MARTINEZ M\*,  
MANUEL MORALES S. \*\*

*Centro de Desarrollo de Productos Bióticos IPN. Apartado Postal 24 Yautepec, Morelos.*

*\* Becarias COFAA*

*\*\* Instituto Profesional de la Región Oriente UAEM.*

Los objetivos del presente trabajo fueron: a) determinar las principales especies de moscas que se presnetan en un establo lechero en Yautepec, Morelos y b) conocer a los enemigos naturales que regulan a las poblaciones de las moscas en etapa de pupa, así como su fluctuación poblacional. Se realizaron muestreos semanales de julio de 1996 a septiembre de 1997 en un establo lechero semiestabulado con ganado cruzado con raza Holstein, ubicado en Yautepec, Morelos. En estos muestreos se coelctaban 100 pupas del estercolero.

De los resultados obtenidos tenemos que las especies de moscas identificadas fueron: *Stomoxys calcitrans*, *Musca domestica*, *Haematobia iiritans* y dos especies no identificadas. La especie más abundante fue *S. calcitrans*, la que tendió a predominar durante todo el tiempo. Mientras que *M. domestica* presnetó un patrón diferente, pues la mayor población se concentró durante el verano y descendió hasta que en el invierno fue muy escasa. La tercer especie de mosca identificada en la localidad de estudio fue *H. iiritans*, que sólo se presentó durante cuatro semanas en el verano, el numero de moscas emergidas fue de siete ejemplares.

Durante los muestreos emergieron de la pupas de moscas, parasitoides del orden Hymenoptera, de las familias Pteromalidae con dos especies *Spalangia sp.* y *Nasonia sp.* Eucoilidae y Braconidae. El mayor porcentaje de parasitismo ocurrió en el mes de agosto con un 37%. El género *Spalangia* es el que se presentó durante todos los meses del estudio. La familia Eucoilidae apareció de julio a septiembre de 1996. La tercer familia fue Braconidae, que resultó ser escasa. Sólo se colectó durante una semana en agosto y otra en diciembre de 1996.

La presencia de enemigos naturales que se encuentran regulando a las larvas y pupas de las moscas, nos señala que el control biológico del complejo de moscas del establo en



## **EVALUACION DE LA RESISTENCIA DE LOS MOSQUICIDAS CONTRA LA MOSCA DEL CUERNO (*Haematobia irritans*) EN TAMAULIPAS.**

### **EVALUATION OF THE RESISTANCE OF THE INSECTICIDES AGAINST THE HORN FLY (*Haematobia irritans*) IN TAMAULIPAS.**

ANTONIO CANTU C. 1, CONSUELO ALMAZAN G. 2, ZEFERINO GARCÍA V. 3, SIDNEY KUNZ 4.

1.- CIRNE-INIFAP-ALDAMA TAM. 2.- UAT-FMVZ 3.- CENID-PAVET-INIFAP. 4.- USDA-ARS KERRVILLE TX.

La mosca del cuerno (*Haematobia irritans*) es una plaga que afecta al ganado bovino siendo en Tamaulipas económicamente un problema grave, ya que en los últimos años las poblaciones de moscas han crecido grandemente causando que este problema este presente a través de todos los meses del año. Los ganaderos actualmente utilizan tratamientos desesperados y mal empleados provocando resistencia del parásito a los insecticidas. Causando daños como perdidas en las ganancias de peso, estrés contante en el animal, bajos índices de fertilidad, susceptibilidad a enfermedades y altos costos para su control. En Tamaulipas existen gran numero de explotaciones donde la presencia de este parásito es tan frecuente que cada huésped pude parasitarse hasta con 2000 moscas. El objetivo del presente trabajo es el determinar la resistencia a los productos utilizados en su control, fueron evaluados 26 ranchos, 12 ubicados en el norte, 11 en el sur y 3 en el centro del estado. Para el diagnostico de Permetrina se utilizo la técnica de caja petri descrita por (Sheppard 1987) a dosis letal de 50 y 90 y para diagnostico de Diazinon se utilizo la técnica de viales impregnados a dosis letal de 50 y 90 (Kunz 1995). Los resultados hasta el momento muestran que en la zona norte centro y sur existió un promedio de eficiencia para permetrina a dosis de 2.5 m gr/cm<sup>2</sup> de 4.65%, 0.60% y 5.76%, a dosis de 6.0 m gr/cm<sup>2</sup> fue 6.46%, 3.16% y 11.13% respectivamente. El promedio de eficiencia para diazinon a dosis de 0.01m gr/cm<sup>2</sup> de 62.91%, 81.63% y 18.38%, a dosis de 0.06m /cm<sup>2</sup> fue 76.37%, 99.33% y 40.36%. Se observa que existe una alta resistencia hacia la permetrina siendo el valor de efectividad mas alto 6.46% a dosis de 6.0m gr/cm<sup>2</sup> en la zona norte y el mas bajo de 0.60% a dosis de 2.5m gr/cm<sup>2</sup> en la zona centro, demostrándose claramente una alta resistencia a lo largo de todo el estado. Para el caso de diazinon se observa que en la zona sur existe una resistencia alta ya que el porcentaje de efectividad fue de 18.38% a dosis de 0.01m gr/cm<sup>2</sup> y 40 % para dosis de 0.06 m gr/cm<sup>2</sup>. Manifestándose un buen porcentaje de efectividad para la zona norte y centro. Se concluye que en el estado de Tamaulipas existe alta resistencia hacia los piretroides y que existen buenos resultados de efectividad para organofosforados (diazinon) para la zona norte y centro del Estado. Para la zona sur de Tamaulipas existen poblaciones de mosca del cuerno con alta resistencia a piretroides y organofosfortados. Es recomendable continuar con estudios determinar la situación real y encontrar estrategias integradas de control para reducir el uso de este tipo de productos.



## **"NUEVAS" PRUEBAS DIAGNOSTICAS; ¿ LOS PARASITOS O ANTICUERPO?**

### **"NEW" DIAGNOSTIC TESTS; PARASITES OR ANTIBODY?**

PATRICIA J. HOLMAN, DAVID CRUZ, G. GALE WAGNER.

*University of Texas A&M.*

Tick-borne diseases such as babesiosis, anaplasmosis and theileriosis seriously affect cattle and horses, and the economics of livestock production and trade. Since ticks such as *Boophilus* can transmit several of these disease agents, the control of hemoparasitic diseases depends on a thorough understanding of the interrelationships of susceptible animals with the tick vector and the reservoir of infection. The role of wildlife is also an important factor, as reservoirs of the infective hemoparasites, as well as alternate hosts for the vector ticks. Thus, better diagnostic methods to prevent disease, to determine the role of carrier animals in the epidemiology of the disease, and to determine the infection status of possible vector ticks are critical elements in an integrated approach to the control of hemoparasitic diseases.

Better diagnostic methods have diminished the problems due to viral and bacterial disease agents, but the diagnosis of hemoparasitic diseases is still problematic. The definitive diagnosis of hemoparasitic infections still depends on microscopic observation of the parasite in stained blood films, a tedious procedure frequently made more difficult by extremely low circulating parasitemias present for very limited periods of time. Serology is limited in usefulness because antibody activity is a reflection of exposure, but not necessarily indicative of current infection. Thus, carrier animals may test negative both microscopically and serologically, yet become reservoirs of infection when susceptible animals are introduced where vector ticks are present.

Fluorescent probes such as acridine orange, non-specific for the parasite but specific for nucleic acid, offer a simple and sensitive technique for the rapid diagnosis of hemoparasites. The limitation of this method is that diagnosis with fluorescent probes still depends on the distinctive microscopic morphology of the protozoa after the staining procedure.

The culture of hemoparasites from cattle, horses, deer, elk, etc has proved to be a remarkably sensitive and specific method of detection. Blood samples with no detectable

parasitemia and negative serology have been shown to be infected by culture. However, the culture assay is expensive and can be time consuming.

The potential of PCR for the diagnosis of hemoparasitic diseases is now being realized. Both sensitivity and specificity appear to be very good. However, primer sets must be defined for the particular agents involved. DNA extraction can be difficult from blood, particularly with improperly handled samples. As with the culture assay, the PCR can be very expensive and time consuming.



## **SITUACION ACTUAL DE LOS HEMOPARASITOS EN EL ESTADO DE TAMAULIPAS, MEXICO.**

### **CURRENT SITUATION OF THE HEMOPARASITES IN THE STATE OF TAMAULIPAS, MEXICO.**

MEDELLÍN L.J.A.\* Y ALMAZÁN G.C.

*Laboratorio de Diagnóstico, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma de Tamaulipas, Km. 5 carretera Victoria-Mante, Cd. Victoria, Tam. CP 87000.*

Las enfermedades producidas por hemoparásitos son padecimientos que, por décadas la ganadería en México ha enfrentado cotidianamente. Las pérdidas que estos padecimientos ocasionan en la crianza, engorda y la producción lechera de los trópicos, son cuantiosas. Tamaulipas no es la excepción al tener en su geografía amplias zonas tropicales y subtropicales dedicadas a la ganadería, zonas con climas propicios para la proliferación de artrópodos vectores, garrapatas principalmente, además de moscas y mosquitos hematófagos que son considerados potenciales transmisores de estas dos enfermedades.

El objetivo del presente trabajo fue analizar los casos positivos a hemoparásitos en bovinos y otras especies de animales domésticos mediante frotis sanguíneos, realizados en el laboratorio de diagnóstico de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Tamaulipas con sede en Cd. Victoria, Tam. de 1992 a 1997. Durante 1992, se recibieron 53 casos, de los cuales, 23 fueron positivos a *A. marginale*, 10 a *Babesia bovis*, 5 a *A. marginale* y 2 a *Eperitrozoon spp.*, durante 1993 de 148 casos, 90 fueron positivos a *A. marginale*, 30 a *B. bovis*, 20 a *B. bigemina*, 2 a *B. equi*, 2 a *B. caballi* y 2 a *Eperitrozoon spp.*, En el año de 1994 de 111 casos, 62 fueron positivos a *A. marginale*, 37 a *B. bovis*, 8 a *B. bigemina*, 4 a *B. equi*, 1 a *B. caballi*, 1 a *B. ovis* y 7 a *Eperitrozoon spp.* En 1995 de 62 casos, 22 fueron positivos a *A. marginale*, 29 a *B. bovis*, 3 a *B. bigemina*, 4 a *B. caballi*, 2 a *B. ovis* y 1 a *B. canis*. Del total de casos por hemoparásitos diagnosticados en el laboratorio de diagnóstico el 39.2 % correspondió a *A. marginale*, el 22.3% a *B. bovis*, el 7.6% a *B. bigemina*, el 2.1 a *B. equi*, el 1.5 a *B. caballi*, el 0.21 a *B. canis*, el 0.21 a *B. ovis* y el 2.3 a *Eperitrozoon spp.*

De acuerdo con los datos aquí presentados, se concluye que el estado de Tamaulipas es una zona con una alta frecuencia de enfermedades por hemoparásitos, cabe mencionar que aquí se presentan solo los datos de casos recibidos en el laboratorio de diagnóstico, sin embargo estos resultados dan un reflejo de la magnitud del problema en el estado, es importante mencionar que las especies mayormente afectadas son los bovinos y que los hemoparásitos diagnosticados con mayor frecuencia son *A. marginale* y *B. bovis*.

r -

# EXPERIENCIAS EN EL DESARROLLO DE UNA VACUNA CONTRA LA BABESIOSIS BOVINA EN MEXICO

## EXPERIENCES ON THE DEVELOPMENT OF A BOVINE BABESIOSIS VACCINE IN MEXICO.

C.A. VEGA Y MURGUÍA\*, J.V. FIGUEROA MILLÁN\*, J.A. RAMOS ARAGÓN\*, E.E. ROJAS RAMÍREZ\*, R. HERNÁNDEZ ORTIZ\*, S.D. RODRÍGUEZ CAMARILLO\*, G.J. CANTÓ ALARCÓN\*\*.

\* *CENID – Parasitología Veterinaria, INIFAP*

*Km. 11.5 Carretera Federal Cuernavaca – Cuautla, Col. Progreso, Jiutepec, C.P. 62500, Morelos, MÉXICO.*

\*\* *CENID – Fisiología y Mejoramiento Animal, INIFAP*

*Km. 1 Carretera a Colón, Ajuchitlán, C.P. 76280, Querétaro, MEXICO*

I. Introducción.....	199
II. Estrategias Experimentales.....	200
III. Discusión.....	204
IV. Resumen.....	205
V. Summary.....	206
Agradecimientos.....	208
Referencias.....	208

### I. INTRODUCCIÓN

La Babesiosis bovina es una enfermedad causada por protozoarios parásitos intraeritrocíticos del género *Babesia*; transmitidas por garrapatas, de las cuales en México, solo se han reconocido dos especies: *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* (Álvarez & Cantó, 1985). Su distribución es nacional, principalmente en las zonas tropicales y subtropicales; abarcando todas las áreas en las que se encuentran las garrapatas del género *Boophilus* spp. En nuestro país, se reconoce que el mayor núcleo de población bovina se encuentra en riesgo al ubicarse en estas áreas. Al distinguirse a las razas europeas especializadas, como las más susceptibles a esta infección, se ha considerado como un serio impedimento para promoción de la ganadería en las regiones tropicales (McCosker, 1981). En México, junto con la anaplasmosis bovina, es responsable del 50% aproximadamente, de la mortalidad del programa "Ganado Mejor".

En la mayoría de los casos, la enfermedad cursa con un cuadro febril, anemia provocada por la destrucción de los eritrocitos, frecuentemente hemoglobinuria y, subsecuentemente la muerte. En ocasiones, cuando la infección por *Babesia bovis* es preponderante, se llega a observar clínicamente la aparición de signos nerviosos debido a la oclusión, con eritrocitos infectados, de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro (Smith *et al.*, 1980).

En otros países, existen productos inmunizantes elaborados a partir de cepas de *Babesia* multiplicadas en animales (Callow & Mellors, 1966), esto conlleva el riesgo de transmisión de otros agentes patógenos (Bock, *et al.*, 1992; Rogers *et al.*, 1988). Para prevenir esta enfermedad en nuestro país, se planteó la meta de desarrollar una vacuna que alcanzara al menos un 80% de protección en bovinos susceptibles, empleando el método del cultivo *in vitro* para la atenuación y reproducción de *B. bovis* (Levy & Ristic, 1980) y *B. bigemina* (Vega *et al.*, 1985a). Con este propósito, se llevaron al cabo varios experimentos para dilucidar las características del inmunógeno. En todos los ensayos se utilizaron animales *Bos taurus* de diversas razas, procedentes de una zona libre de garrapatas *Boophilus microplus* y serológicamente negativos a *Babesia spp.*, mediante la prueba de Inmunofluorescencia indirecta (IFI) (Goldman *et al.*, 1972).

## II. ESTRATEGIAS EXPERIMENTALES

**A.- Selección de la vía de inmunización:** Este primer estudio fue realizado para observar, entre otros, los cambios en la respuesta inmune de bovinos experimentalmente inoculados con una clona irradiada de *Babesia bovis*, derivada del cultivo *in vitro*. Para ello, se utilizaron 11 bovinos de 18 meses de edad. El primo inóculo, consistente en una suspensión de  $1 \times 10^8$  eritrocitos infectados (Ei) con una clona irradiada con  $^{60}\text{Co}$  de *Babesia bovis* (Rodríguez, 1983), se aplicó a grupos de dos animales cada uno, por las vías endovenosa (EV), intramuscular (IM) y subcutánea (SC). Así mismo, otro grupo de animales testigo, fue inoculado por la vía IM, con  $1 \times 10^8$  eritrocitos no infectados (En). Además de las variables hemáticas y de temperatura, se evaluó la respuesta de anticuerpos por la prueba de IFI. En las variables hemáticas estudiadas, los cambios no tuvieron significancia estadística, aunque resultaron más marcados cuando se aplicó la vía EV, sin arriesgar la sobrevivencia de los animales. La mejor respuesta de anticuerpos, en título alcanzado y persistencia, se observó en el grupo de animales inoculado por la vía IM. La ausencia de un desafío, no permitió determinar la relevancia protectora de los anticuerpos observados, sin embargo, si fue posible concluir que ante el estímulo de un aislado atenuado, se induce una mejor respuesta específica si se inoculan por la esta vía (Salas *et al.*, 1988).

**B.- Selección de un aislado atenuado de *Babesia bovis*:** Se llevaron al cabo varios ensayos para conocer la capacidad de protección de una clona de *Babesia bovis*, derivada del cultivo *in vitro* e irradiada con  $^{60}\text{Co}$ . Se utilizaron 24 bovinos Holstein entre 12 y 18 meses de edad, divididos al azar en seis grupos de cuatro animales cada uno. Cinco grupos

de animales fueron inmunizados por vía IM con dosis decimales crecientes,  $1 \times 10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$ ,  $10^8$  y  $10^9$  Ei de una suspensión fresca del cultivo de una clona de *Babesia bovis* (Rodríguez *et al.*, 1983), la cuál había sido atenuada por irradiación con  $^{60}\text{Co}$  y pases en cultivo *in vitro* (Rodríguez *et al.*, 1993). Un sexto grupo fue designado como testigo, recibiendo como inóculo  $1 \times 10^9$  En, por la misma vía. Cinco a siete días posinmunización, todos los animales vacunados presentaron signos, de leves a graves, clásicos de la infección por estos protozoarios, tales como incremento de la temperatura corporal, disminución del volumen celular aglomerado, y presencia de los parásitos en la sangre periférica, sin ser causa de muerte en ninguno de ellos. Siete meses después de la inmunización, los 23 animales restantes fueron confrontados con  $1 \times 10^8$  Ei con una cepa de *Babesia bovis* de campo, previamente caracterizada como virulenta. Los resultados demostraron que, sin importar la dosis empleada en la inmunización, los 19 animales vacunados sobrevivieron al desafío con la cepa de campo, sin mostrar signos de la enfermedad. En contraste, los cuatro animales del grupo testigo padecieron descensos severos del VCA, fiebre elevada por varios días y tuvieron que recibir quimioterapia para evitar su muerte. La ejecución de este ensayo permitió concluir que se contaba ya con un aislado de *Babesia bovis* atenuado, derivado del cultivo *in vitro* y denominado clona BOR-1; útil para su aplicación en procesos de inmunización del ganado susceptible (Cantó *et al.*, 1996), si se aplicaba por vía IM, a la dosis de  $1 \times 10^7$  Ei.

