



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

PRUEBAS in vitro DE RESISTENCIA A  
PIRETROIDES SINTETICOS CONTRA Boophilus  
microplus PROCEDENTES DEL MUNICIPIO  
DE TECOLUTLA, VERACRUZ.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
MEDICO VETERINARIO Y ZOOTECNISTA  
P R E S E N T A :  
CLAUDIA HOFMANN SALCEDO

Asesores: M.V.Z. Héctor Quiroz Romero  
M.V.Z. Martín Ortiz Estrada

México, D. F.

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN





## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## INDICE

I	RESUMEN.....	1
II	INTRODUCCION.....	2
	IMPORTANCIA DE LA GARRAPATA <u>E.micropilus</u> .....	3
	IMPORTANCIA DE LA CAMPARA NACIONAL CONTRA LA GARRAPATA.....	4
	SISTEMAS MAS IMPORTANTES UTILIZADOS PARA EL CONTROL DE LA GARRAPATA.....	4
	ANTECEDENTES.....	5
	LOS PIRETROIDES SINTETICOS.....	7
	MECANISMO DE ACCION DE LOS PIRETROIDES.....	9
	JUSTIFICACION.....	11
	HIPOTESIS.....	11
	OBJETIVOS.....	11
III	MATERIAL Y METODO.....	12
IV	RESULTADOS.....	19
V	DISCUSION.....	23
VI	CONCLUSION.....	27
VII	LITERATURA CITADA.....	28

## RESUMEN

El propósito del presente estudio fue determinar la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* procedentes del Municipio de Tecolutla, Veracruz, hacia la flumetrina, cipermetrina y deltametrina. Las garrapatas *Boophilus microplus*, hembra repletas, se obtuvieron directamente del animal y se trasladaron en frascos de vidrio con un algodón humedecido en su interior al laboratorio del Centro Nacional de Parasitología Animal. En este laboratorio se seleccionaron las hembras repletas (.8 mm de diámetro) con ayuda de un microscopio estereoscópico e inmediatamente se colocaron en sus respectivas cajas de Petri para incubarlas 14 días, días requeridos para obtener la oviposición completa de las garrapatas. Los huevos obtenidos de cada predio ganadero, se colocaron en viales de vidrio (ix predio ganadero) y se incubaron entre 25-27 días. Una vez transcurridos se realizó la prueba de paquetes de larvas o prueba de Stone y Haydock. Para una mejor realización de las pruebas, las garrapatas se clasificaron en A, B, C, D, E, siendo las A recolectadas entre el 26 de abril y el 6 de mayo de 1992; El grupo B se recolectaron del 18 al 26 de mayo de 1992; El C fueron obtenidas el 30 de mayo y los grupos D y E, el 2 y el 15 al 20 de junio respectivamente. Las garrapatas de cada grupo fueron obtenidas de varias localidades y de diferentes ranchos (Cuadros 1 y 2). Para realizar la prueba de paquetes de larvas se utilizó papel filtro (7.5 x 8.5 cm), se impregnaron dos papeles filtro de cada uno de los piretroides sintéticos que se probaron (cipermetrina al .5%, flumetrina al 0.01% y deltametrina al .08%) y otros dos con únicamente aceite de oliva y tricloroetileno (Testigo), por cada rancho a evaluar. Los paquetes de larvas se incubaron 24 h a una temperatura de 28 C y con una humedad del 80 %, mismas condiciones utilizadas en los demás procedimientos. Después de haber transcurrido este período, se procedió a realizar la lectura de los paquetes de larvas, obteniéndose así un 100 % de mortalidad en todos los paquetes que fueron impregnados con estos tres productos químicos, que en la actualidad son los que más se utilizan. Estos resultados sugieren que el efecto de tales piretroides sintéticos sobre las garrapatas obtenidas de los 25 diferentes ranchos, es hoy en día 100% eficaz, al no haber ninguna evidencia de resistencia de la misma a estos compuestos garrapaticidas.

## INTRODUCCION

Las garrapatas representan una de las limitantes que afectan en la producción animal y están reconocidas como los ectoparásitos de mayor importancia en la ganadería bovina, principalmente de las zonas tropicales y subtropicales. Las mermas que en productividad originan motivaron, desde 1960, el combate organizado de dicha plaga a través del establecimiento de Campañas Federales de erradicación o control de Boophilus spp (29).