**C.- Selección de un aislado atenuado de *Babesia bigemina*:** Similarmente, en reconocimiento a la existencia de dos agentes etiológicos capaces de producir babesiosis en México, se llevaron al cabo los estudios para determinar la capacidad inmunoprotectora en bovinos de una cepa atenuada de *Babesia bigemina*. Para ello, se utilizaron 24 bovinos, mayores a un año de edad. La cepa inmunizante de *Babesia bigemina* fue aislada de un caso clínico y ha sido atenuada por su mantenimiento ininterrumpido en el cultivo *in vitro*. Para la determinación de la dosis mínima inmunizante se conformaron cinco grupos de cuatro animales cada uno, mismos que fueron inmunizados por vía IM, a las dosis décuples crecientes de  $1 \times 10^5$  a  $1 \times 10^9$  Ei de una suspensión fresca del cultivo de una cepa seleccionada de *Babesia bigemina*; un sexto grupo recibió por vía IM,  $1 \times 10^9$  En, designándosele como testigo. A estos animales se les dio seguimiento clínico y hematológico, detectándose además los valores de temperatura corporal y el porcentaje de eritrocitos parasitados (PEP). Durante la fase de inmunización, no se observaron cambios notorios en los parámetros indicados. La confrontación se llevó al cabo siete meses después de la vacunación, utilizando una cepa de laboratorio para desafío, a una dosis previamente determinada de  $1 \times 10^8$  Ei, aplicada también por vía IM. A los ocho días de la confrontación, se observaron parásitos en el torrente sanguíneo de todos los bovinos de los grupos vacunados, pero observándose fiebre  $>40.2^\circ\text{C}$  solamente en los animales del grupo inmunizado con la dosis  $1 \times 10^9$ . Los animales del grupo testigo, presentaron fiebre elevada, disminución mayor al 50% del VCA y parasitemia al día 9 pos-confrontación, haciéndose necesaria la aplicación de la quimioterapia para evitar su muerte. Los resultados de este trabajo, permitieron arribar a la conclusión de que la cepa utilizada de *Babesia bigemina*, denominada BIS-1, se comportó como atenuada y fue capaz de proteger

satisfactoriamente a los animales vacunados, cuando fueron desafiados con una cepa virulenta (Figueroa *et al.*, 1998). De este estudio, se identificó que la dosis de  $1 \times 10^7$ , fue aquella con la mejor respuesta en ambos casos, a la inmunización, y al desafío.

**D.- Comportamiento del inmunógeno fresco combinado de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*:** El siguiente y natural paso en la definición de la vacuna, fue el ensayo utilizando ambos aislados seleccionados e identificados como atenuados, la clona BOR-1 de *Babesia bovis* y la cepa BIS-1 de *Babesia bigemina*, en una sola inoculación. Los estudios se realizaron en dos etapas.

1.- *Inmunización previa a la introducción a una zona endémica:* Este ensayo tuvo como objetivo la comprobación de la capacidad inmunoprotectora de los dos aislados derivados del cultivo *in vitro*, en bovinos inmunizados en el altiplano mexicano (Querétaro), antes de ser introducidos a una región endémica (Veracruz) de babesiosis. Para ello, se utilizaron de animales mayores de 18 meses, divididos aleatoriamente en dos grupos de cinco bovinos cada uno. El primer grupo recibió por vía IM el inóculo experimental combinado, a una dosis de  $1 \times 10^7$  Ei de *Babesia bovis*, clona BOR-1 y  $1 \times 10^7$  Ei de *Babesia bigemina*, cepa BIS-1; contenidos en una suspensión en fresco del cultivo. El segundo grupo recibió por la misma vía, un inóculo equivalente, pero de eritrocitos normales no infectados; este grupo fungió como testigo. Durante la fase de inmunización los animales fueron monitoreados para la determinación de variables hemáticas, temperatura corporal y PEP en el frotis sanguíneo. En este período se logró detectar la presencia en sangre periférica de ambos parásitos, en todos los animales inoculados. La fiebre llegó a alcanzar los  $40^\circ\text{C}$ , con una leve disminución del VCA y todos los animales resultaron positivos en la prueba de IFI, para el día 12 pos vacunación. Ocho semanas después de la inmunización, los animales fueron trasladados al C.E. La posta, en Paso del Toro, Veracruz, para exponerse libremente a la infestación por garrapatas *Boophilus microplus*, por un período de 35 días, sin aplicar tratamiento acaricida alguno. Diez días post-introducción al potrero, todos los animales del grupo testigo, mostraron signos evidentes de una enfermedad severa, con fiebre  $>40.5^\circ\text{C}$ , disminución del VCA  $>45\%$  y presencia de *B. bovis* en el frotis de sangre periférica, siendo necesario la aplicación de la quimioterapia, para preservarles la vida. Los animales del grupo vacunado, también mostraron signos, pero más leves, de la infección, sin que fuera necesario la aplicación del tratamiento específico. La conclusión del experimento fue que el inmunógeno ofreció un 100% de protección al desafío de campo (Rojas *et al.*, 1995a)

2.- *Inmunización al momento de la introducción a una zona endémica:* En este estudio se planteó el propósito de corroborar la capacidad inmunoprotectora del inmunógeno combinado de cepas atenuadas de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* derivadas del cultivo *in vitro*, en bovinos inmunizados en el trópico. Se emplearon 20 bovinos mayores de 18 meses de edad, que fueron distribuidos aleatoriamente en dos grupos de 10 animales cada uno, y alojados en los corrales del C.E. La Posta, en Paso del Toro, Veracruz. Los animales del grupo uno, recibieron por vía IM, el inmunógeno experimental combinado a una dosis de  $1 \times 10^7$  Ei cada especie de *Babesia*, en una suspensión del cultivo en fresco; mientras que los animales del segundo grupo, sólo recibieron como inóculo, una suspensión de eritrocitos normales, actuando como testigo. Durante la etapa de inmunización, se tomaron

muestras periódicamente, de sangre y suero, para las determinaciones hemáticas y serológicas y se monitoreó la temperatura rectal. En todos los animales inmunizados, se comprobó la presencia de ambos parásitos, con un ligero incremento en la temperatura rectal, hasta 40°C por un día y un leve decremento en el VCA de 28% aproximadamente, recuperando los valores basales para el día 21 post-introducción. Los animales testigos permanecieron sin cambios, con excepción de un ligerísimo descenso metabólico del VCA de 17%. En la etapa de confrontación, todos los animales fueron liberados en un potrero del mismo C.E. infestado con garrapatas *Boophilus microplus*. A los 10 días post-liberación (PL) al potrero, todos los animales del grupo testigo presentaron signos de Babesiosis aguda, con fiebre en el rango de 40.5 a 41.0°C hasta por seis días, súbito descenso del VCA, con una reducción de hasta 45% aproximadamente, requiriéndose la aplicación del tratamiento específico para el día 13 PL. Los bovinos inmunizados, presentaron ligera fiebre hasta 40.1°C y parásitos intraeritrocíticos para el día 11. La reducción del VCA alcanzó valores del 40% aproximadamente y controlando por sí solos la infección. Solo tres animales vacunados requirieron tratamiento. Los animales en ambos grupos presentaron incrementos en el título de anticuerpos a partir del día 14 PL, según la prueba de IFI. Entre las conclusiones de este trabajo, se destaca que a los 21 días post-inmunización, ya se alcanza una protección del 70% (Rojas *et al.*, 1995b); de esta manera, es recomendable que transcurra un período mayor, para dar oportunidad al sistema inmunológico de desarrollar una mayor respuesta protectora.

**E.- Comportamiento del inmunógeno congelado mixto de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*:** Para preservar la viabilidad del inmunógeno en estudio, ambas cepas selectas, fueron congeladas individualmente de acuerdo a los procedimientos descritos con anterioridad en la literatura (Palmer *et al.*, 1982; Vega *et al.*, 1985b), ajustando las concentraciones de eritrocitos infectados. En este trabajo, se utilizaron 24 novillos de 14 ó más meses de edad, los cuales fueron alojados en un rancho en el altiplano mexicano, también reconocido como zona libre de garrapata *Boophilus* spp. Se conformaron seis grupos de cuatro animales cada uno. Los primeros cuatro grupos recibieron respectivamente por vía IM, el inóculo mixto que había sido congelado en dosis crecientes, como sigue:  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $5 \times 10^8$  Ei de cada una de las cepas vacunales. El quinto grupo fue inoculado con  $1 \times 10^7$  Ei de una suspensión en fresco del cultivo, por cada especie; y el último grupo permaneció como testigo sin vacunar. De manera similar a los estudios anteriores, se colectaron muestras de sangre para la medición de variables hemáticas. Durante la fase de inmunización, no se observaron cambios significativos, aunque si se determinó un leve descenso en el valor del VCA, para todos los grupos que recibieron los parásitos. Cuatro meses después, los animales fueron introducidos a un potrero infestado con garrapatas *Boophilus microplus*, en el C.E. La Posta, en Paso del Toro, Veracruz; para un desafío de campo en forma natural y sin aplicar ningún tratamiento acaricida. Entre 11 y 17 días post-liberación al potrero, con excepción de dos animales, todos los demás estaban positivos a la presencia de ambos parásitos. El máximo decremento del VCA en los grupos vacunados fue del 36%, en comparación con el grupo testigo que alcanzó un poco más del 57% de decremento. Todos los animales testigo

enfermaron gravemente de babesiosis y a pesar de haber recibido el tratamiento específico, uno de ellos murió. La protección obtenida con el inmunógeno congelado fue del 87.5%, mientras que con el inmunógeno en fresco, se ratificó el 100% de protección. En este estudio se pudo homologar que la dosis doble de  $1 \times 10^8$  Ei del inmunógeno congelado, se comporta de manera similar al inmunógeno en fresco a la dosis de  $1 \times 10^7$  Ei de ambas especies (Santos *et al.*, 1996).

**E.- Validaciones de campo del inmunógeno congelado mixto de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina***: Con la definición de la dosis idónea para proteger al ganado contra esta enfermedad, se han realizado algunas demostraciones de campo, aplicando la vacuna congelada. Al respecto, por recomendación de la Dirección General de Salud Animal, se escogieron sitios geográficamente distintos del posible origen de las cepas vacunales, con el propósito de confrontarlas con cepas heterólogas en el campo. Uno de ellos es la vertiente del Océano Pacífico y el otro, la península de Yucatán.

1.- *Litoral del Océano Pacífico*: En este trabajo, se utilizaron 15 bovinos distribuidos en tres grupos de 5 animales cada uno. En su lugar de origen, en Cuatro Ciénegas, Coahuila, los animales del primer grupo fueron vacunados con  $1 \times 10^8$  Ei de cada especie de *Babesia*, derivadas del cultivo *in vitro* y previamente congelados. Los animales del segundo grupo fueron igualmente vacunados por la misma vía y a la misma dosis, pero la suspensión de Ei antes de su congelación, provenía de animales multiplicadores. El tercer grupo permaneció como testigo sin vacunar. Durante la inmunización no se observaron signos clínicos relevantes. Para su confrontación de campo, los animales fueron trasladados al C.E. El Verdineño, en Sauta, Nayarit, ubicado en una zona endémica de Babesiosis. El día 39 post-vacunación, los animales fueron liberados en el potrero infestado, permitiendo su libre exposición a las garrapatas infestadas, ya que no se aplicó ningún tratamiento acaricida. La reducción máxima del VCA fue de 38, 23 y 65% aproximadamente, para los grupos vacunados y testigo respectivamente. La protección alcanzada con ambas vacunas fue del 100% (Cantó *et al.*, 1999), en comparación con el lote testigo.

2.- *Península de Yucatán*: En esta demostración, se utilizaron 16 hembras mayores de 18 meses, distribuidas en dos lotes de ocho animales cada uno, el que recibió la vacuna doble congelada y el testigo, respectivamente. Otros cuatro animales, se vacunaron individualmente, dos para cada especie de *Babesia*, para monitorear la infección de campo. La inmunización se llevó al cabo en el rancho "GB", en Amazcala, Querétaro y al cabo de cuatro semanas los animales fueron trasladados al C.E. Tizimín, en Tizimín, Yucatán, distante 2,400 km. Después de un breve descanso, los animales fueron liberados a los potreros el día 35 post-inmunización, para exponerse de forma natural a la infestación por garrapatas, y sin recibir tratamiento acaricida alguno. Durante el desafío, todos los animales mostraron fiebre, pero solo animales del grupo testigo, habían requerido tratamiento específico para controlar la infección por *Babesia* spp. (J.A. Ramos, 1999 = Comunicación Personal)



### III. DISCUSIÓN

La estrategia implementada para el desarrollo de la vacuna fue cubriendo los aspectos más importantes requeridos para su aprovechamiento en las condiciones del campo. Para empezar, la aplicación del inmunógeno por vía intramuscular, no solo favoreció el desarrollo de la respuesta inmune específica, sino que también facilitó la aplicación masiva del producto en condiciones de campo, por su comodidad y rapidez.

El gran éxito de este inmunógeno, según se destaca en los experimentos exhibidos, está basado primordialmente en la selección de los aislados, que aún cuando conservan su infectividad para el huésped bovino, no son capaces de producir la enfermedad clínica, lo que los determina con el carácter de atenuadas. El haber coincidido en la selección de los dos aislados, uno para cada especie del protozooario, también fue una gran coincidencia que le otorga una gran versatilidad al inmunógeno. En un ensayo de campo, efectuado por los mismos autores del presente trabajo, había demostrado que las vacunas de manera individual, no eran capaces de inducir una respuesta inmune suficiente para controlar la infección mixta en condiciones de campo; pero el uso del inmunógeno combinado fresco, ofreció una protección del 100%, en comparación con las vacunas individuales (Vega *et al.*, 1999). Esta ventaja se hace evidente en todos los ensayos posteriores. Otra interrogante era que si la aplicación de doble cantidad de antígeno tuviese un efecto detrimental en el animal vacunado, al incluir en el inmunógeno a las dos especies parásitas. En este producto, no se encontró efecto negativo por tal causa; esto es comprensible, ya que en los primeros ensayos de titulación de la dosis inmunizante, se llegaron a emplear hasta 100 veces más antígeno vivo, que en la vacuna mixta, en la que solo se duplica la dosis.

El uso del inmunógeno elaborado en fresco, resultaba poco práctico y difícil de constatar, por lo que se aplicó la estrategia de congelar los inóculos, para preservarlos viables por un período mayor, hasta aproximadamente dos años después de su elaboración. Con esta característica es posible elaborar lotes de vacuna, inclusive individualmente según la especie, y al mismo tiempo, estar en condiciones de almacenarla hasta el momento de su uso en forma óptima.

Otro aspecto relevante en este desarrollo tecnológico, fueron las validaciones en campo, aun cuando se mantuvieron algunos parámetros de evaluación, como la medición de la respuesta inmune ó los valores hemáticos; en todos los casos, se trató de reproducir las condiciones del ganadero productor, por lo que los resultados obtenidos son altamente satisfactorios, al superar ampliamente la meta de 80% de protección, como se estableció al principio de la investigación. Otra ventaja más, derivada de los ensayos en el campo en sitios diferentes como son Nayarit y Yucatán, fue que se logro demostrar claramente que estos aislados en particular, por ser de origen mexicano, tienen el mosaico antigénico que les permite inducir la respuesta inmune específica, capaz de procurar la protección de los animales vacunados, independientemente del origen de la cepa de confrontación. No escapa a las observaciones en estas demostraciones de campo, que los desafíos se prolongaron mas allá del período en el que ocurrían en Veracruz, debidas a las naturales diferencias ecológicas y, probablemente, antigénicas.

Finalmente, la meta establecida se cubrió ampliamente al cumplirse con las expectativas propuestas, desarrollándose una vacuna bivalente a partir de cepas atenuadas de *B. bovis* y *B. bigemina*, derivadas del cultivo *in vitro* altamente efectiva.

#### IV. RESUMEN

La Babesiosis bovina es una enfermedad endémica en México, causada por: *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* y se le considera como un grave obstáculo para el desarrollo de la ganadería. Para prevenirla, existen algunos productos inmunizantes elaborados a partir de cepas de *Babesia* multiplicadas en animales, los que significa un riesgo de transmisión de otros agentes patógenos. Con el propósito de dilucidar las características idóneas para una vacuna, con base en el uso del método del cultivo *in vitro*; se plantearon varios experimentos. En todos los ensayos se utilizaron animales procedentes de áreas libres de garrapatas *Boophilus microplus* y serológicamente negativos a *Babesia spp.* en la prueba de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI). En el primer ensayo, se comparó la respuesta inmune inducida por una cepa de *B. bovis* irradiada, aplicada por diferentes vías de inoculación, resultando la vía intramuscular (IM) la que presentó mayor duración e incremento en el título de anticuerpos, en comparación con las otras rutas. En ensayos subsecuentes, la ruta IM fue seleccionada como la vía de inmunización. Seguidamente, se comparó la patogenicidad de diversos aislados de *B. bovis* y *B. bigemina* a diferentes dosis. Las sub-poblaciones derivadas del cultivo *in vitro*, indujeron cambios menores por pocos días; en contraste con los otros aislados que presentaron un comportamiento más severo. A la confrontación, seis a siete meses más tarde, con  $1 \times 10^8$  Eritrocitos infectados (Ei) con aislados virulentos se observó que la resistencia inducida por las cepas derivadas del cultivo fue suficiente para evitar la aparición de signos notables de la enfermedad y que la dosis con mejor respuesta fue la de  $1 \times 10^7$  en ambos casos. En el siguiente ensayo, se aplicó en forma simultánea una suspensión del cultivo *in vitro* en fresco, que contenía  $1 \times 10^7$  Ei de cada una de las subpoblaciones seleccionadas, demostrándose su inocuidad. Ocho semanas post-vacunación, los animales fueron transportados a Paso del Toro, Veracruz, para ser expuestos libremente a la infestación natural con garrapatas infectadas, en una confrontación de campo, alcanzándose un 100% de protección. En otro ensayo similar, los animales fueron inmunizados con la misma dosis de Ei, al momento de su arribo al rancho, manteniéndoseles en confinamiento por tres semanas, antes de su liberación a los potreros infestados. Igual que en el ensayo anterior, la infección inicial por las cepas vacunales, fue insuficiente para producir algún trastorno clínico; sin embargo, al desafío, la protección observada fue del 70%. En otro experimento, los animales susceptibles fueron inmunizados con suspensiones de Ei previamente congelados a diferentes dosis, de  $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  y  $5 \times 10^8$ , de cada una de las cepas vacunales. En el desafío en condiciones de campo, a las 16 semanas de vacunados, se encontró que la protección fue del 87.5%. Otros dos ensayos de vacunación con material congelado, empleando las mismas dosis, permitió obtener una protección del 100%, cuando los animales fueron expuestos en condiciones de campo similares, pero en sitios geográficamente distintos, como son el litoral del Océano Pacífico y en la península de Yucatán. Se concluye que la inocuidad demostrada por las

subpoblaciones seleccionadas de *B. bovis* y *B. bigemina*, derivadas del cultivo *in vitro*, junto con los niveles de protección alcanzados en los diferentes desafíos, permiten recomendar la aplicación de esta vacuna en programas de inmunización preventivos, para aquellos bovinos cuyo destino sea una zona endémica de babesiosis.