En México existen siete Géneros de la familia Ixodidae, con más de treinta especies, entre las cuales destaca Boophilus microplus, la cual se encuentra distribuida en un 53.3% de la superficie total del país y por lo tanto es la que más daños ocasiona (3,35).

### IMPORTANCIA DE LA GARRAPATA B. microplus:

La garrapata Boophilus microplus, originaria de Asia, requiere de un solo huésped para completar su ciclo biológico sin la necesidad de desprenderse del animal para realizar sus mudas de los distintos estadios parasitarios (2,35). Se estima que una infestación moderada con garrapatas causa un 25% de pérdidas en ganancias de peso (.26 kg por garrapata por año) (9), una disminución en la producción de leche hasta del 16%, costo de acaricidas (11%), pérdidas por muerte (7%), daños a las pieles (5%), aumento en la mano de obra (36%), pérdidas de carne (20%), pérdidas por otras parasitosis y subnutrición (5%), además causan anemia y transmiten enfermedades como la babesiosis (10,16,33,34) y theileriasis (5).

**Principales enfermedades del bovino, transmitidas por las garrapatas en México**

Causante	Transmisor	Enfermedad
Babesia bigémina	Boophilus spp	Fiebre de Texas o Piroplasmosis
Babesia bovis	Boophilus spp	Hemoglobinuria epidémica
Anaplasma marginale	Boophilus spp., Dermacentor spp., Rhipicephalus spp., Amblyomma spp., Haemaphysalis spp.	Anaplasmosis
Anaplasma centrale	Boophilus spp., Haemaphysalis spp.	Anaplasmosis
Borrelia theileri	Boophilus spp.	Espiroquetosis bovina

Al momento que las garrapatas succionan la sangre del animal, ejercen una acción mecánica y expoliatriz y a su vez tóxica, debido a que:

- a) Posee un anticoagulante y una toxina llamada neurotropina, que provoca procesos inflamatorios e inclusive, la parálisis por picadura de garrapata.
- b) Inhibe la síntesis proteica, la cual repercute en el desarrollo muscular (9).
- c) Afecta el sistema enzimático sobre todo a nivel hepático.
- d) Infestaciones moderadas producen inhibición de la síntesis de gonadotropinas hipofisarias, con el consiguiente decremento de progesterona, reflejando así un bajo índice productivo, por la alteración de los calores y por la presencia de estros silenciosos (10).

#### IMPORTANCIA DE LA CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA GARRAPATA:

Por las razones antes mencionadas, se creó en México, el Fideicomiso Campaña Nacional contra la garrapata en 1975, el cual planteó el control químico contra estos ectoparásitos (35,38), debido a la concientización de los ganaderos respecto al reconocimiento de la necesidad de un programa de lucha que pudiese apoyar las acciones sanitarias con los medios adecuados (10). Esta Campaña fué respaldada por el Banco Interamericano de Desarrollo, el cual otorgó un crédito de 35 millones de dolares, que conjuntamente con su buena organización y planeación lograda, resultó exitosa por haber logrado que:

- 1.-La superficie libre de garrapatas Boophilus microplus se incrementara de 36.6% a 47.8% en 1984.
- 2.-Las pérdidas en carne ocasionadas por la garrapata disminuyeran de 18.7 Kg x animal x año a 5Kg x animal x año, por la reducción notable de las tasas de infestación.
- 3.-De 13,428 baños de inmersión que existían en 1975, para 1984 aumentaron hasta 31,726 baños en todo el país (9).

#### SISTEMAS MAS IMPORTANTES UTILIZADOS PARA EL CONTROL DE LA GARRAPATA:

La aplicación de garrapaticidas en forma de emulsión o suspensión mediante baños de inmersión, túneles de aspersión manual, representan los métodos convencionales de control de garrapatas.

Los tres métodos pueden ser altamente efectivos (6), pero el control químico que más se ha utilizado en México, es el que se realiza a través de baños de inmersión del ganado bovino con sus-

tancias ixodicidas por haber demostrado ser muy efectivo (34). El constante uso de los diferentes productos químicos (ixodicidas), para lograr un buen control de las garrapatas, obliga a que estos parásitos desarrollen resistencia, observándose así una reducción en la efectividad de los acaricidas que se han venido utilizando desde 1800 y que hace de estos productos poco útiles para su control (23,24,25), esta situación es probable que continúe así, mientras el control del parásito se base principalmente en el uso de estos compuestos químicos (2,26).

El fenómeno de resistencia ha estado asociado básicamente a aquellas especies de garrapatas pertenecientes a la familia Ixodidae que parasitan principalmente al ganado bovino y se sabe que ocurre en todas o casi todas las áreas donde el ganado ha sido tratado con acaricidas para controlar las infestaciones (2) y este mismo fenómeno ha sido definido como el problema principal en el control químico de las garrapatas por varios investigadores y ésta se define como la capacidad de una fracción poblacional (1% ó más) de sobrevivir a ciertas concentraciones de productos químicos que resultan letales o afectan la reproducción al resto de la población considerada como "normal" (2,3,29).

#### ANTECEDENTES

Los compuestos arsenicales fueron los primeros productos químicos que se utilizaron para el combate de la garrapata, pero para 1937 en Argentina, Australia y Brasil se detectaron los primeros casos de resistencia (13,14). Posteriormente se comenzaron a utilizar los compuestos organoclorados, los cuales inicialmente tuvieron un gran éxito, pero para 1950 empezaron a aparecer garrapatas



resistentes a estos mismos compuestos y en 1954 al DDT (22,31). Estos compuestos fueron paulatinamente reemplazados por presentar problemas de resistencia, por ser tóxicos y dejar residuos en los tejidos de los animales destinados al consumo humano (30). A partir de 1955 surgen los productos organofosforados que son relativamente poco tóxicos para el ganado y el hombre, efectivos contra las plagas y además biodegradables (30). Desde 1975 fueron los únicos productos permitidos en México para el control de garrapatas (30). Desafortunadamente en 1964 surgen los primeros brotes de resistencia hacia los acaricidas OP en Australia y después en otras partes del mundo (14). Casi al mismo tiempo aparecen los carbamatos que corrieron igual suerte siendo similar la resistencia para ambos grupos químicos (30). Para los años 70 se comienzan a utilizar las amidinas cíclicas y en los 80's, se inicia el uso de compuestos denominados piretroides sintéticos en países como Australia, Sudáfrica, Brasil y algunos otros Países de Latinoamérica (15,16,20). En Australia, Wharton y Roulston, a principios de los 70's, detectaron tres cepas de B. microplus resistentes a organofosforados y carbamatos (24,26,31). En México, se demostró el primer caso de resistencia a los compuestos organofosforados a mediados de 1981 (11); a partir de ese hallazgo, se han realizado una serie de estudios que permitieron caracterizar y purificar una cepa de garrapatas Boophilus microplus, resistente a los compuestos organofosforados, la cual ha sido útil para la evaluación de productos químicos y para funciones diagnósticas (3). Problemas de este tipo ya se conocían a escasos cinco años de

haberse introducido los piretroides sintéticos al mercado (4). Nolan, et al (1977), demostró resistencia hacia la permetrina, el cual corresponde a un piretro natural, deltametrina y cipermetrina en una cepa de garrapatas B. microplus organofosfororresistentes con pequeñas cantidades de permetrina y deltametrina a acaricidas organofosforados (26), lo que significa que, la utilización de un organofosforado conjuntamente con un piretroide sintético o natural sinergiza su acción (25) y este mismo demuestra la existencia de resistencia cruzada entre los piretroides sintéticos y el DDT por su similitud en su estructura, situación preocupante, pero no alarmante hasta que se observó resistencia en cepas de garrapatas Boophilus microplus poco resistentes al DDT, lo cual quiere decir que, aparecerá resistencia en cepas que nunca hayan estado en contacto con el DDT (19,25,26) y esta misma reducción en la efectividad de los productos químicos debido a la resistencia creada por las garrapatas, que se ha detectado desde su utilización para su control, ha hecho necesario buscar nuevas alternativas que posibiliten un buen control de las garrapatas ( 2,22). Así, pues, la garrapata Boophilus microplus es una especie de particular importancia, debido a que presenta un amplio espectro de resistencia, hecho comprobado en Australia, Asia, Africa, Sudamérica e inclusive en México (14,30) y una vez perdida la susceptibilidad ésta ya no es recuperable y la frecuencia de alelos resistentes aumentará proporcionalmente a la intensidad del uso de acaricidas.