## V. SUMMARY

Bovine babesiosis is a tick-borne endemic disease in Mexico, caused by intra-erythrocytic protozoa of the genus *Babesia*. Only two species have been recognized as present in our country, *Babesia bovis* & *Babesia bigemina*. Disease prevalence is higher in tropical and subtropical areas, including those in which *Boophilus spp.* ticks are commonly found. Along with Anaplasmosis, another hemoparasite infection causes 50% of the mortality rate in livestock development programs, which promote introduction of highly specialized European breeds, which are very susceptible to this infection. Fever, anemia, hemoglobinuria and death characterize the disease; if *Babesia bovis* infection prevails, sick animals may also show central nervous system signs. Vaccines are available in different countries. They are prepared in animals where vaccine strains multiply. This production method has been responsible for the transmission of other disease agents. The *in vitro* culture procedure used to multiply *B. bovis* and *B. bigemina* may diminish that risk. Our goal was to develop a vaccine based on the *in vitro* culture methodology; capable to protect at least 80% of vaccinates in Mexico against bovine babesiosis. Therefore, several experiments were designed and carried out to define such a vaccine. In all trials, animals were purchased in a *Boophilus microplus*-free region and selected to be free of antibodies against *Babesia sp.* by the Fluorescent Antibody Test (FAT), among other requirements. In the first study, an *in vitro*-derived *B. bovis* irradiated subpopulation was inoculated into susceptible calves using three different routes and, elicited immune responses were compared. Intramuscular (IM) injection showed the best results, as antibody titers were higher and lasted longer, than those induced by subcutaneous or intravenous inoculations. This inoculation route was used subsequently. In order to assess their virulence, other *B. bovis* or *B. bigemina* isolates, were injected at different ten-fold increasing doses in groups of four animals. In all cases, *in vitro* culture-derived subpopulations showed minimum virulence. In contrast, other isolates caused more severe changes. Six or seven months after recovery, animals were challenged with  $1 \times 10^8$  infected erythrocytes (Ei) of virulent strains. Those that received the *in vitro* culture-derived subpopulations IM at a dose of  $1 \times 10^7$  either with *B. bovis* or with *B. bigemina*, were able to survive challenge infection without showing significant signs of the disease. In another experiment, animals were inoculated with  $1 \times 10^7$  Ei of both *B. bovis* and *B. bigemina in vitro* culture fresh suspensions. Clinical signs and hematological determinations, such as PCV and PPE values, clearly showed that the combined effect of both strains was innocuous to the animals. Eight weeks after immunization animals were moved to Veracruz, a *Babesia spp.* endemic zone, where they were freely exposed to *Bo. microplus* infected ticks. A 100% protection to natural challenge was achieved. In a similar study, animals vaccinated at arrival in Veracruz's



premises showed only mild hematological and clinical signs during the immunization period. Three weeks later, they were challenge exposed to naturally infected *Ba. microplus* ticks, reaching 70% protection. In the next experiment, susceptible animals were inoculated with increasing doses ( $1 \times 10^7$ ,  $5 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$  and  $5 \times 10^8$ ) of previously frozen culture suspensions of both, *in vitro* culture-derived *B. bovis* and *B. bigemina* attenuated strains. Sixteen weeks after immunization, animals were field challenged by exposing to *Ba. microplus* infected ticks. Overall protection reached was 87.5% for vaccinates, in comparison to 0% of controls; the combined  $1 \times 10^8$  frozen suspension achieved better results during both, immunization and challenge stages. Two more field trials were carried out by immunizing animals with the combined  $1 \times 10^8$  frozen suspension, in a tick-free area. Later on they were moved, in one trial to a ranch near the Pacific coast and, in the other, to the Yucatan peninsula; two geographically distant locations, different from Veracruz and where bovine babesiosis is also prevalent. In both cases, 100% protection was achieved with a similar natural challenge exposure procedure. It is concluded that since the selected, *in vitro* culture-derived *B. bovis* and *B. bigemina*, subpopulations are attenuated, and also capable of inducing a strong enough protective immune response; they can be recommended to be used in one vaccine. It will be very useful in preventive immunization procedures for susceptible cattle, which are going to be introduced in tropical and subtropical areas where bovine babesiosis is present.

#### AGRADECIMIENTOS

Por este medio, agradecemos la participación y colaboración de nuestros colegas del INIFAP, ubicados en los Campos Experimentales, sin cuya ayuda, no hubiera sido posible realizar estos trabajos.

Agradecemos a las diversas organizaciones que colaboraron con este proyecto a lo largo de varios años, entre los que se encuentra La Universidad de Illinois, pionera en el desarrollo del método del cultivo *in vitro* y La Universidad de Missouri-Columbia, fuente de conocimiento y de amistades.

Adicionalmente, deseamos manifestar nuestro agradecimiento al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), que respaldó financieramente estudios de posgrado y algunos proyectos de investigación.

#### REFERENCIAS

- Álvarez M., J.A. & Cantó A., G.J. 1985 "Epidemiología de la Babesiosis" En: Soc. Mex. Parasitol. (Eds.) *PARASITOLOGÍA*: Volumen Conmemorativo; México, D.F. pp.55-72.
- Bock, R.E., De Voss, A.J., Kingston, T.G., Shields, I.A. & Dalgliesh, R.J. 1992 "Investigations of breakdowns in protection provided by living *Babesia bovis* vaccine. Vet. Parasitol. 43:45.



- Callow, L.L. & Mellors, L.T. 1966 "A new vaccine for *Babesia argentina* infection prepared in splenectomized calves" Aust. Vet. J. 42:464-
- Cantó A., G.J., Figueroa M., J.V., Álvarez M., J.A., Ramos A., J.A. y Vega y M., C.A. 1996 "Capacidad inmunoprotectora de una clona irradiada de *Babesia bovis* derivada de cultivo *in vitro*" Tec. Pecu. Mex. 34:127-135.
- Cantó, G.J., Figueroa, J.V., Santos, N., Vega, C., Rojas, E.E., Ramos, J.A. y Vega, C.A. 1999 "Evaluación de la capacidad protectora de dos inmunógenos mixtos de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina* contra un desafío heterólogo de campo" Memorias: XIV Congreso Latinoamericano de Parasitología, 14-16 de octubre; Acapulco, Guerrero. pp. - .
- Figueroa M., J.V., Cantó A., G.J., Álvarez M., J.A., Lona G., R., Ramos A., J.A. & Vega y M., C.A. 1998 "Capacidad protectora en bovinos de una cepa de *Babesia bigemina* derivada de cultivo *in vitro*" Tec. Pecu. Mex. 36:95-107.
- Goldman, M., Pipano, E. y Rosenberg, A.S. 1972 "Fluorescent antibody tests for *Babesia bigemina* and *Babesia berbera*" Res. Vet. Sci. 13:77-79.
- Levy, M. & Ristic, M. 1980 "*Babesia bovis*: continuous cultivation in microaerophilus stationary phase culture" Science 207:1208.
- McCosker, P.J. 1981 "The global importance of Babesiosis" En: Ristic, M. & Kreier, J.P. (Eds.) *BABESIOSIS*; New York, New York. *Academic Press*. pp. 1-24.
- Palmer, D.A., Buening, G.M. & Carson, C.A. 1982 "Cryopreservation of *Babesia bovis* for *in vitro* cultivation" Parasitology 84:567- .
- Rodríguez, S.D. 1983 Development of a modified *in vitro* cultivation technique for *Babesia bovis* and its adaptation to cloning" M.Sc. THESIS University of Missouri-Columbia, EE.UU.
- Rodríguez, S.D., Buening, G.M., Green, T.J. & Carson, C.A. 1983 "Cloning of *Babesia bovis* by *in vitro* cultivation" Inf. Immun. 42:15-
- Rodríguez, S.D., Buening, G.M., & Carson, C.A. 1993 "Caracterización bioquímica preliminar de clones de *Babesia bovis* irradiadas con Co<sup>60</sup>" Tec. Pecu. Mex. 31:16- .
- Rogers, R.J., Dimmock, C.K., De Voss, A.J., & Rodwell, B.J. 1988 "Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced *in vivo* against bovine babesiosis and anaplasmosis" Aust. Vet. J. 65:285-287.
- Rojas R., E.E., Figueroa M., J.V., Vega y M., C.A., Ramos A., J.A. Álvarez M., J.A., Mosqueda G., J.J., Cantó A., G.J. y Santiago V., C. 1995a "Evaluación de un inmunógeno combinado de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. I.- Desafío de campo de bovinos inmunizados antes de su introducción a una zona endémica" Vet. Méx. 26:27.

- Rojas R., E.E., Figueroa M., J.V., Vega y M., C.A., Ramos A., J.A. Álvarez M., J.A., Mosqueda G., J.J., Cantó A., G.J. y Santiago V., C. 1995b "Evaluación de un inmunógeno combinado de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. II.- Desafío de campo de bovinos inmunizados en una zona endémica" Vet. Méx. 26:28.
- Salas T., E., García G., J., Ramos A., J.A., Rodríguez del R., E., Aboytes T., R., Buening, G.M. y Vega y M., C.A. 1988 "Patogenia de una clona irradiada de *Babesia bovis* obtenida de cultivo *in vitro*". Tec. Pecu. Mex. 26:36-45.
- Santos, N., Ramos, J.A., Figueroa, J.V., Rojas, E.E., Olvera, A., Santiago, C., Cantó, G.J. & Vega, C.A. 1996 "Desafío de campo de bovinos inoculados con un inmunógeno congelado mixto de *Babesia bovis* y *Babesia bigemina*. Memorias: XX Congreso Nacional de Buiatría 14-16 de agosto. Acapulco, Guerrero pp. 116-120
- Smith, R.D., Molinar, E., Larios, F., Monroy, J., Trigo, F. & Ristic, M. 1980 Bovine babesiosis: Pathogenicity and heterologous species immunity of tick-borne *Babesia bovis* and *B. bigemina* infections. Am. J. Vet. Res. 41:1957- .
- Vega, C.A., Buening, G.M., Green, T.J., & Carson, C.A. 1985a "*In vitro* cultivation of *Babesia bigemina*" Am. J. Vet. Res. 46:416-420.
- Vega, C.A., Buening, G.M., Green, T.J., Carson, C.A. & McLaughlin, K. 1985b "Cryopreservation of *Babesia bigemina* for *in vitro* cultivation. Am. J. Vet. Res. 46:421-423.



# DESARROLLO DE LA VACUNA DE *ANAPLASMA* EN MEXICO.

## *ANAPLASMA* VACCINES DEVELOPED IN MEXICO.

S.D. RODRÍGUEZ\*, M.A. GARCÍA ORTIZ\*, R. ABOYTES TORRES\*, G.J CANTÓ ALARCÓN\*\*, N. SANTOS CERDA\*\*\*

\* *CENID-Parasitología Veterinaria, INIFAP. SAGAR, México. A.P. 206, CIVAC*

\*\* *CENID-Fisiología, Carr. a Colón, Ajuchitlán Querétaro*

\*\*\* *Facultad de Ciencias Naturales; Universidad Autónoma de Querétaro.*

I. Introducción.....	211
II. Desarrollo de una vacuna mexicana.....	213
III. Resumen.....	215
IV. Summary.....	215
V. Referencias.....	215
Figura 1 .....	218
Figura 2 .....	219
Figura 3 .....	220
Figura 4 .....	221
Figura 5 .....	222

### I. INTRODUCCIÓN.

La anaplasmosis es una enfermedad infecciosa no contagiosa que afecta a los bovinos, ovinos y algunos rumiantes silvestres, El agente causal es el microorganismo del género *Anaplasma* (Drancourt y Raoult, 1994), que infecta los eritrocitos de los animales susceptibles, causando anemia severa y múltiples disturbios fisiológicos incluyendo abortos, depresión y la muerte. La distribución de la enfermedad es mundial, pero es de mayor importancia en las zonas tropicales y subtropicales (Ristic, 1980). *Anaplasma marginale* es el agente causal de la enfermedad en los bovinos, es el más patógeno de las especies reportadas (Ristic y Kreier, 1984) y el único presente en México (Osorno y Ristic, 1977).

La anaplasmosis se puede transmitir en forma biológica mediante garrapatas de los géneros *Boophilus spp.*, *Dermacentor spp.*, *Ixodes spp.*, y *Rhipicephalus spp.* (Sieber, 1910; Theiler, 1910; Ristic, 1968; Yeruham y Braverman, 1981; Potgieter y col., 1983; Zaugg y col., 1986; Kocän y col., 1986); en forma mecánica por insectos hematófagos como moscas de establo, mosquitos de los géneros *Siphona spp.* y *Psorophora spp.* y tábanos (Lotze, 1944; Howell, 1957; Ristic, 1968; Yeruham y Braverman, 1981); y en forma iatrogénica por

manipulaciones como castraciones, descornes y vacunaciones en los que los utensilios no han sido esterilizados adecuadamente.

La enfermedad se puede presentar en forma hiper aguda, con estados febriles  $41^{\circ}$  C, fallo cardio-pulmonar y muerte en periodos de 24 - 32 h; también existe una forma aguda, con fiebre  $40^{\circ}$  C, anemia progresiva, aborto y muerte o, presentarse en forma crónica en ausencia de signos clínicos típicos. Esto último puede resultar después de una infección aguda o una infección inducida (premunización, Lotze, 1947). Se piensa que los portadores crónicos asintomáticos, y algunos rumiantes silvestres, fungen como reservorios naturales y son los responsables de preservar el agente etiológico en la naturaleza (Ristic, 1980; Blood y col., 1983).

En estas condiciones, la producción de leche y carne decrece considerablemente y se desaprovecha el potencial de producción de las regiones tropicales comúnmente endémicas y, en particular de México, dificultando la constante introducción al trópico de ganado tipo europeo (*Bos taurus*), altamente sensible a la anaplasmosis (Alvarez, 1986).

A nivel mundial, la enfermedad origina pérdidas incalculables por muertes, baja de peso de los animales, abortos, costos de tratamientos, medidas preventivas y de control de vectores, además, los animales con casos crónicos recuperan su peso en periodos muy prolongados. En nuestro país, estudios económicos al respecto estimaron pérdidas por más de tres mil millones de pesos tan sólo en 1980 (delegación Mexicana, 1981), cifra que actualmente representaría más de 130 millones de dólares. Asimismo, en 1995 se le responsabilizó por el 26% de la mortalidad total registrada en bovinos de alto registro manejados dentro del programa nacional de mejoramiento genético "Ganado Mejor" (García y col., 1998), esto sin incluir pérdidas no reportadas en animales fuera de estos programas gubernamentales.

En México no existen alternativas comerciales para el control de la enfermedad y se continúa con el uso de sangre infectada proveniente de animales portadores o animales con infección aguda. En el primer de los casos, el riesgo existe de que la sangre no contenga el número adecuado de eritrocitos infectados para establecer la infección en los animales "vacunados", en el segundo caso, el período para mostrar la infección puede ser tan largo que los animales son dejados a su suerte para sufrir la infección en ausencia de monitoreo; en el segundo caso, la infección puede ser tan intensa y en un período tan corto que, en ausencia de monitoreo adecuado los animales pueden morir de una infección hiper aguda. Más aún el uso de esta metodología conlleva el riesgo de transmitir otros agente patógenos al través de la sangre como *Babesia spp*, *Brucella*, tuberculosis y virus como el de la diarrea viral bovina, la leucosis bovina, que podrían traer consecuencias desastrosa (Rogers, 1988). Alternativamente, los animales se introducen sin protección y son monitoreados hasta el momento en que comienzan a desarrollar una rickettsemia observable al microscopio, y se aplican medicamentos antes de que se presenten los signos clínicos de la enfermedad (quimioprofilaxis; Jorgensen y col., 1993). Este tipo de manejo lleva implícito el riesgo de tratar a los animales antes de que se desarrolle una respuesta inmune capaz de proteger contra las infecciones subsecuentes, lo que puede llevar a resultados desastrosos. Por otro lado el uso de vacunas que contienen elementos de la sangre o sus derivados en cantidades significativas,

puede provocar la presentación de isoeritrolisis neonatal (Dennis y col. 1970; Dimmock y col., 1970).

La urgencia de atender la necesidad de proteger contra la anaplasmosis a animales de alto registro, y particularmente aquellos que se manejan en los programas nacionales de mejoramiento genético, impulsó al INIFAP a realizar investigaciones conducentes al desarrollo de una vacuna que proteja en forma sólida y duradera contra el desafío natural en zonas de alta endemnicidad de nuestro país.

## II. DESARROLLO DE UNA VACUNA MEXICANA.

Estudios realizados en otros países han indicado que la vacunación contra la anaplasmosis es posible usando cuerpos de inclusión de la rickettsia confrontaciones homólogas y heterólogas (Montenegro, y col., 1991; Hart y col., 1987; Luther y col. 1989). Sin embargo pruebas para el registro en México de estas vacunas mostraron ausencia de protección contra el desafío con cepas mexicanas. (CONASA, 1995).

Para los siguientes estudios se han usado cepas de *A. marginale* de origen mexicano designadas de acuerdo a la localidad de origen y son las siguientes: MEX-15, aislada originalmente de un brote en un lote de engorda en el municipio de Texcoco en el estado de México y clasificada como de alta virulencia, MEX-17, aislada de un brote natural y clasificada como de alta virulencia y cepa MEX-31, donada por personal del CENAPA y clasificada como de baja virulencia (García y col. 1998, 1999 enviado). Los Experimentos descritos en el presente trabajo, se basaron en estudios de protección contra la anaplasmosis realizados en diferentes partes del mundo en los que se usaron cuerpos iniciales libres del residuos de membrana eritrocítica para la inmunización de animales susceptibles. Cuerpos iniciales liberados mediante centrifugación diferencial de sangre descongelada y sonicación (Palmer y McGuire 1984), con pequeñas cantidades de contaminantes de la membrana eritrocítica. Los trabajos iniciales mostraron que la inoculación de estos cuerpos iniciales al ser mezclados con adyuvante completo de Freund e inoculados en conejos no rindieron reacción contra las membranas del eritrocito pero si contra los cuerpos iniciales (Rodríguez y col. 1996, datos no publicados). En un primer estudio (Rodríguez y col. 1999) se usaron grupos de 5 bovinos que fueron inoculados con cuerpos iniciales de las tres cepas referidas anteriormente mezclados con un adyuvante sintético comercial basado en el trehalosa dicorinomicolato sintético (S-TDCM®) en aceite Drakeol 6 VR® (Ribi ImmunoChem Research Inc., Hamilton Montana, EE.UU. Donado amablemente por el Dr. Terry Ulrich). En este ensayo se usaron 3 grupos de animales que se vacunaron con la misma dosis del inóculo y un número igual de grupos que fungieron como testigos que recibieron un placebo. Los grupos vacunados y testigos fueron desafiados paralelamente, con una dosis de  $1 \times 10^8$  eritrocitos infectados de cada una de las cepas usadas en la vacuna experimental. Los resultados de este experimento confirmaron los esfuerzos de investigaciones hechas en otras partes del mundo, es decir, mostraron que la inmunización de animales susceptibles usando cuerpos iniciales indujo inicialmente un retraso y menor intensidad en la presentación de los signos clínicos lo que se traduce en protección

específica contra dos de los aislados usados en la vacuna como sigue: Los animales vacunados y confrontados con la cepa MEX-17 (Figura 1), presentaron rickettsemias 5% mientras que los animales testigos presentaron rickettsemias que variaron entre 10 y 20%, de la misma forma, se observó un mayor decremento en el volumen celular aglomerado de los animales testigos. Tres de los animales testigos tuvieron que ser tratados para evitar la muerte. Para esta cepa se determinó un 100% de protección. Al desafío los animales vacunados con la cepa MEX-15 (Figura 2), se observó que los signos clínicos fueron típicos en todos los animales testigos y todos ellos tuvieron que ser tratados, a pesar de lo cual uno de ellos murió. En el caso de los animales vacunados, todos los animales presentaron signos clínicos y dos de ellos se trataron para controlar la enfermedad, sin embargo uno de ellos murió. A pesar de esto, los promedios observados para el VCA y PEP existieron diferencias significativas entre los vacunados y los testigos. Por otro lado la confrontación con la cepa MEX-31 no indujo el cuadro clínico en ninguno de los animales por lo que no se pudo comprobar la protección. Estos resultados corroboran experiencias reportadas en Venezuela (Montenegro y col., 1991) y en los estados Unidos (Hart y col., 1987; Luther y col., 1989), y sirvieron como base para determinar que bajo las condiciones usadas, la protección es posible usando cepas mexicanas.