#### LOS PIRETROIDES SINTETICOS

Los primeros estudios realizados en 1924 sobre los piretroides

naturales, demostraron sus excelentes propiedades insecticidas y en 1935 surgieron los piretroides sintéticos, que no lograron su desarrollo debido a su elevado costo y a su fotosensibilidad (28).

El desarrollo reciente de los piretroides sintéticos indica que son compuestos más eficaces y que están menos expuestos al desarrollo de resistencia que los organofosforados, organoclorados y carbamatos (4).

Los piretroides naturales y los piretroides sintéticos son relativamente más seguros para los mamíferos y extremadamente tóxicos para los artrópodos (7,15). Hoy en día, no se han encontrado problemas de mutagenicidad o alteración alguna en la formación del corazón en animales de laboratorio utilizados para experimentación con piretroides sintéticos (21), además son ésteres halogenados con características farmacológicas óptimas como son:

- a) amplio espectro
- b) de fácil manejo
- c) biodegradables
- d) alta potencia ixodocida,
- e) efecto residual prolongado
- f) gran margen de seguridad

(28).

En la actualidad a los piretroides sintéticos, se les considera como los ixodocidas más potentes de los que se dispone y gracias a diversos estudios realizados por varios investigadores en México, han hecho que estos compuestos químicos sean de mayor actividad a la fotodescomposición (17,18,28). No todos los pi-

retroides sintéticos reúnen todas estas características antes mencionadas, debido a su configuración espacial de los isómeros que integran su estructura química o su estereoisomería. La diferente organización espacial entre los piretroides sintéticos (flumetrina, cipermetrina y deltametrina), trae como consecuencia que los piretroides sean una mezcla de isómeros con diferentes grados de actividad, así pues estos compuestos que más se utilizan hoy en día en nuestro país como la deltametrina, cipermetrina y flumetrina poseen 1,8 y 4 isómeros respectivamente, característica que los hace ser uno más efectivo que otro (28).

#### MECANISMO DE ACCION DE LOS PIRETROIDES

Los mecanismos de acción de los compuestos piretroides no están bien establecidos, pero se sabe que actúan a nivel del Sistema Nervioso Central y Periférico presentándose en primer lugar un efecto de hiperactividad, ataxia, convulsiones seguidos muy rápidamente de una parálisis general en el organismo blanco por la inhibición de la transmisión axonal, ya sea de neurona a neurona ó de neurona a músculo produciendo así la consiguiente parálisis y la muerte (7,12,30,36).

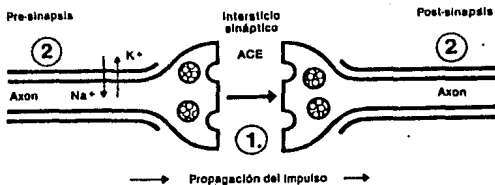
Mecanismo del efecto acaricida de los piretroides en el sistema nervioso del artrópodo.

1.- Organofosforados y carbamatos - Inhibición de la ACE

2.- Piretroides

- Inducción repetitiva del potencial axonal ("multiple spiking"), perturbación de la propagación del impulso axonal por cambios a la permeabilidad al  $K^+$   $Na^+$ .

Por cambios en la permeabilidad del  $K^+$   $Na^+$ , se produce el bloqueo en la transmisión axonal en el sistema nervioso de los artrópodos. Fig.1



## JUSTIFICACION

Este trabajo será útil para determinar si hay algún tipo de resistencia a piretroides sintéticos tales como: flumetrina, cipermetrina y deltametrina en alguna o algunas poblaciones de Boophilus microplus procedentes del Municipio de Tecolutla, Veracruz, ya que en México no hay evidencia alguna de este fenómeno por parte de este ectoparásito, la cual es muy abundante por lo que se considera de utilidad realizar estudios de muestreo (1,2).