En experimentos subsiguientes se ensayaron dosis crecientes del inmunógeno para determinar una mejor dosis que indujera una protección más sólida al desafío homólogo. Dosis de cuerpos iniciales de cada aislado equivalentes a  $5 \times 10^9$ ,  $1 \times 10^{10}$  y  $2 \times 10^{10}$  eritrocitos infectados mezclados con el mismo adyuvante se inyectaron vía subcutánea a grupos de 5 animales. Los animales vacunados recibieron el inmunógeno en un calendario semejante al anterior y todos los grupos se confrontaron con la cepa MEX-15. Los resultados de estos experimentos mostraron que, excepto por un individuo, los animales vacunados con cualquiera de las dosis usadas presentaron un cuadro sub-clínico que fue casi inadvertido a la confrontación con la cepa MEX-15. La figura 3A muestra la cinética del VCA donde se aprecia como, a pesar de que se presenta un decremento en este parámetro en los grupos vacunados, este decremento es de menor intensidad y estadísticamente diferente ( $p \leq 0.05$ ) al observado en el grupo testigo. Asimismo, es altamente notoria y estadísticamente significativa ( $p \leq 0.01$ ) la diferencia entre la rickettsemias (Figura 3B) observadas para los grupos vacunados en los cuales el promedio más alto fue menor al 5%, comparado contra una media superior al 25% para los testigos. De los animales vacunados sólo el que murió, presentó fiebre  $340^\circ$  C por varios días, mientras que en los testigos todos presentaron fiebre y también un animal murió. Al ensayar los sueros de los animales vacunados en el ELISA usando como antígeno a la cepa MEX-30, se observó un incremento significativo en el título de anticuerpos específicos (Figura 4A). La inducción de estos anticuerpos fue detectable 10 días posteriores a la primera vacunación con un incremento notable coincidente con la segunda vacunación (Figura 4B), que alcanza su máximo (D.O.  $31$ ) alrededor de los 40 días post-vacunación y comienza a disminuir alrededor del día 60 pos-vacunación para estabilizarse en 0.4 20 días después. Al desafío, se observa que estos anticuerpos tienen un incremento notable para el día 10 pos-desafío. La vacunación sin embargo no indujo la producción de isoanticuerpos detectables al ELISA. La protección inducida en estos animales no previene que los animales dejen de ganar peso

durante el síndrome desarrollado por la confrontación, sin embargo si evita que la pérdida de éste sea significativa como se observa en la Figura 5. En este experimento, se observó que sin tomar en cuenta la muerte del animal del grupo II, los animales perdieron  $12.8 \pm 9.0$  kg durante el período crítico, comparado con los animales testigos que sufrieron una pérdida promedio de  $35.3 \pm 10.7$  kg que fue estadísticamente diferente ( $p \leq 0.01$ ) de la primera (Rodríguez y col., 1999).

Estudios como estos corroboran la posibilidad de iniciar la vacunación con cepas que prevengan la presencia de la enfermedad cuando se tiene o se debe introducir animales para el mejoramiento genético de hatos de baja producción. Mucho trabajo queda sin embargo por realizar para determinar si estas cepas serán capaces de proteger a animales infectados contra cepas heterólogas, en función de que se ha observado variabilidad en tanto en la virulencia (García Ortiz y col. 1998, 1999) así como en el perfil antigénico de cepas de localidades distantes (Kwak y col. 1989; Estrada y col 1999, datos no publicados). Aún cuando existe información que indica que antígenos relevantes para la protección se conservan en cepas distantes geográficamente (Tebele y col., 1991; Palmer y col., 1986; 1988). Los ensayos para determinar esta última posibilidad se están realizando actualmente y se demostrará si se requiere de cepas locales o si se podrán usar las que hasta el momento se han estudiado.

### III. RESUMEN.

La anaplasmosis bovina es el obstáculo más importante dentro de los programas de mejoramiento genético nacionales, ya que ocasiona el 26 % de la mortalidad total. En México no existen vacunas comerciales disponibles para el control de la enfermedad. Experimentos realizados con cuerpos iniciales purificados y mezclados con un adyuvante comercial presenta una posibilidad para el control de la enfermedad. Una vacuna experimental conteniendo cuerpos iniciales de tres cepas mexicanas fue ensayada en animales susceptibles y confrontados en forma paralela con cada una de las tres cepas contenidas en la vacuna mostrando una protección completa contra una de las cepas y parcial contra otra de ellas. Experimentos subsecuentes para determinar una dosis óptima mostraron que una dosis equivalente a de  $1.5 \times 10^{10}$  eritrocitos infectados es capaz de proteger al 100% de animales vacunados y confrontados con una cepa altamente virulenta contenida en el inmunógeno.

### IV. SUMMARY

Bovine anaplasmosis is considered the most important obstacle for beef cattle development in tropical and subtropical areas in Mexico and has been named responsible for 26 % of the total deaths incurred in National genetic improvement programs. In Mexico there are no commercial vaccines for the control of this disease. Partially purified initial bodies from three different *Anaplasma* strains, mixed with a commercial adjuvant have shown to induce complete protection against one, and partial protection against the most virulent strain included in the immunogen. Further experiments to determine an optimal dose showed that initial bodies

equivalent  $1.5 \times 10^{10}$  infected erythrocytes are capable to protect against an infection challenge with the most virulent strain included in the vaccine.

## V. REFERENCIAS

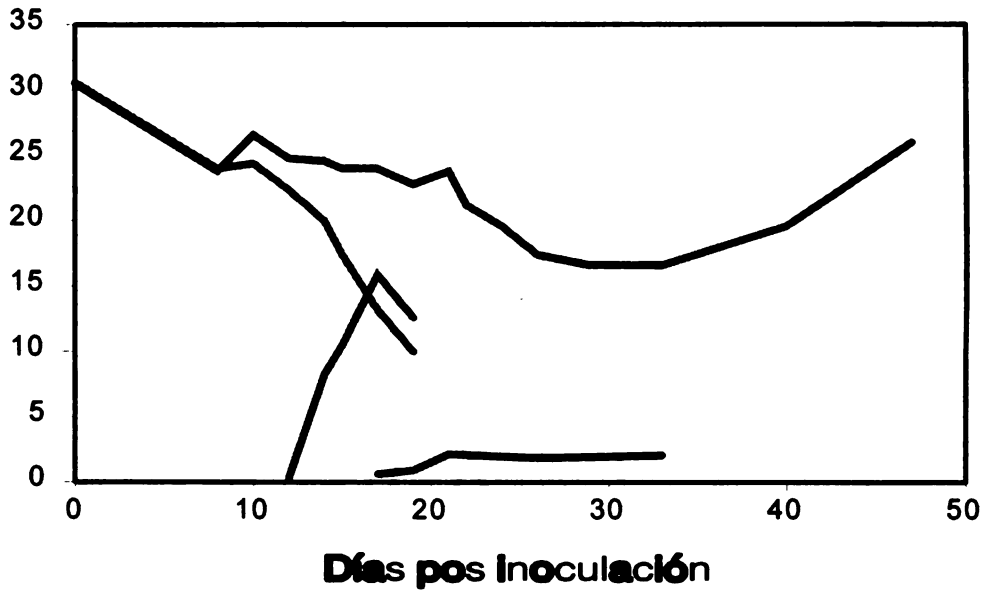
- Alvarez, J.A., 1986. Generalidades sobre manejo de programas de Salud animal bajo condiciones de clima tropical. Simposium sobre ganadería tropical. 2o Ciclo de Conferencias sobre Bovinos de Doble Propósito. Centro de Investigaciones Pecuarias Golfo-Centro, INIFAP-SARH, Veracruz, Ver.
- Blood, D.C., Radostits O.M, Henderson J.A.. 1983. Veterinary medicine, 6th ed. Balliere-Tidall. Eastbourne, Great Britain.
- CONASA,. Experiencias sobre el uso de vacunas contra *Anaplasma marginale*. Memoria de la IV Reunión Anual. 14-17 de nov. México D.F. 1995; pp. 452.
- Delegación Mexicana. 1981. Estimación de pérdidas económicas por enfermedades en la ganadería mexicana durante el año de 1980. Bull. Off. Int. Epiz. 93(5-6):903-905.
- Dennis R A, O'Hara P J, Young M F, Dorris K D. 1970. Neonatal immunohemolytic anemia and icterus of calves. J. Am. Vet. Med. Assoc. 156(12):1861-1869.
- Dimmock C K, Bell K. Hemolytic disease of the newborn in calves. Aust. Vet. J.1970; 46:44.
- Drancourt. M, Raoult D. 1994. Taxonomic position of the rickettsiae: current knowledge. FEMS-Microbiol-Rev. 13(1):13-24
- García Ortiz M A, Angeles Ojeda L E, Hernández Salgado G, García Tapia D.,Aboytes Torres R., Rodríguez Camarillo S D. 1998. Caracterización de la virulencia de un aislado mexicano de *Anaplasma marginale*. Tec. Pec. Mex. 36(3);197-202.
- García Ortiz M A, Aboytes Torres R, Hernández Salgado G, Rodríguez S D. 1999. Caracterización de la virulencia de dos aislados Mexicanos de *Anaplasma marginale*. Veterinaria México. Enviado.
- Hart L T, Todd W J, Luther D G, Hoyt P G, Morris N G, McDonough K C, Hoyt M J. Progress toward an improved vaccine for anaplasmosis. Louisiana Agriculture 1987; 31:3.
- Howell, D.E. 1957. Transmission of anaplasmosis by arthropods. In: Proceedings 3rd National Research Conference on Anaplasmosis in Cattle, Manhattan, Ks. pp14-16.
- Jorgensen, W K., Bock R E, Kingston T G, de Vos A J. Waldron S.J. 1993. Assesment of tetracycline and *Babesia* culture supernatant as prophylactics for moderating reactions in cattle to live *babesia* and *Anaplasma* vaccines. Aust. Vet. J. 70:35-36.
- Kocän, K.M., Holbert D, Edwards W, Ewing S.A, Barron S.J, Hair J.A.. 1986. Longevity of colonies of *A. marginale* in midgut epithelial cells of *Dermacentor andersoni*. Am. J. Vet. Res. 47:1657-1661.
- Kwak YR, Hungerford LL, Smith RD. 1989. Kinetics of antigen recognition by *Anaplasma marginale*-infected cattle. Proceeding: Eight National Veterinary Hemoparasite Disease Conference. St Louis, Mo. pp 39-48.
- Lotze, J.C. 1944. Carrier cattle as a source of infective material for horsefly transmission of anaplasmosis. Am.J. Vet. Res. 5:164-165.

- Lotze, J.C. 1947. Variables and constants in bovine anaplasmosis and their relationship to chemotherapy. *Am J. Vet Res.* 8, 267-274.
- Luther DG, Hart LT, Todd WJ, Morris NG, Taylor ND, McRae JW. 1989. Field studies of an experimental anaplasmosis vaccine on pregnant cows and neonatal isoerythrolysis. Proceedings of Eight National Veterinary Hemoparasite Disease Conference, St. Louis, MO.; pp559-562.
- Montenegro S, James MA, Benitez MT, Leon E, Baek BK, Guillen AT. 1991. Efficacy of purified *Anaplasma marginale* initial bodies as vaccine against anaplasmosis. *Parasitol. Res.* 77:93-101.
- Osorno, BM, Ristic M. 1977. Anaplasmosis bovina con énfasis en control, diagnóstico, distribución de la enfermedad en México y uso de una vacuna atenuada de *Anaplasma marginale*. *Vet. Mex.* 8:85.
- Palmer G H, Barbet A F, Davis W C, McGuire T C. 1986. Immunization with an isolate-common surface protein protects cattle against anaplasmosis. *Science.* 231(4743):1299-1302.
- Palmer G H, Barbet A F, Musoke A J, Katende J M, Rurangirwa F, Shkap V, Pipano E, Davis W C, McGuire T C. 1988. Recognition of conserved surface protein epitopes on *Anaplasma marginale* isolates from Israel, Kenya and the United states. *Int. J. Parasitol.* 18:33-38.
- Palmer G H, McGuire T C. Immune serum against *Anaplasma marginale* initial bodies neutralizes infectivity for cattle. *J. Immunol.* 1984; 133(2):1010.
- Potgieter FT, Rensburg L. Infectivity virulence and immunogenicity of *Anaplasma centrale* live blood vaccine. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 1983; 50: 29-31.
- Ristic, M. 1968. Anaplasmosis. In: Blood diseases of Man and animals. Vol. 2, Weinmand., Ristic, M. (eds). Academic Press., Inc., New York, N.Y. pp 474-537.
- Ristic M. Anaplasmosis. En: Bovine Medicine and Surgery ed. by H.I. Amstutz, Am. Veterinary Publications, Inc. 2nd Ed. Vol. 1 Sta Barbara, Cal. 1980; pp 324.
- Rodríguez Camarillo S D, García Ortiz M A, Cantó Alarcón G J Hernández Salgado G, Santos Cerda N, Aboytes Torres R. 1999. Ensayo de un inmunógeno experimental inactivado contra *Anaplasma marginale*. *Tec. Pecu. Mex.* 37(1); 1-12.
- Rodríguez S D, García Ortiz M A, Hernández Salgado G, Santos Cerda N, Aboytes Torres R, Cantó Alarcón G J. 1999. Dose titration of an inactivated *Anaplasma marginale* experimental vaccine against a homologous challenge. *Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases. Aceptado*
- Rogers R J, Dimmock C K, de Vos A J, Rodwell B J. Bovine leucosis virus contamination of a vaccine produced *in vivo* against bovine babesiosis and anaplasmosis. *Aust. Vet. J.* 1988; 65:285.
- Sieber, H. 1910. Uber *Anaplasma marginale*. *Ber. Tieraztl. Wschr.* 50:993-998.
- Tebele, N. and G.H. Palmer. 1991. Crossprotective immunity between the Florida and a Zimbabwe stock of *Anaplasma marginale*. *Trop. Anim. Hlth. Prod.* 23:197-202.

- Theiler, A. 1910. *Anaplasma marginale*: The marginal points in the blood of cattle suffering from specific diseases. Rep. Gov. Vet. Bact. Transv. 1908-1909, 7-64.
- Yeruham, I, Braverman Y. 1981. The transmission of *A. marginale* to cattle by blood-sucking arthropods. Refuah. Vet. 38(1-2): 37-44.
- Zaraza H, Kuttler KL. 1971 Comparative efficacy of different immunization systems against anaplasmosis. Trop. Anim. Hlth. Prod.; 3:77-82
- Zaugg, J.L., D. Stiller, M.E. Coan and S.D. Lincoln. 1986. Transmission of *Anaplasma marginale* (Theiler) by males of *Dermacentor andersoni* (Stiles) fed on Idaho field-infected chronic carrier cow. Am. J. Vet. Res. 47:2269-2271.

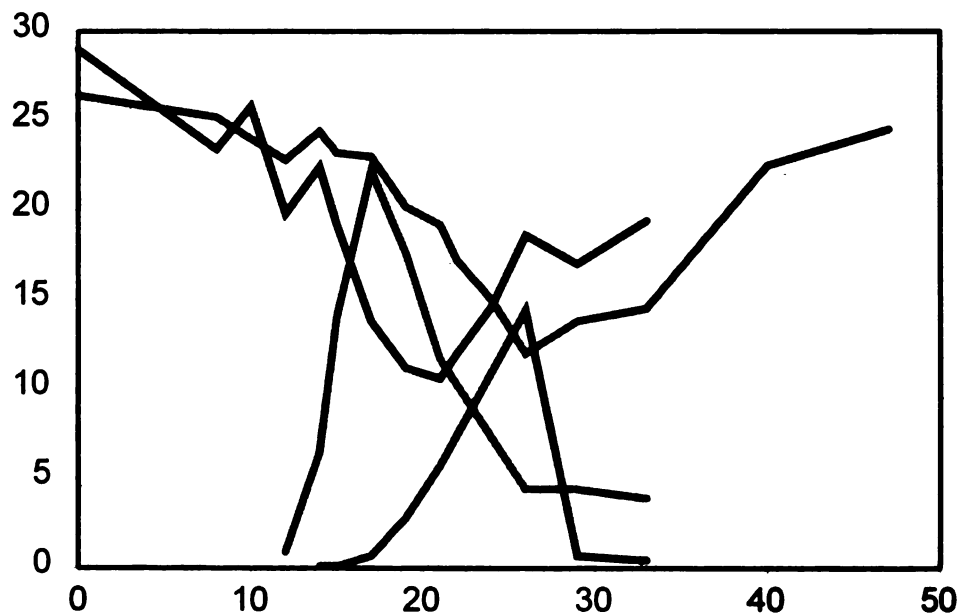


**Figura 1. Rickettsemia (PEI) y Volumen Celular Aglomerado (VCA) de animales vacunados y testigos, confrontados con *A. marginale* Mex -17**



**Días pos Inoculación**  
**Los animales se vacunaron los días cero y 24 y se confrontaron con una dosis de 100 millones de eritrocitos infectados de la cepa MEX-17. Porcentaje de eritrocitos vacunados (PEP) vacunados — ; VCA vacunados — ; PEP testigos — ; VCA Testigos —**

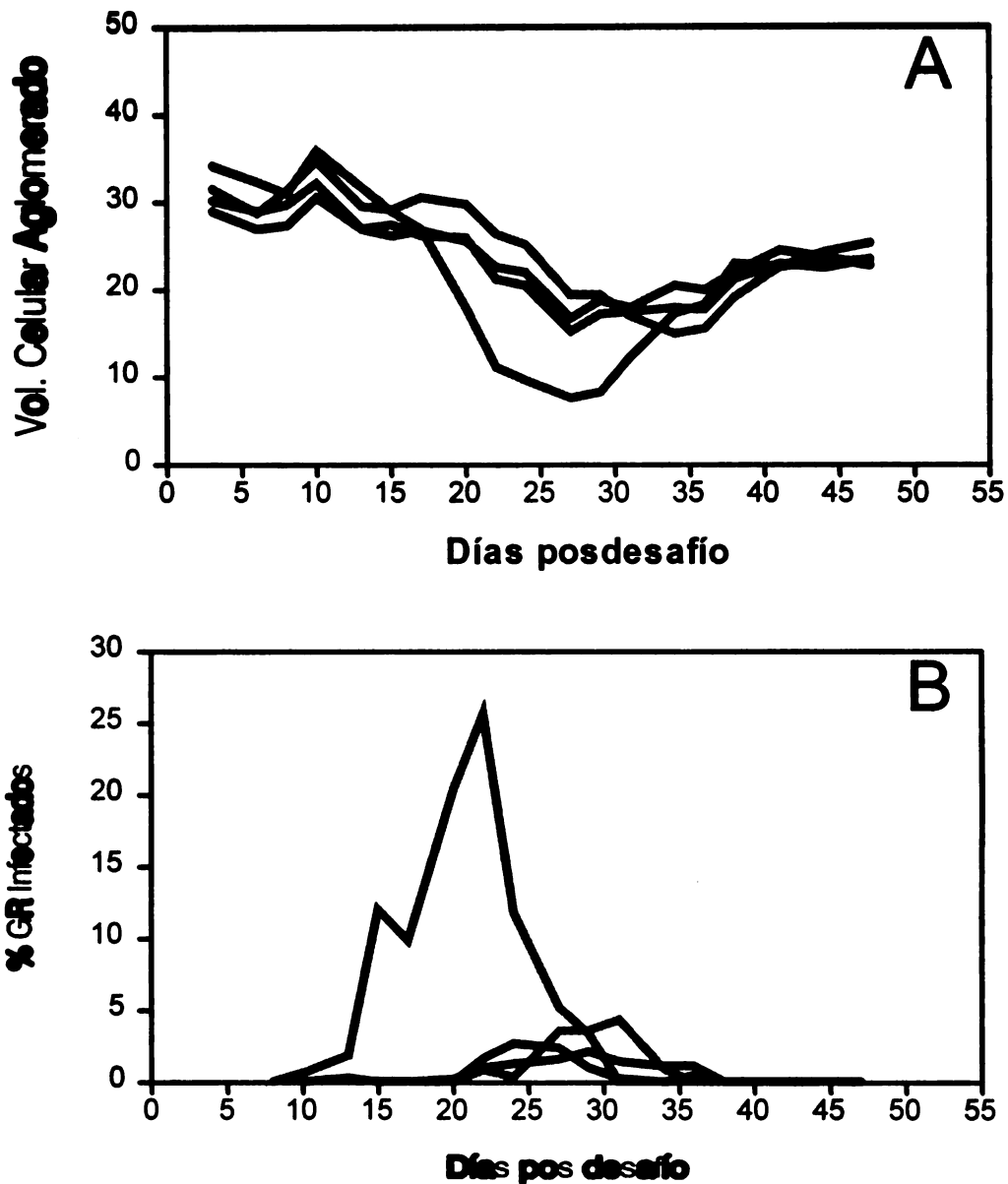
**Figura 2. Rickettsemia y volumen celular aglomerado de animales vacunados y testigos, confrontados con A. marginale Mex-15**



**Día pos Inoculación**

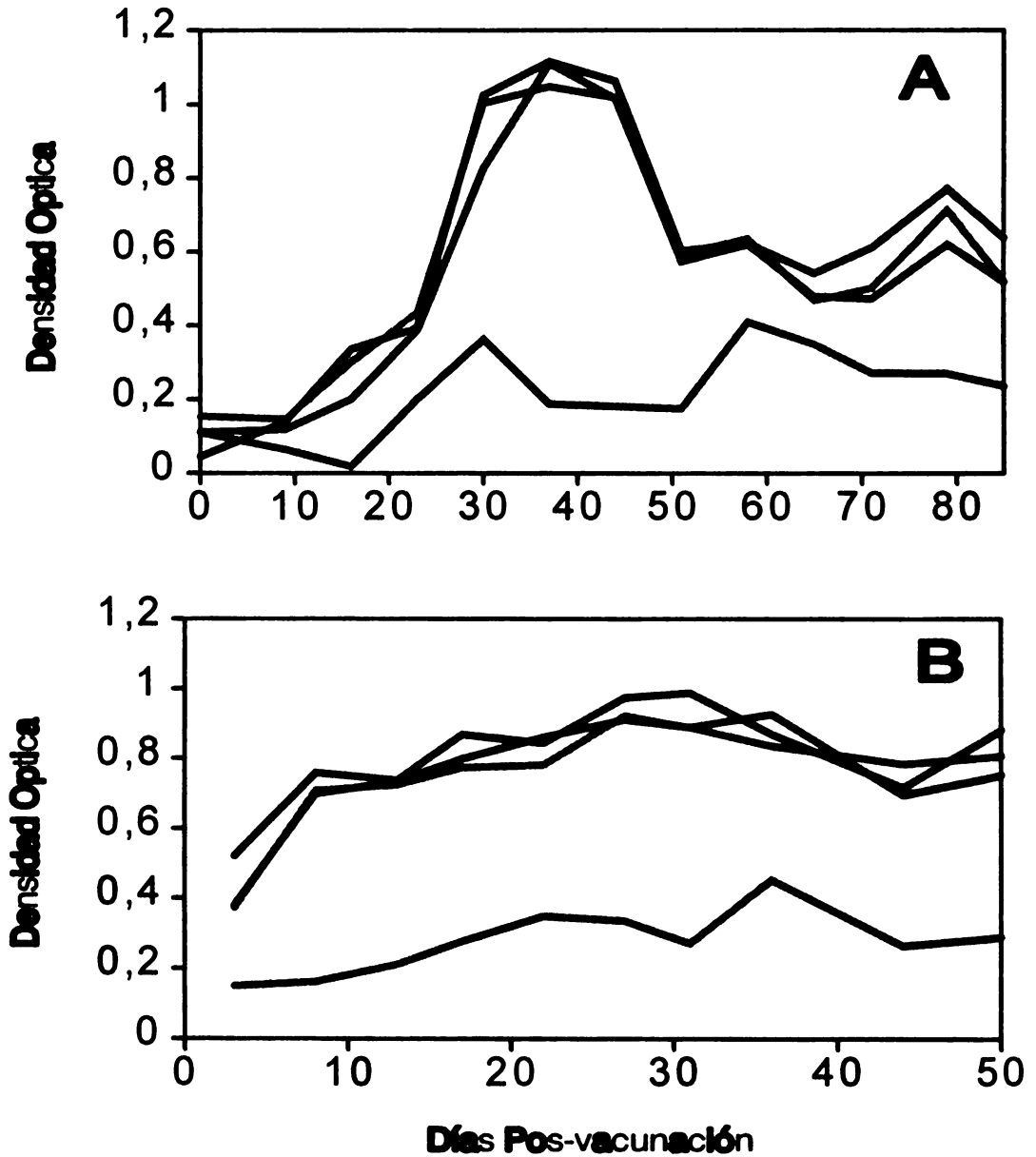
Los animales se vacunaron los días cero y 24 y se confrontaron con una dosis de 100 millones de eritrocitos infectados de la cepa MEX-15. Porcentaje de eritrocitos vacunados (PEP) vacunados ; ———  
 VCA vacunados ——— ; PEP testigos ———; VCA Testigos ———

**Figura 3. Volumen celular aglomerado A y porcentaje de eritrocitos infectados B, de animales vacunados y testigos, confrontados con *A. marginale* Mex -15**



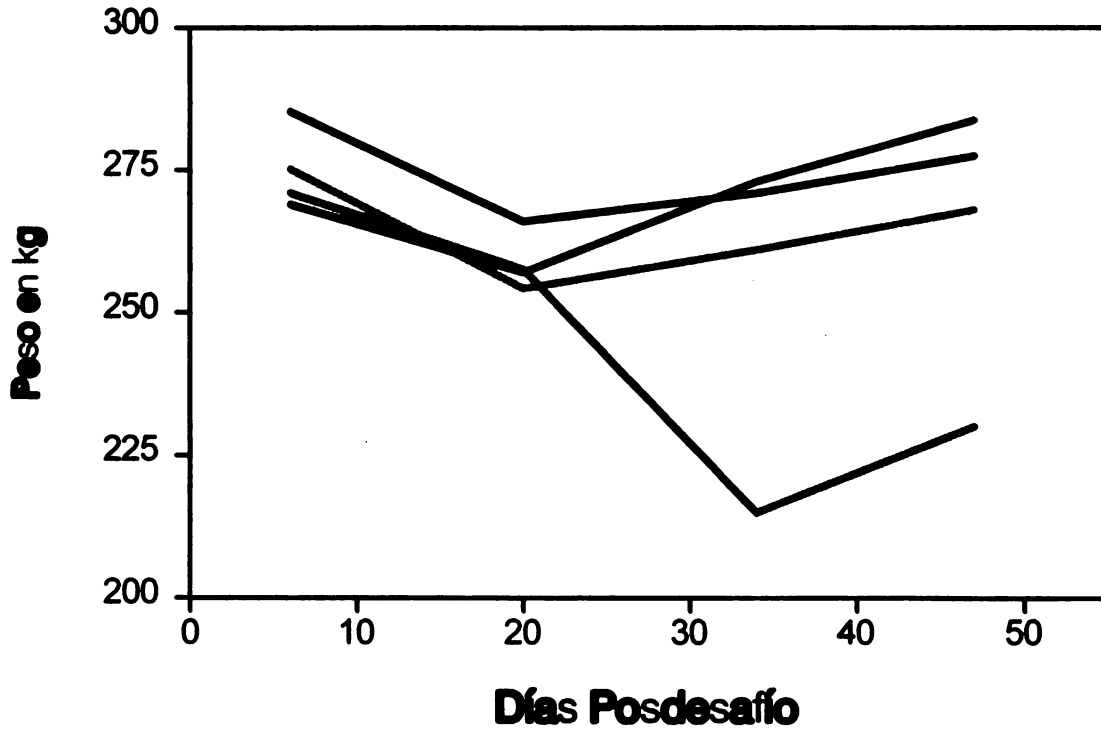
Los animales se vacunaron los días cero y 21 y se confrontaron con una dosis de 100 millones de eritrocitos infectados de la cepa MEX-15. Grupo A **—**; Grupo B **—**; Grupo C **—**; Grupo D, testigos **—**.

**Figura 4. Densidad óptica de sueros de animales vacunados y testigos, ante (A) vacunación y (B) desafío con *A. marginale*.**



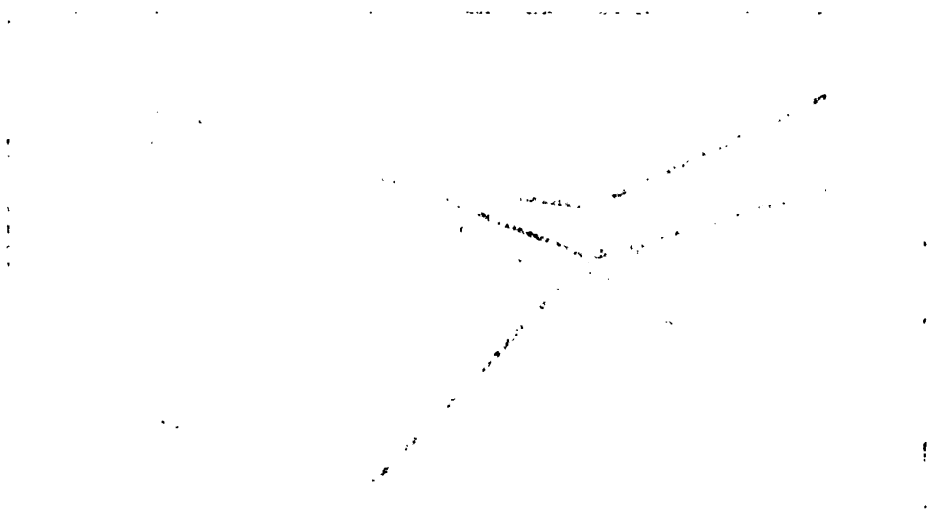
Los animales se vacunaron los días cero y 21 y se confrontaron con una dosis de 100 millones de eritrocitos infectados de la cepa MEX-15. Grupo A —; Grupo B —; Grupo<sup>222</sup>C —; Grupo D, testigos —.

**Figura 5. Peso corporal de sueros de animales vacunados y testigos, después de la confrontación con A. marginale Mex -15**



Los animales se vacunaron los días cero y 21 y se confrontaron con una dosis de 100 millones de eritrocitos infectados de la cepa MEX-15. Grupo A — Grupo B — ; Grupo C — ; Grupo D, testigos — .

... ..



... ..

### CONCLUSIONS

The results of the present investigation show that the proposed method is a simple and effective way of determining the optimal control policy for a class of nonlinear systems. The method is based on the principle of dynamic programming and is applicable to a wide range of problems. The results obtained are in good agreement with those obtained by other methods.

**PREVALENCIA DE *Otobius megnini* y *Anocentor nitens* EN EQUINOS DEL LIENZO CHARRO DE BACHIGUALATO Y COLONIA BACHIGUALATO DE CULIACAN, SINALOA, MEXICO.**

**PREVALENCE OF *Otobius megnini* AND *Anocentor nitens* IN EQUINE OF THE LIENZO CHARRO AND COLONY OF BACHIGUALATO CULIACAN, SINALOA, MEXICO.**

GAXIOLA C. S. M.\*, BORBOLLA I. J. E.\*, QUINTERO M. M. T.\*\*\*, RENTERÍA G. R.\*, ACEVES L. R.\*, GUERRERO L. A. P.\*, VELARDE P. J. L.\*, ZAZUETA G. A. O.\*

\* *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Apartado Postal 1057. Tel. (67) 18-16-50. Fax: (67) 50-36-99 y 18-16-50.*

\*\* *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.*

Los ectoparásitos son una causa común e importante de dermatitis en los caballos, las garrapatas son causantes de la transmisión de enfermedades que sin miramientos pueden incluso quitarle la vida al animal. En este caso la garrapata de oreja es un parásito que puede dejar daños muy visibles, una vez sobre el animal, *Otobius megnini* y *Anocentor nitens* recorren el cuerpo para alojarse en las orejas. Por su parte *Anocentor nitens* además de estos daños transmite a *Babesia caballi*. Actualmente, la información sobre los ectoparásitos que afectan a los équidos, no se encuentra muy bien documentada, por lo que se requiere mejores esfuerzos en el estudio de éste tema. El objetivo central de éste trabajo es el de corroborar la prevalencia de garrapatas de los géneros *Otobius megnini* y *Anocentor nitens* y definir la dinámica de sus poblaciones tanto en sus etapas parasíticas como no parasíticas para efecto de control en los grupos de animales a estudiar. Los muestreos se realizaron en la colonia Bachigualato y en el Lienzo Charro de Bachigualato del municipio de Culiacán, Sinaloa; el análisis de las muestras de las muestras se realizó en el laboratorio de parasitología de la escuela de medicina veterinaria y zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Se ha realizado un primer muestreo en 2 de los lugares a visitar; el número total de muestras colectadas fueron de 180 animales en total, de las cuales 60 fueron tomadas en la colonia Bachigualato y las 120 restantes en el Lienzo Charro de Bachigualato. Estas se tomaron directamente del pabellón auricular. Las muestras se colectaron con guantes desechables y torundas de algodón humedecidos con alcohol. La clasificación morfométrica de las garrapatas se realizó al microscopio estereoscópico por los laboratorios de parasitología de las UAS y la FMVZ-UNAM. La información sobre las dinámicas de población y etapas parasíticas de éstas garrapatas se irán conformando según la información se valla obteniendo. Se observó que el 22.2 % (40) del total de las muestras resultó positiva a *Otobius megnini*, correspondiendo el 7.5% (3) a la colonia Bachigualato y

el 92.5% (37) al Lienzo Charro, con un promedio por animal de  $161 \pm 8.6$  garrapatas. En el caso de *Anocentor nitens* se observó en un 16.1% (29) total, siendo un 37.9% (11) para la colonia bachigualato y un 62.07% (18) para el lienzo charro, con un promedio de  $104 \pm 6.7$ . Se concluye que la prevalencia encontrada de éstas garrapatas en equinos es elevada, prevaleciendo *Otobius megnini*, sin descartar la posibilidad de que existan otros géneros de éstos parásitos, por lo cual se recomienda continuar en éste sentido, buscando la información que permita tomar medidas de control adecuadas para la problemática en todas las especies animales.



**INFESTACIÓN NATURAL DE BOVINOS CON *Boophilus microplus* EN EL MUNICIPIO DE CULIACÁN, SINALOA, MÉXICO.**

**NATURAL TICK INFESTATION OF *Boophilus microplus* IN CATTLE IN THE MUNICIPALITY OF CULIACAN, SINALOA, MEXICO.**

GAXIOLA C. S. M.\*, QUINTERO M. M. T.\*\*\*, RODRIGUEZ M. J.\*, BORBOLLA I. J. E.\*, CASTRO DEL C. N.\*, RUBIO R. M. C.\*

\* *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Sinaloa. Apartado Postal 1057. Tel. (67) 18-16-50. Fax: (67) 50-36-99 y 18-16-50.*

\*\* *Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.*

Se analizaron 2 explotaciones de ganado bovino productores de leche en el municipio de Culiacán, Sinaloa, México, respecto a la presencia de garrapatas durante 6 meses del año, con el objetivo de determinar género y especie parasitaria y el grado de infestación natural durante los meses de julio a diciembre. Los 2 ranchos se ubican en la zona central del municipio, con un clima tropical seco, lluvias predominantes en verano y temperaturas promedio arriba de los 28°C, con bovinos cruza de cebú-holstein, bajo un régimen de alimentación mixto de pastoreo con suplementación, ambos con una población promedio de 25 animales, de las muestras colectadas se encontró que todas pertenecen al género de *Boophilus microplus*, presentando una infestación promedio por hato de 50 ó mas garrapatas por la do en proceso de repleción (4-8 mm), durante cuatro de los meses del estudio (julio, agosto, septiembre y octubre) y una infestación de 30 ó mas garrapatas por lado en proceso de repleción (4-8 mm) durante noviembre y diciembre. Los conteos y colectas se realizaron mensualmente, así como la identificación de las garrapatas, la cual se realizó en los laboratorios de Parasitología de la FMVZ-UAS y de la FMVZ-UNAM. Cabe mencionar que en una de las explotaciones se aplicó un producto del grupo de las ivermectinas en dosis de 200 mcg/kg (1 ml/50Kg) de peso corporal vía subcutánea, cuando se inició el trabajo durante el mes de agosto, a haciéndose conteos y colectas postratamientos durante los días 3,5,7,14 y 21 encontrado que solo durante 7 días hubo un control adecuado de las garrapatas en ese hato con diferencias estadísticas significativas (P0 05) entre conteos, aún cuando éstos productos químicos tienen probada una eficacia aceptable postratamiento mínimo de 28 días sobre la inhibición del potencial reproductivo de las garrapatas en poblaciones naturales, aquí se encontró que para las dos semanas postratamientos las cuentas de garrapatas se encontraban en 50 hembras ó mas en proceso

de repleción. Se concluye que la infestación por *Boophilus microplus* sigue siendo alta de manera natural y por el resultado con los tratamientos para ectoparásitos los resultados encontrados parecen indicar que se está tratando con poblaciones de garrapatas altamente resistentes, es importante encaminar más esfuerzos en esta región del país a trabajar de manera conjunta tanto instituciones educativas como gubernamentales sobre ésta línea, para poder encontrar medidas de control más eficientes.

# **DERMATITIS AGUDA EN EL CERDO OCASIONADO POR PICADURAS DE INSECTO.**

## **ACUTE DERMATITIS IN SWINE CAUSED BY INSECT BITES.**

**ROBERT D. GLOCK; S. C. HENRY**

*Arizona Veterinary Diagnostic Laboratory, University of Arizona, Tucson, AZ. USA;  
Abilene Animal Hospital, Abilene, KS. USA.*

### **INTRODUCTION**

Biting insects and particularly stable flies, Stomoxys calcitrans, are responsible for a specific type of acute dermatitis in swine.

### **OBSERVATIONS**

Multiple circular red 1.0 to 2.0 cm foci are commonly observed over exposed parts of swine, particularly if they are housed in poorly screened areas. The lesions are seen only when ambient temperatures are relatively warm. The lesions are usually not raised or noticeably swollen. Some individual animals are more susceptible than others. There may be retarded growth in outdoor nurseries. Clinical effects are significant in breeding stock because the lesions are unsightly, especially if they become secondarily infected and ulcerated.

Histologic lesions are focal erosions, often with associated small pustules, and perivascular infiltrations of neutrophils, macrophages, and some plasma cells in the dermis and superficial subcutis. There may also be a few neutrophils in the epidermis. Eosinophils are not numerous in these lesions.

### **CONCLUSION**

Lesions are caused by stable flies, but other insects such as horse flies or deer flies may occasionally be found. Lesions are apparently the direct results of trauma and inflammation. They do not appear to be the result of hypersensitivity or histamine release. Secondary bacterial infectious, usually Staphylococcus aureus, can contribute to formation of unsightly deeper ulcers. Poor sanitation or irritating chemicals enhance secondary infections.

Control of stable flies depends on eliminating decaying organic matter. However, the flies migrate long distances. Stable flies rest overnight on the underside of tall vegetation, so vegetation near facilities should be eliminated. Insecticides may be helpful as residuals or as area sprays. Baits are not useful.

#### SUMMARY

Stable flies, Stomoxys calcitrans, are a common cause of circular red skin lesions in swine. These normally heal in a few days but secondary infections with Staphylococcus aureus can cause ulcers. Losses include marketing problems caused by the unsightly lesions. Major control methods should include elimination of breeding areas, elimination of vegetation near facilities, and use of pesticides.

# **IMPORTANCIA DEL ESTUDIO DE GARRAPATAS *Ixodes* EN ROEDORES SILVESTRES.**

## **IMPORTANCE OF IXODES TICKS ON WILD RODENTS.**

QUINTERO, T. M.

*Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM, MEXICO.*

### **INTRODUCCIÓN**

Las garrapatas del género *Ixodes*, son importantes en la transmisión del género *Borrelia*, siendo garrapatas de tres huéspedes, las fases de larva y ninfa se hallan sobre pequeños mamíferos entre los que se encuentran los roedores algunos de los cuales han sido clasificados como reservorios competentes, tal es el caso de *Peromyscus leucopus* con *Borrelia burgdorferi* ampliamente estudiada en U.S.A. Asimismo existen otros muchos roedores silvestres que albergan garrapatas del género *Ixodes* y de los cuales poco se conoce sobre las épocas del año en que estas garrapatas aparecen así como las fases evolutivas de las mismas sobre estos huéspedes. Tomando en consideración lo anterior el objetivo del presente trabajo es el de comunicar la presencia de garrapatas *Ixodes* a través de dos años sobre *Heteromys gaumeri* en Yucatán.

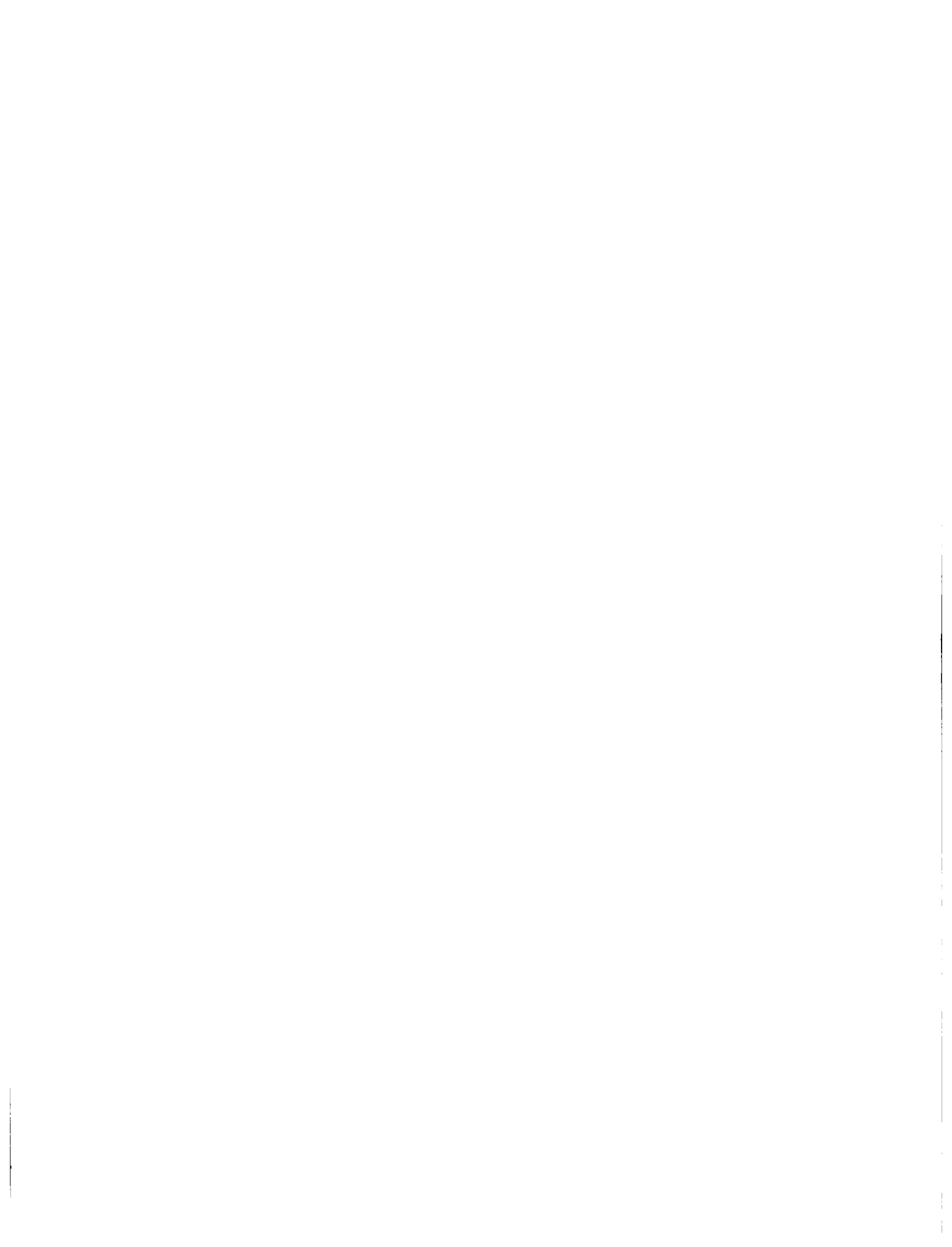
El material consistió en garrapatas separadas de *Heteromys gaumeri* por medio de la técnica de captura y recaptura de roedores a los que se les separaron rápidamente las garrapatas por medio de cepillado. El muestreo se llevó a cabo de mayo a 1996 a abril de 1998.

### **RESULTADOS**

Se aislaron garrapatas del género *Ixodes* en el 90% de los meses de estudio, no pudo determinarse con exactitud la especie de *Ixodes*, lo cual está en proceso. Pudo aislarse a esta garrapata en diversas fases evolutiva.

### **CONCLUSIONES**

Las garrapatas del género *Ixodes* se encontraron sobre *Heteromys gaumeri* en 90% de los meses de estudio. Es necesario continuar con este tipo de trabajos, para determinar la importancia de las garrapatas *Ixodes* sobre roedores, ya que algunas de sus especies aun cuando no se alimentan preferencialmente del humano, pueden actuar como vectores de *Borrelia* en el ciclo enzoótico.



# **IMPLICACIONES ECONOMICAS DE UN BROTE DE RESISTENCIA A ACARICIDAS EN UNA POBLACION DE *Boophilus microplus*.**

## **ECONOMIC IMPLICATIONS OF AN OUTBREAK OF ACARICIDE RESISTANCE IN *Boophilus microplus* POPULATION.**

VILLARINO, MARIO A.\*, OCHOA, RENE, WAGNER G. GALE\*\*.

\* *Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México.*

\*\* *Department of Veterinary Pathobiology, College of Veterinary Medicine, Texas A&M University, College Station, Texas, USA=0D( Department of Agricultural = Economics, Texas A&M University, College Station, Texas. USA.*

### **INTRODUCCION**

The southern cattle tick *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) is considered to be among the most important of all tick pests because of its direct effects on cattle (i.e. blood loss) as well as the ability to transmit protozoal parasites (i.e. *Babesia* spp) (Núñez, et al 1985). The organophosphorous (OP) compound coumaphos has been used as the principal control agent in the National Tick Eradication Program conducted by Mexican federal authorities (Trapaga, 1989). Resistance to the chemical acaricides widely used to control *B. microplus* has become a major global problem of significant economic importance. Currently, cattle management in the tropics of Mexico includes routine OP acaricide treatments against tick infestation. The extensive and intensive use of acaricides has induced acaricide resistance in *B. microplus* against the majority of the compounds in the Mexican market labeled for acaricide use (Anon. 1991). The detection and determination of acaricide resistance should therefore be included in vector control programs (Lee & Tadano, 1994). The present study indicates biochemical and histochemical differences in OP susceptible and OP resistant reference strains engorged female integument based on the detection of B esterases. Based on these experiences, an Esterase B Biochemical Microassay (EBBM) was developed and tested in native Mexican and laboratory reared strains. The effect of OP resistance was then estimated using a computer population dynamic model and a computer economic model. Objective: The objective of this investigation is to determine the relationship between esterase B and OP acaricide resistance and to evaluate the economic impact of tick infestation and OP acaricide resistance management in a Mexican tropical beef and dairy cattle farms situation. Experimental design: Histochemical and biochemical analysis of B Esterases were conducted in Mexico OP and OP susceptible reference strains engorged females.

Tissue samples were analyzed for B esterase activity using histochemistry. Based on the differences found, a microplate assay was then designed.

The esterases found were purified by chromatography and characterized by the method of Aldrich (1953) using esterases inhibitors. Two cattle farms in the Mexican tropics were selected and samples of engorged females were analyzed against OP resistance using the Larvae Packet Assay (Stone, 1969), histochemistry and esterase B microplate assay. A weather profile of the selected farm zone was built including extremely dry and extremely wet years. This weather profile and individual farm conditions were used to simulate population dynamics over ten years with BCTSIM model. Tick infestation effect and acaricide expenses were added into the economic model of the farms using FLIPSIM economic model.

Results: Histochemical analysis demonstrates increased esterase B activity in engorged females of Mexico OP resistant strain when compared to OP Susceptible strain. This increment is evident in epicuticle and endocuticle layers of the integument. The analysis of both reference strains with the EBBM indicates statistically significant increased esterase B activity (units/mg) of engorged female integuments. Purified esterase from both strains showed different esterase activity, increased in OP Susceptible strain, however, once inhibitors were applied, it showed an increased inhibitory effect on it. The purified esterase was classified as carboxylesterase based on inhibitors effect.

Larvae packet results conducted on native samples indicate 96% and 59% of OP resistant ticks (Farm A and Farm B). The offspring of the females collected from Farm A was also 100% piretroid resistant. Histochemical analysis of both native strains corroborates previous observations found in USDA reference strains. EBBM results indicate a wide variety of phenotypes on the Farm B. A narrower phenotypic distribution was found in Farm A strain. These results are similar to those found in reference strains. Computer simulation indicates no reduction of engorged females population on Farm B even when acaricide treatments were applied (Every 4 Weeks, 6 months of the year, February - July), However, and because host resistance effect, the engorged females per host were not high (< 5, all year long). Computer simulation of engorged females from Farm A indicates a null effect on tick population control because treatments (Every 4 weeks, all year long) due to acaricide resistance. In this case, and because host susceptibility, the number of engorged females per host were considerable high (>100), all year long.

Conclusions: Increased carboxylesterase activity was detected in OP resistant engorged female integument. Carboxylesterases are serine esterases that can serve as a protective role for the target acetylcholinesterases (AChE) during OP insecticide intoxication because the former esterases are alternate phosphorylation sites (Watson and Chambers, 1996). This difference can be used to detect phenotype variability in native and



laboratory reared strains. OP resistance populations show a narrow range of phenotypes ( $>2.0$  O.D units EBBM after 30 min). OP Susceptible populations show a broad range of phenotypes ( $< 2.0$  O.D. units EBBM after 30 min). This results can be use to infer physiological response against OP challenge during acaricide treatments in cattle farms. Computer simulation results indicate a significant effect on acaricide efficacy because OP resistance. However, host response play a more significant role in this ectoparasitic infestation. Population dynamics and economic analysis indicate no significant effect of ticks in high resistant cattle farms.

A very significant effect in herd development is evident in tick susceptible cattle farms. A negative effect on milk production because tick infestation has not been previously described. This effect could be of significance in tropical dairy cattle farms. Economic analysis of these farms indicate not profitability under the current scheme, even after tick control. Acknowledgment. The authors acknowledge the contribution of Dr. Ron Davey USDA Tick Research Unit, Mission Texas, Comision Nacional del Agua, Campeche Mexico, Asociacion Ganadera Local de Champoton, Champoton Campeche Mexico and DGAPA UNAM for Dr. Mario A. Villarino Scholarship.



## **CONSIDERACIONES PARA EL USO ADECUADO DE LOS IXODICIDAS.**

### **CONSIDERATION ON THE CORRECT USE OF IXODICIDES.**

**GARCÍA, E.S.; CLEMENS, K. Y GONZÁLEZ-COSSIO, L. A.**

*Bayer de México SA de CV. Miguel de Quevedo 259 C.P. 11520, México, D.F.*

El problema del control de ectoparasitos ha sido uno de los rubros donde la ganadería mundial mas ha invertido a lo largo de la historia, de hecho casi todos los países donde el problema existe, se invierte en campañas para fomentar el uso adecuado de los métodos del control.

Actualmente el principal método que se utiliza es el químico ya que es el mas efectivo y además el mas costeable para el ganadero.

Dentro de esto podemos encontrar que los métodos de aplicación de ixodicidas son variados pero básicamente el de Inmersión, Aspersión y Epicutaneo son los mas usados.

Desgraciadamente, el éxito en la aplicación de ixodicidas puede estar comprometido por diversos factores de mal uso, lo que no solo afecta la efectividad del tratamiento sino que acelera un proceso biológico natural que es el fenómeno de resistencia.

El método mas usado, aunque cada día va disminuyendo su utilización es el de inmersión, que indudablemente bien utilizado es el mas efectivo, es también el que mas riesgos presenta por que son múltiples las posibilidades de falla, lo que lleva a dosis equivocadas y en general a mal uso del producto con las consecuencias ya mencionadas.

El fenómeno de resistencia ha ido evolucionando rápidamente en México desde los años 80's cuando se aisló la cepa Tuxpam resistente a OP's, unos años después la cepa Temporal resistente a OP's y Clorados y así hasta el año 1993 cuando se aislaron las cepas San Jorge y Mora con doble resistencia a OP's y Pretroides.

Esto reduce dramáticamente las operaciones de control químico sobre todo en los climas tropicales y subtropicales del país donde, aunque todavía existen lugares donde la garrapata es susceptible, se utiliza solo un grupo químico (Amidinas), esto debido al consejo de algún "asesor experto compadre-vecino-amigo" o a que existen compañías sin ética que solo ven la oportunidad de vender y ofertan el producto a un costo muy bajo.

El problema es que el amitraz es uno de los compuestos químicos mas inestables y por lo tanto mas susceptible de las fallas operativas, lo que nos lleva a una pregunta ¿Cuánto

tiempo mas nos queda? ¿En que año se aislará la garrapata milenium super resistente a los 3 grupos químicos?.

Que otras opciones tenemos aparte de los Endectocidas o los Reguladores de crecimiento o la famosa vacuna que ha demostrado ser una buena ayuda pero no la solución al problema.

El mensaje es que en esto debemos involucranos todos, gobierno, iniciativa privada, M.V.Z.'s y productores para seguir las directrices que se marquen para un uso responsable.

Nosotros proponemos los siguientes pasos para usar responsablemente un Ixodicida:

1. Conocer la situación de susceptibilidad o resistencia de los animales del predio a tratar.
2. Seguir un orden de rotación dependiendo del punto anterior, dejando como última opción el uso de Amitraz.
3. Aplicar estrictamente las instrucciones de uso de los productos para cada método de aplicación.
4. Establecer un programa estratégico de control que se aplique de acuerdo a las dinámicas poblacionales de los géneros de garrapatas presentes en el rancho.
5. Nunca utilizar productos que no sean autorizados por SAGAR.
6. Tener cuidado con las mezclas de productos.
7. Aplicar tratamientos dirigidos para mosca y garrapata por separado.

Hoy mas que nunca, necesitamos que todos nos hagamos responsables de cuidar este recurso ya que desgraciadamente es un recurso no renovable.

**ENCUESTA SOBRE ACTITUDES Y PRACTICAS DE PRODUCTORES DE GANADO BOVINO EN EL CONTROL DE LA RESISTENCIA DE LA GARRAPATA *Boophilus microplus* EN EL ESTADO DE CHIAPAS, MEXICO.**

**SURVEY ON ATTITUDES AND PRACTICES OF BOVINE PRODUCERS IN THE CONTROL OF *Boophilus microplus* RESISTANCE TO IXODICIDES IN THE STATE OF CHIAPAS, MEXICO.**

SANCHEZ ZLM<sup>1</sup>, MEJIA, E. F<sup>2</sup>., GRANJENO, G<sup>3</sup>., GARCÍA VZ<sup>3</sup>, GEORGE<sup>4</sup>, J.

<sup>1</sup> *Escuela de Salud Pública de México / Inst. Nal. Salud Publica,*

<sup>2</sup> *C.E. Pichucalco, INIFAP, Chiapas,*

<sup>3</sup> *CENID-PAVET, Jiutepec, Morelos, INIFAP,*

<sup>4</sup> *Agriculture Research Service, Kerville, Texas, USDA.*

## INTRODUCCION

La garrapata *Boophilus spp* del ganado bovino causa significantes pérdidas en la industria ganadera en México, reduciendo la producción de carne y leche, o una mortalidad como resultado de las enfermedades transmitidas por las garrapatas *Babesia* y *Anaplasma*. Además del costo de trabajo, regulación durante la movilización, ixodicidas e infraestructura para su control. Un programa nacional obligatorio se realizó en México a partir de 1975 y finalizando en 1985 debido a problemas financieros (3). Durante el programa se realizó la primera detección de un problema de resistencia a los organofosforados (1), permitiendo la introducción de nuevos ixodicidas y en 1995 se detectó la resistencia a piretroides (2). Es de esperarse que las nuevas prácticas de control de *B. microplus* difieran de aquellas utilizadas en 1970 y por lo tanto debe de haber mejorado el uso de ixodicidas para su control.

El uso apropiado de ixodicidas que permita retardar el desarrollo de la resistencia en la garrapata *B. microplus* y que reduzca el riesgo de residuos en la carne de los animales tratados es un intento en los diferentes sistemas de explotación y son problemas que deben de ser considerados cuando se establece un programa de control.

El objetivo fue determinar las actitudes y prácticas de los productores pecuarios para el control de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* del ganado bovino en el estado de Chiapas.

## MATERIAL Y METODOS

El estudio se realizó en la parte norte del estado de Chiapas. Se diseñó un estudio de tipo transversal aplicando un cuestionario, y se obtuvo la información de ranchos, animales, manejo, prácticas de control de garrapata y conocimiento del problema de resistencia del productor. El tamaño de muestra fue de conveniencia, con una selección al azar de los ranchos.

En cada uno de los ranchos se obtuvo una muestra de garrapatas adultas B. que se enviaron al CENID-PAVET-INIFAP en Jiutepec, Morelos. La progenie de las garrapatas, larvas de 10-15 días de edad se utilizaron para el paquete de larvas con dos productos coumafos (OF) y deltametrina (Pr) y la susceptibilidad o positividad a la resistencia se realizó por medio de dosis discriminante.

El análisis de la información de los cuestionarios se concentró y se calculó porcentaje, error estándar, intervalos de confianza al 95 %.

## RESULTADOS

El análisis descriptivo de las características de 45 explotaciones ganaderas de las cuales se obtuvieron muestras de garrapatas y éstas fueron sometidas a la prueba de paquete de larvas propuesta por la FAO. Se observó que la proporción de ranchos con resultados de resistencia a piretroides fue del 4.4% (IC 95% 0.5-15.1) y a organofosforados el 100% resultó susceptible. El 84% (IC 95% 71-93) corresponden a propiedades privadas en donde el principal tipo de producción es el de leche-cría con un 73% (IC 95% 58-85). El promedio de tamaño de las explotaciones fue de 120 (IC 95% 68-173) La raza de ganado predominante fue la cruce de europeo con cebú, representando el 80% (IC 95% 65-90); el 42% (IC 95% 28-58) de las explotaciones contaban entre 50 y 100 animales El 82% (IC 95% 68-92) maneja pastos introducidos. El 46.6% (IC 95% 32-62) de los propietarios introduce animales nuevos a sus explotaciones; de estos, el 52% (IC 30-74) compran el ganado en su mismo municipio, al igual que el 90% (IC 95% 70-99) bañan al ganado comprado. De todas las explotaciones, el 62% (IC 95% 47-76) manifestaron tener problemas de hemoparásitos. Con respecto al manejo de los ixodídeos, el 51% (IC 95% 36-66) durante los últimos dos años ha utilizado organofosforados y piretroides; la mayoría (84%) bañan por aspersión, el promedio de veces que cambiaron de producto, excluyendo aquellos que no lo hicieron, fue de 2.4 DE 1.72. El 53% (IC 95% 38-68) bañan cada 15 días, el 52% (IC 95% 36-69) manifiesta haber cambiado de producto por ineffectividad de este. La proporción de propietarios que manifestaron tener problemas de resistencia fue del 50% (IC 95% 35-65). Al momento en que fueron tomadas más muestras de garrapatas, los animales del 45% (IC 95% 30-61) de las explotaciones mostraron un grado de infestación bajo ( $\leq 10$  garrapatas por animal), y el 40% de los ranchos se muestrearon en la época de secas.

## DISCUSION Y CONCLUSIONES.

El promedio de animales en los ranchos estudiados fue de 50 a 100 animales que refleja un tipo de ganadero medio de la región, predominando cruza de animales y con un sistema de explotación de producción de doble propósito leche y carne.

El grado de infestación es difícil de estimar sin una continua observación de los animales, en este estudio los productores declararon que el promedio de infestación por animal es de 11 a 50 garrapatas siendo, y menor los animales con infestaciones altas más 40 garrapatas. Esta variación es debido a las diferentes estaciones en que se realizó la encuesta o a las estrategias de control establecidas en las explotaciones.

Las practicas de control están principalmente dirigidas a la garrapata *B. microplus* a través del uso de ixodicidas siendo la forma de aplicación más común la de aspersión y seguido por la inmersión. La aplicación y efectividad de los acaricidas depende de su correcta utilización, desafortunadamente no se utiliza en la forma correcta tanto en su aplicación y su concentración, ya que un numero reducido de productores utiliza medidas para dosificar los ixodicidas. Probablemente este es un factor que afecta la ineficacia del control y el productor culpa a la calidad de los productos utilizados.

Es importante señalar que un gran numero de productores manifestó tener problemas con mosca y utilizan el tratamiento de garrapata para el control de la mosca de cuerno *Haematobia irritans*.

La mitad de los productores manifestó tener problemas de resistencia , y los ixodicidas involucrados fueron los OF, Pr, y amidinas y sus combinaciones. Sin embargo solo tres casos se reporto que el diagnóstico fue realizado por un profesionista y los restantes por el mismo propietario, siendo el cambio de producto el remedio para solucionar su problema, aunque en ocasiones correspondió a productos de la misma familia de ixodicidas, solo cambio el nombre comercial. Por lo que la falta de eficacia es debido a otros factores no controlados por el productor.

Los productores entrevistados manifestaron el desconocimiento de la biología de la garrapata *B. microplus* y la identificación de las diferentes especies de garrapatas existentes en la región, lo cual se refleja en la gran diversidad de calendarios de baño que se establecen en las explotaciones y que no obedece a una necesidad biológica.

Por lo cual concluimos que es necesario reforzar el proceso de comunicación de las tecnologías de acuerdo al nivel de la cadena productiva, ya que a pesar de existe el problema de resistencia a los ixodicidas en la garrapata *B. microplus* los factores de manejoforma de aplicación y conocimiento basico del control de la garrapata *B. microplus* en los productores no es el adecuado y correspondería a un profesional en extensionismo hacer esta labor, para tener un éxito en la consecución de un programa y en mejorar la rentabilidad de la explotación.

#### LITERATURA CITADA

Aguirre, E.J., Sobrino, A.L., Santamaría, M., Roman, E., Hernandez, M., Ortiz, M., Ortiz, N.A. 1986. Resistencia de garraptas en Mexico. Seminario Internacional de Parasitología Animal. Cuernavaca, Morelos, Mexico. pp 281-306.

Ortiz, E.M., Santamaria, V., Ortiz, N, A., Soberanes, C.J., Osorio, M.J., Bello, F.F., Martinez, I.R., Quezada, D. H., Fragoso, S.H. 1995. Caracterización de la resistencia de *Boophilus microplus* a ixodicidas en México. III Seminario Internacional de Parasitología Animal. Acapulco. México. pp. 58-70.

Trapaga, B.J. 1986. Desarrollo de la campana contra la garrapata en Mexico. Seminario Internacional de Parasitología Animal. Cuernavaca, Morelos, Mexico. pp. 329-335.



**AISLAMIENTO DE Bm 95 DE LA GARRAPATA DEL GANADO *Boophilus microplus*: UN ANTIGENO MAS UNIVERSAL PARA EL CONTROL DE LAS INFESTACIONES DE GARRAPATA.**

**ISOLATION OF BM95 FROM THE CATTLE TICK, *Boophilus microplus* A MORE UNIVERSAL ANTIGEN FOR THE CONTROL OF TICK INFESTATIONS.**

JOSÉ C. GARCÍA-GARCÍA<sup>1</sup>, CARLOS MONTERO<sup>1</sup>, MIGUEL REDONDO<sup>1</sup>,  
MILAGROS VARGAS<sup>1</sup>, MARIO CANALES<sup>2</sup>, OSCAR BOUE<sup>2</sup>, MANUEL  
RODRÍGUEZ<sup>1</sup>, MARISDANIA JOGLAR<sup>1</sup>, HÉCTOR MACHADO<sup>1</sup>, MARIO VALDÉS<sup>3</sup>  
AND LUIS MÉNDEZ<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> *Mammalian Cell Genetics Division. Center for Genetic Engineering and Biotechnology, P.O.Box 6162, Havana, Cuba.*

<sup>2</sup> *Technological Development Division. Center for Genetic Engineering and Biotechnology, P.O.Box 6162, Havana, Cuba.*

<sup>3</sup> *Centro Nacional de Parasitología, Carretera de San Antonio-Rincón, Km 1½, San Antonio de los Baños, Havana, Cuba.*

**ABSTRACT**

The recombinant vaccine Gavac™ against the cattle tick *Boophilus microplus* has proved its efficacy in a number of experiments, especially when combined with acaricides in an integrated manner. However, tick isolates showing low susceptibility to this vaccine have been reported. In this paper we report on the isolation of the Bm95 gene from the cattle tick, *Boophilus microplus*, which was cloned and expressed in the yeast *Pichia pastoris* producing a glycosylated and particulated recombinant protein. This new antigen was effective against different tick strains in pen trials, including the *B.microplus* strain A, insensitive to vaccination with Bm86. A Bm95-based vaccine was used to protect cattle against tick infestations under production conditions, lowering the number of ticks on vaccinated animals and therefore reducing the frequency of acaricide treatments. The Bm95 antigen from strain A was able to protect against infestations with Yeerongpilly-like and Yeerongpilly-divergent strains, thus suggesting that Bm95 could be a more universal antigen to protect cattle against infestations by *B.microplus* strains from different geographical areas. The molecular bases of the effectivity of the new antigen are discussed.

**RESULTADOS EN MÉXICO DE LA LUCHA INTEGRADA CONTRA LAS GARRAPATAS DEL GENERO *Boophilus* CON LA UTILIZACIÓN DE LA VACUNA RECOMBINANTE GAVAC.**

**RESULTS OF THE INTEGRATED CONTROL IN MEXICO AGAINST THE TICK GENUS *Boophilus* USING THE RECOMBINANT VACCINE GAVAC**

JULIAN LONA\*, MIGUEL REDONDO\*\*, FELIPE AVILA\*, GUSTAVO VAZQUEZ\*.

\*REVETMEX SA de CV. México. DF

\*\* Centro de ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB) Habana, Cuba.

**RESUMEN**

En México desde el lanzamiento oficial de la vacuna recombinante **Gavac** en Julio de 1997, se viene empleando esta vacuna en varios estados del país, como **método de Lucha Integrada** contra el *Boophilus microplus* y con posterioridad también con excelentes resultados contra el *Boophilus annulatus*.

En la actualidad se han vacunado mas de 100 ranchos con la aplicación de más de 100 000 dosis de vacuna **Gavac** con resultados muy alentadores, si tenemos en cuenta que de baños garrapaticidas realizados antes de la vacunación de 10 a 14 días se paso a frecuencias de minimo de 60 días y máximas de 210 días, lo que permite una disminución significativa del consumo de productos químicos empleados como garrapaticidas. Otro aspecto sustancial es lo relacionado con las enfermedades hemoparasitarias y fundamentalmente la *Piroplasmosis*, que se han visto controladas en aquellos ranchos donde se ha aplicado esta vacuna contra la garrapatas, mediante su sistema de **Lucha Integrada**.

Se aborda también sobre la lucha en ranchos donde existen infestaciones mixtas de *Boophilus* y *Amblyomma* a partir de baños estratégicos contra este último ectoparásito.

**RESULTADOS EN CUBA DE LA LUCHA INTEGRADA CONTRA LAS GARRAPATAS *Boophilus microplus* CON LA UTILIZACIÓN DE LA VACUNA RECOMBINANTE GAVAC.**

**RESULTS OF THE INTEGRATED CONTROL IN CUBA AGAINST THE TICK *Boophilus microplus* USING THE RECOMBINANT VACCINE GAVAC**

MIGUEL REDONDO\*, LUIS MENDEZ\*\*, EMERIO SERRANO\*\*  
MARIO VALDEZ\*\*, CARLOS MONTERO\*, MILAGRO VARGAS\*, MANUEL  
RODRÍGUEZ\*, RICARDO LEONARD\*, ROGELIO OLIVA\*\* Y JORGE ARTILES\*\*

\* *Centro de ingeniería Genética y Biotecnología (CIGB), Habana, Cuba.*

\*\* *Instituto de Medicina Veterinaria (IMV), Habana, Cuba.*

**RESUMEN**

El desarrollo alcanzado por Cuba en el campo de la Biotecnología permitió que en el año 1993 se obtuviera la vacuna recombinante **Gavac**, como una nueva concepción de lucha biológica contra las garrapatas *Boophilus microplus* en sus inicios y con posterioridad contra la especie *Boophilus annulatus*, la vacuna Gavac es utilizada mediante el **método de Lucha Integrada**.

El nuevo inmunogéno provoca en los bovinos vacunados una respuesta inmune con la producción de anticuerpos específicos contra la proteína del intestino de la garrapata *Boophilus microplus*, la cuál dio origen a esa vacuna, ocasionando al ser ingeridos esos anticuerpos por las garrapatas, lesiones irreversibles en su pared intestinal, creando con ello:

Disminución en el número de garrapatas repletas, larvas, ninfas y adultas, afectando a su vez la capacidad reproductiva de estas y la fertilidad de los huevos.

Se discuten los resultados de la aplicación en Cuba de 2 666 000 dosis de vacuna **Gavac** con resultados muy alentadores, si tenemos en cuenta que de baños garrapaticidas realizados antes de la vacunación de 7 a 14 días se paso a frecuencias de mínimo de 42 días y máximas de 300 días, lo que permite una disminución significativa del consumo de productos químicos empleados como garrapaticidas e incrementos en la producción lechera.

Otro aspecto importante es lo relacionado con las enfermedades hemoparasitarias y fundamentalmente la *Piroplasmosis*, que se han visto controladas en aquellos zonas del país donde se ha aplicado esta vacuna contra la garrapatas, mediante su sistema de **Lucha Integrada**.

# **EL USO DE MOXIDECTIN EN EL CONTROL ESTRATEGICO DE LA GARRAPATA AZUL DEL GANADO EN SUDAFRICA.**

## **THE USE OF MOXIDECTIN IN THE STRATEGIC CONTROL OF RESISTANT BLUE TICKS IN SOUTH AFRICA**

A. DU PLESSIS<sup>1</sup> AND R. J. PETER<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Fort Dodge Animal Health, P.O. Box 1785, Kempton Park 1620 South Africa and <sup>2</sup>Bayer Animal Health, P.O. Box 143, Isando 1600 South Africa.

Both species of blue ticks, *Boophilus decoloratus* and *B. microplus* occur in South Africa although the former is more abundant. Increasing resistance to most of the commonly used acaricides viz. organophosphors, synthetic pyrethroids and amidines have been described by numerous researchers in South Africa over the past decades. On certain properties, *Boophilus* spp., resistant to three chemical groups, have necessitated cattle farmers to look at alternative control measures. Over the last 20 years the endectocides have proved to be beneficial in the control of, *inter alia*, blue ticks.

### **METHODS**

Following complaints by two cattle ranchers of inadequate blue tick control, harvested larvae from engorged, adult female *B. decoloratus* ticks were subjected to standard Shaw Larval Packet Tests. The acaricides used were amitraz, chlorfenvinphos and flumethrin for both the blue tick strains. Following the LPT's, the Connellan strain was subjected to a natural field tick challenge trial whilst the Cronje strain was further investigated in a Stall Test.

### **RESULTS**

The two *in vitro* Larval Packet Tests demonstrated that both blue tick strains showed signs of emerging flumethrin resistance. This was expected as both farmers have been using a flumethrin-containing pour-on acaricide for a number of years hence the expected decreased efficacy. However, the field tick challenge study with the Connellan strain conducted with various commonly-used acaricides and moxidectin, also showed emerging resistance to amitraz, cypermethrin and alphacypermethrin. Resistance to amitraz could however not be demonstrated in the preceding two Larval Packet Tests.

### **CONCLUSIONS**

In both the investigated field cases, strategic treatment with the 2<sup>nd</sup> generation macrocyclic lactone endectocide, moxidectin, at a dosage rate of 200 micrograms per kilogram body mass, injected subcutaneously, proved a valuable alternative to conventional acaricides to which resistance has developed. Effective control of approx. 35-56 days to emerging engorged female blue ticks can be expected depending on the prevailing blue tick challenge.

**SUSCEPTIBILIDAD A LOS ORGANOFOSFORADOS EN POBLACIONES DE MOSCA DEL CUERNO (*Haematobia irritans*) RESISTENTES A PIRETROIDES Y EL MANEJO DE LA RESISTENCIA A INSECTICIDAS.**

**SUSCEPTIBILITY TO ORGANOPHOSPHATES IN HORN FLY POPULATIONS (*Haematobia irritans*) RESISTANT TO PYRETHROID AND THE MANAGEMENT OF INSECTICIDE RESISTANCE**

**ORTÍZ ESTRADA MARTÍN**

*LAPISA S.A. DE C.V.*

*Km 5.5 Carretera La Piedad-Guadalajara*

*La Piedad, Michoacán. México. CP-59300*

**FRANCO BELLO RUBÉN**

*Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. SAGAR, Cuernavaca-Cuautla Km 11.5, Col Progreso, Jiutepec, Morelos, México.*

I.	Introducción.....	242
II.	Material y método.....	244
III.	Resultados.....	244
IV.	Conclusiones.....	245
V.	Bibliografía.....	246
	Gráficas 1, 2.....	247
	Gráfica 3.....	248
	Cuadro 1.....	248
	Cuadro 2.....	249

**I. INTRODUCCION.**

En 1982 se reportan los primeros casos de resistencia en América a piretroides en poblaciones de la mosca del cuerno Haematobia irritans, en el Sureste de los Estados Unidos (Kunz y Schmidt 1985), extendiéndose esta a otras áreas ganaderas de este país, llegando posteriormente hasta el Canadá (Kunz y Schmidt 1985, Mwangala y Galloway 1993). El desarrollo y expansión este fenómeno fue atribuido al uso de métodos de tratamiento de larga exposición, que permiten que la población de moscas tenga contacto con concentraciones disminuidas del piretroide, al final del periodo de tratamiento. Este factor, asociado con el corto ciclo de vida de la mosca del cuerno, favoreció su evolución.

En México durante 1992, los primeros ensayos dosis - mortalidad realizados en las zonas ganaderas del Noroeste del país en poblaciones de moscas del cuerno Haematobia

irritans , revelaron una disminución de la susceptibilidad al Fenvalerato, con rangos de resistencia de 6.16 a 315, 3. Pero no fueron concluyentes para el Coumaphos ( Kunz, Ortiz y Fragoso. 1995). Pruebas posteriores en diversas explotaciones del golfo de México y del pacífico demostraron la presencia de una alta resistencia a la Deltametrina, con rangos 2.9 a 520 y mediana a la Permetrina con factores de 18.8 a 24.6 y para Cipermetrina fue de 2.5 en un rancho en el estado de Veracruz (CONASA 1993). Con estos estudios se concluyó que la resistencia a insecticidas piretroides estaba establecida en México.

Los rangos tan altos de resistencia que se reportaron para la Deltametrina (DL50 520) y los encontrados en ensayos recientes en el estado de Veracruz son atribuidos a que esta molécula fue la más exitosa en el control de ectoparásitos, por lo que se convirtió en la más utilizada durante los últimos años para el contra garrapatas Boophilus spp y moscas H. Irritans.

El primer reporte de alta toxicidad de un químico en artrópodos resistentes a insecticidas fue la susceptibilidad oral del bromoacetato en una cepa de mosca doméstica, resistente a organofosforados (Ascher y Kocher, 1954). En el contexto de resistencia a insecticidas, Chapman y Penman (1979), Sawicki (1985) este fenómeno lo refieren como un cruce de resistencia negativa, en donde la resistencia para una clase de insecticidas confiere en el incremento de toxicidad de una clase con diferente mecanismo de acción, comparada con una cepa susceptible. Priester et al (1981) reportó que una cepa de Culex quinquefasciatus resistente a Temophos y una cepa de Culex tarsalis resistente a Methil Parathion fueron tan susceptibles a varios isómeros de insecticidas piretroides, como cepas susceptibles a organofosforados.

Otros estudios sugieren que la resistencia a organofosforados de ciertos artrópodos puede conferir un cruce negativo de resistencia a piretroides, como los de Sheppard y Marchiondo (1987) en los que observaron un aumento en la toxicidad del Diazinon en moscas del cuerno Haematobia irritans, resistente a piretroides, resultados similares se observaron en poblaciones resistentes a fenvalerato.

Los primeros ensayos de campo realizados en 1995, para determinar la eficacia aretes de Diazinon <sup>MR</sup> al 20 % en el control de poblaciones de mosca del cuerno H. Irritans resistentes a piretroides en Cd. Victoria Tamps., lograron una reducción de moscas durante 3 meses después del tratamiento, con promedios de 15 a 84 durante las observaciones en los bovinos experimentales, alcanzando una efectividad global de 79.48 %.

<sup>MR</sup> Spike, Laboratorios Novartis

Resultados en ensayos posteriores con aretes de Diazinon <sup>MR</sup> al 20 % en 1996 en Escuinapa, Sinaloa, confirmaron su eficacia en poblaciones de H. Irritans resistentes a piretroides, observándose una reducción de 109.9 moscas promedio antes de tratamiento a

0, durante las primeras 24 horas, manteniéndose así 45 días, alcanzando una efectividad global de 95.27 % durante 135 días.

<sup>MR</sup> Optimizer, Laboratorio Y-tex

Estos antecedentes y los resultados de diversos ensayos dosis-mortalidad en poblaciones de campo con Diazinon (datos no publicados CENAPA), nos indican que los organofosforados representan una alternativa para el manejo de la resistencia a piretroides en la mosca del cuerno *H. Irritans*. El objeto de este trabajo es evaluar la efectividad de dos formulaciones pour on un organofosforado, (1) Diazinón<sup>MR</sup> 10 % y una mezcla de organofosforado piretroide, (2) Ethión 15 % - Cipermetrina<sup>MR</sup> 5 % y (3) Fenthión<sup>MR</sup> 20% Spot-on en ganado naturalmente infestado con mosca del cuerno *H. Irritans* resistentes a piretroides.

## II. MATERIAL Y METODO.

Tres ensayos de campo con ganado naturalmente infestado fueron realizados en el estado de Veracruz, utilizando las dosis comerciales recomendadas para su uso en campo: Diazinón pour on (10ml/bovino), para Ethión-Cipermetrina pour on (10ml por cada 200Kg de peso vivo) y Fenthión Spot-on (10 ml para 151 a 200 Kg). En los tres casos la aplicación de los productos fue por derrame dorsal en cada uno de los animales experimentales. Los bovinos se agruparon en lotes testigos y tratados. Los conteos pre y postratamiento se realizaron del lado derecho del animal con la ayuda de binoculares y un contador manual. El seguimiento se realizó del día -1 al día 19 ó 20 y el lote designado como testigo permaneció en un potrero diferente durante los días de la prueba.

Para el diagnostico de susceptibilidad se utilizo la técnica de residuos en papel filtro en cajas de petri (Sheppard, 1987) elaborada por CENAPA-SAGAR, con los productos Cipermetrina, Deltametrina y Diazinón.

- (1)<sup>MR</sup> Lomopon, Laboratorio Agroformuladora Delta S. A. de C. V.
- (2)<sup>MR</sup> Sinmos-K, LAPISA S.A. DE C.V.
- (3)<sup>MR</sup> Tiguvon, Bayer de México S.A. de C.V.

## III. RESULTADOS.

La gráfica 1 muestra los números promedios moscas contabilizadas durante los días de la prueba, antes y después del tratamiento con Ethión 15 % -Cipermetrina 5 % pour on, en esta se puede observar una reducción de moscas de 104 pretratamiento a 0 (100 %), 0.7 (99.32 %), 1.3 (98.75 %) y 0.4 (99.61) para los días 1,3,5 y postratamiento, alcanzando en el día 15 y 20 último del ensayo una reducción 98.08 % y 77.88 % ( i.e. 2 y 23 moscas en promedio), mientras que en el lote control el promedio se mantiene hasta el día 7 arriba de 75 moscas, con una disminución para los demás días de la prueba, terminando con 59

moscas en promedio. Los porcentajes de control diarios y globales se presentan en el cuadro 1, obteniéndose un global a los 20 días de 87.73 %

La gráfica 2 presenta resultados de los números promedios de moscas para el ensayo con Fenthión 20 % Spot on para los dos lotes estudiados antes y después del tratamiento, en la cual se observa un efecto de limpieza a partir del día 1 postratamiento con 0 moscas hasta el séptimo, para aumentar con promedios de 17, 13, 5, 4 y 19 los días 9, 11, 13, 15 y 20 de la prueba, obteniendo 88 % de efectividad global a los 20 días.

En la gráfica 3 se puede observar los conteos de moscas en el lote testigo y experimental, para el ensayo con Diazinon pour on, aquí en el grupo control las infestaciones se encontraban entre 101.7 y 178.8, con un promedio de 146 moscas por bovino durante los 19 días de la prueba. En el grupo tratado se puede notar que el día 3 existe un efecto de limpieza total que se mantiene hasta el día 9, para terminar el día último de conteo con un promedio de 130.3. Los porcentajes diarios son mostrados en el cuadro 2 y la efectividad global es de 80.76 %.

Los análisis de varianza mostraron que existieron diferencias estadísticas significativas ( $p < 0.05$ ) entre los grupos testigos y experimentales en cada una de los ensayos para cada producto probado.

En el cuadro 2 se presentan las DL50 y factores de resistencia encontrados en la población de moscas en el rancho "La Soledad" del municipio de Vega de Alatorre, Veracruz, donde podemos ver la alta resistencia a los dos piretroides probados y la susceptibilidad al Diazinón, ya que la mortalidad de las moscas expuestas a éste inicia a los 15 minutos en todas las concentraciones probadas. Los resultados del diagnóstico de resistencia en el rancho "La Esmeralda", donde se llevó a cabo el ensayo con Diazinón mostraron factores de resistencia (fr) para la Cipermetrina de 1521.29 y para la Permetrina de 131.01. En el caso del Diazinón, una respuesta similar de alta susceptibilidad fue encontrada.

#### IV. CONCLUSIONES

La efectividad obtenida con el Diazinón (80.76 %) en este trabajo es similar a los mencionados por Sheppard y Marchiondo (1987), por Ortiz y col en Cd. Victoria Tamps. (1996) y en Escuinapa Sin. (1997) con aretes de Diazinón al 20 % , en cuanto a la alta susceptibilidad de las poblaciones de mosca del cuerno H. irritans en las zonas ganaderas de nuestro país. Por que es común en todos un efecto de limpieza inmediato. La diferencia que podemos apreciar en los tiempos de protección a la reinfestación está relacionada con el tipo de formulación comercial del producto. Sin embargo, como se esperaba con éstos productos y formulaciones probadas su residualidad es de 20 a 25 días y quizás un poco más en épocas de menor abundancia de la mosca.

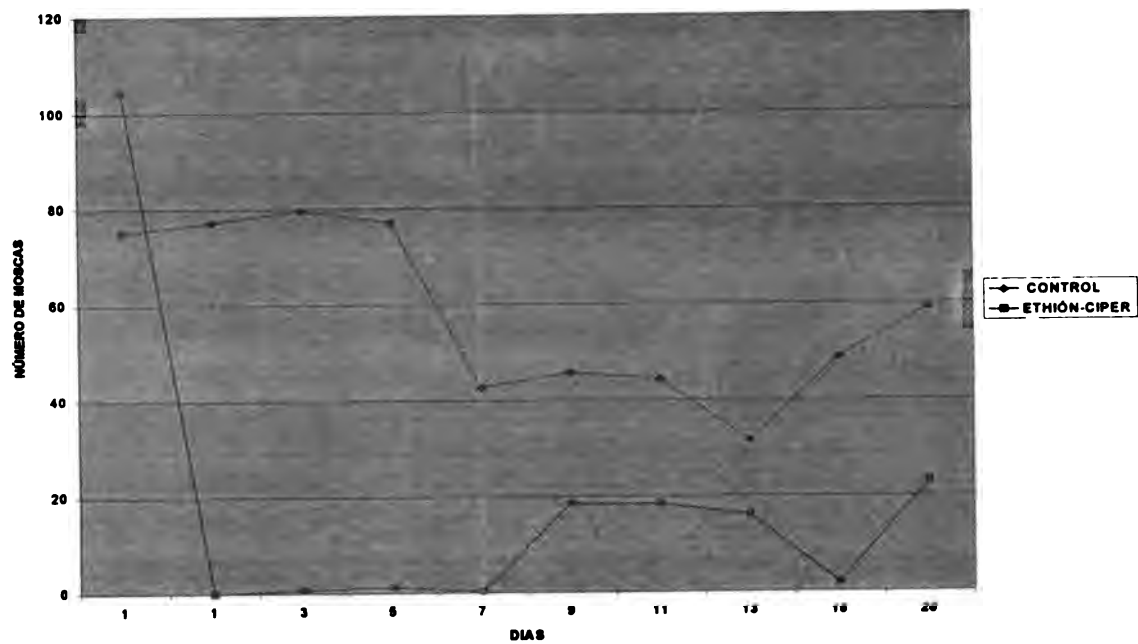


Con los resultados alcanzados por el Fenthión (88.3 %), Ethión-Cipermetrina (87.73 %) y los encontrados en los ensayos de residuos en papel filtro, concluimos que existe una alta susceptibilidad a los productos organofosforados y mezclas de estos con piretroides en las poblaciones de mosca del cuerno *H. irritans*, y estos pueden ser de gran utilidad en programas de manejo de la resistencia a piretroides.

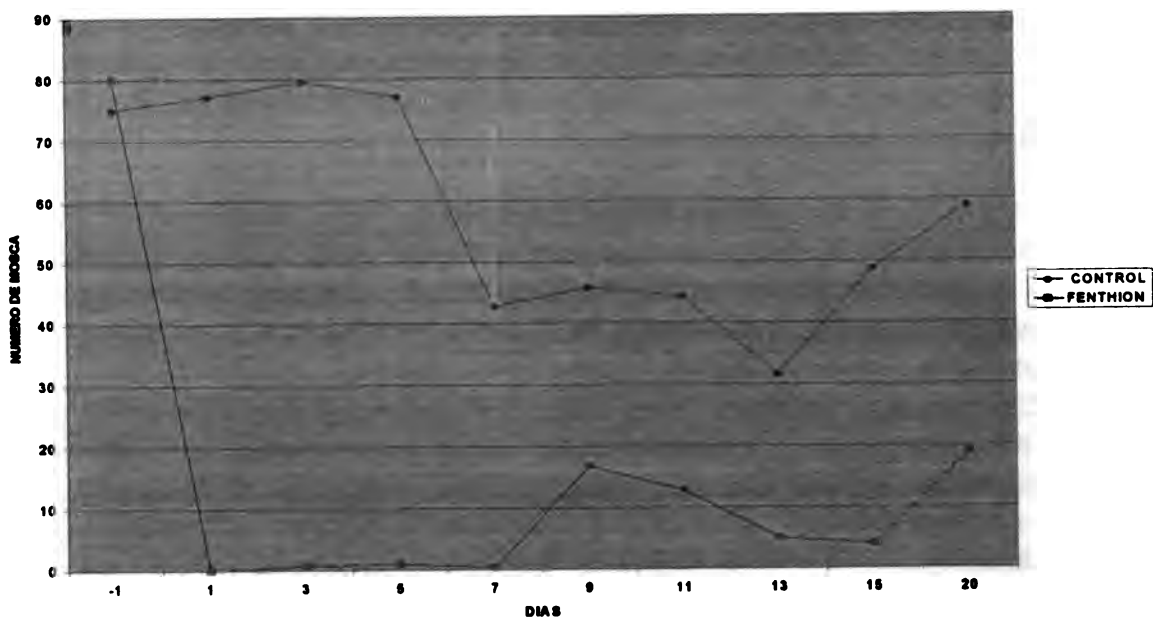
## V. BIBLIOGRAFIA.

- Cilek, J. E. And Kanpp, F. W. Enhanced Diazinon Susceptibility in Pyrethroid-Resistant Horn Flies (Diptera: Muscidae): Potential for Insecticide Resistancy Management. *J. Econ. Entomol.* 86(5):1303-1307.
- Kunz S. E., Ortiz E.M and Frago S.H. 1995. Situacion actual de la resistencia a los insecticidas en la mosca del cuerno (Diptera:Muscidae), en el Noreste de México. *Med. Entomol.* 32(5): 726-729
- Kunz S. E. and Schmidt, Ch.D. 1985. The Pyrethroid resistance problem in the Horn Fly. *J. Agric. Entomol.* 2(4): 358-363.
- Memoria de la segunda reunión anual del Consejo Técnico Consultivo Nacional de Sanidad Animal. 15-19. Noviembre de 1993. Importancia zoonositaria y económica de la mosca del cuerno *H. irritans* en México. 71-75, 367-378 pp.
- Ortiz E.M., Franco B.R., Osorio M.J., Soberanes C.N., Martínez I.F. y Fernandez R.D. 1996. Eficacia de los aretes impregnados de Diazinon, para el control de la mosca del cuerno *H. irritans* (L); (Diptera:Muscidae) Memorias de Reunión Nacional de Investigación Pecuaria, Morelos.
- Santamaría V.M., Ortiz E. M., Franco B. R., Frago S. H. Y Osorio M. J. 1995 . Evaluación Biológica de mosquicidas para el control de *H. irritans* en México y situación actual de la resistencia. Memorias del III Seminario Internacional de Parasitología Animal.
- Shepad, D.C. and A. A. Marchiondo. 1987. Toxicity of Diazinon to pyrethroid resistant and Susceptible Horn Flies, *Haematobia irritans* (L): Laboratory Studies and Field Trials. *J. Agric. Entomol.* 4:262-270

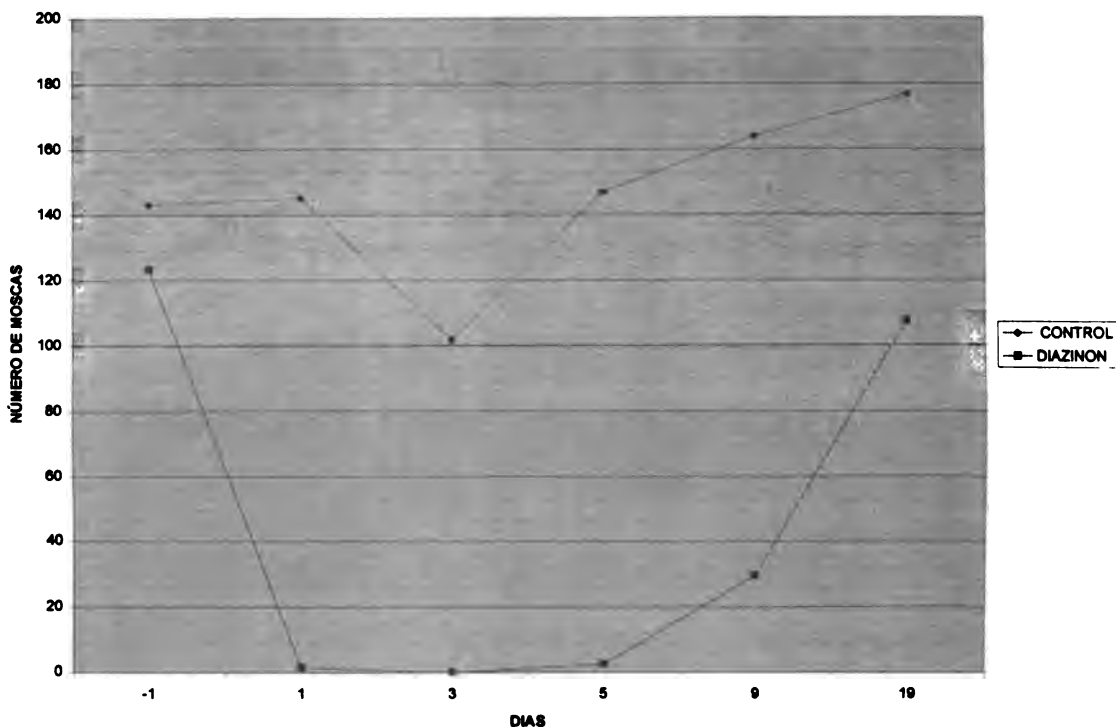
**GRÁFICA 1**  
**PROMEDIO DE MOSCAS *H. irritans***



**GRAFICA 2**  
**PROMEDIO DE MOSCAS *H. irritans***



**GRÁFICA 3**  
**PROMEDIO DE MOSCAS *H. irritans***



**CUADRO 1: PORCENTAJES DE EFECTIVIDAD DE 3 ORGANOFOSFORADOS EN GANADO INFESTADO CON *H. irritans***

DIA	% DE CONTROL ETHION	% DE CONTROL DIAZINON	% DE CONTROL FENTHION
1	100	98.86	100
3	99.12	100	99.37
5	98.31	98.26	98.83
7	99.06		99.06
9	59.38	81.92	63.59
11	54.45		68.06
13	49.05		84.17
15	95.9		93.19
19		39.21	

20	61.01		67.79
<b>GLOBAL</b>	<b>87.73</b>	<b>80.76</b>	<b>88.3</b>

**CUADRO 2: DOSIS LETAL 50 Y FACTORES DE RESISTENCIA OBTENIDOS EN H. Irritans, RANCHO "LA SOLEDAD", VERACRUZ**

MOLECULA	*DL50 SUSCEPTIBLE	*DL50 CAMPO	FACTOR DE RESISTENCIA
Permetrina	0.00129	**	**
Cipermetrina	0.0742	**	**
Diazinon	0.00112	***	***
Clorenvinfo	0.05211	1.5172	29.07

\* 60 minutos de exposición

\*\* No hay respuesta natural, las moscas se mantienen vivas en todas las concentraciones

\*\*\* La mortalidad comienza antes de

FECHA DE DEVOLUCION			

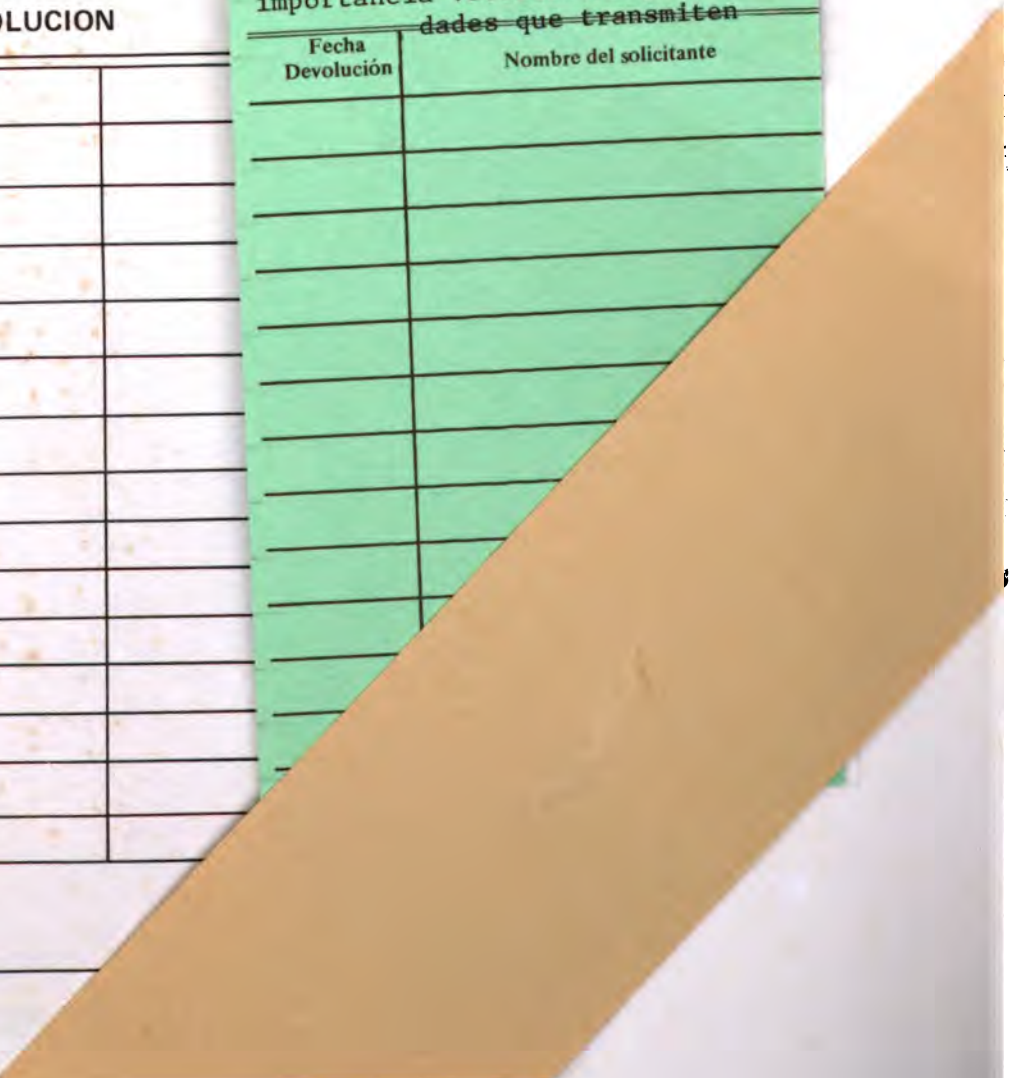
IICA  
L73-11

Autor

Título Control de la resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten

Fecha Devolución

Nombre del solicitante



1