## HIPOTESIS

Las garrapatas Boophilus microplus, procedentes del Municipio de Tecolutla, Veracruz no presentan resistencia a cipermetrina, flumetrina y deltametrina en pruebas in vitro.

## OBJETIVOS

Determinar la resistencia de Boophilus microplus, procedentes del Municipio de Tecolutla, Veracruz, hacia la flumetrina, cipermetrina y deltametrina o a alguno de estos tres piretroides sintéticos en pruebas in vitro.

## MATERIAL Y METODO

- 1.- EL trabajo de laboratorio se realizó en el Centro Nacional de Parasitología Animal de la SARH situado en el Km.12.5 de la carretera Cuernavaca-Cuatla.
- 2.- Se visitaron veinticinco predios ganaderos de la zona de Tecolutla, Veracruz, donde están utilizando los piretroides sintéticos lo menos cinco años atrás y donde el ganado explotado (Europeo o cruza de estos), posee infestaciones por garrapatas Roophilus microplus y de otros géneros de garrapatas en diferentes estadios. Por cada predio ganadero se estimaba obtener mínimo veinte garrapatas hembras repletas ( mayores de 8mm de longitud), las cuales se colectaron directamente del ganado bovino, haciendo movimientos suaves de tracción y a contrapelo (29). Se colocaron en frascos de vidrio con perforaciones en las tapas y con un algodón humedecido en su interior, rotulados con datos del Propietario, Dirección del rancho, Especimen colectado, Número de especímenes colectados y Fecha de la colecta.
- 3.- Estas muestras fueron refrigeradas a 4 C hasta su arribo al laboratorio, no permaneciendo más de 6 días en estas condiciones.
- 4.- Los productos a evaluar corresponden a:
  - a) Flumetrina-Ester fluorado:( alfa- ciano- (4-fluoro-3-fenoxil)-bencil- 3- 2-cloro-2-(4-clorofenil)-etenil-2, 2-dimetil ciclopropano carboxilato.Nombre comercial:Bayticol<sup>1</sup>
  - b) Cipermetrina- Ester diclorado:(+)alfa-ciano-3-fenoxibenzil (+) cis,trans 3-(2,2-diclorovinil)-2, 2-dimetil ciclopropano Carbo

xilato. Nombre comercial: Batestan Plus, Barricade, Cymbush.2

- c) Deltametrina-(Decametrin hasta 1980)-Ester dibromado:EL(1R,3R)  
-3-(2,2-dibromovinil)-2,2 dimetilciclopropano carboxilto de(s)  
3  
-alfa-ciano-3-fenoxibencil. Nombre comercial: Butox.

Las dosis discriminantes para los 3 diferentes piretroides sintéticos utilizados corresponden a las siguientes :

PRODUCTO QUIMICO	CONCENTRACION
FLUMETRINA	0.01%
CIPERMETRINA	0.5%
DELTAMETRINA	0.08% (32).

5.- Una vez identificadas las garrapatas en el laboratorio y de terminado el número exacto de garrapatas Boophilus microplus, hembras repletas y de hembras semirepletas, se seleccionaron y se colocaron en cajas de Petri con un papel filtro en su interior.

En cada caja de Petri por rancho, se introdujeron en una incubadora a una temperatura de 28 C, que podía variar entre los 28 C y los 30 C sin afectar de ningún modo a las garrapatas y con una humedad que podía variar entre 80%-85%.

Cinco viajes fueron necesarios para completar las recolectas de los 25 ranchos que se tenían programados.

El primer viaje fue programado del 25 de abril-6 de mayo de 92, el segundo muestreo para el 17 de mayo-24 de mayo de 92, el

1=marca registrada por Bayer de México, SA de CV.

2=marca registrada por Química Hoechst de México, SA de CV.

3=marca registrada por Química Hoechst de México, SA de CV.



tercer viaje para el 30 de mayo de 1992, el cuarto muestreo para el 2 de junio de 1992 y el último para realizarse del 15 al 20 de junio del mismo año.

No se permitió que las muestras permanecieran más de 5 días en refrigeración, mientras se trasladaban de Tecolutla al laboratorio del CENAPA. Las muestras traídas en cada viaje se les clasificó en A, B, C, D, E, facilitándose de esta manera la realización de los paquetes de larvas y su posterior lectura e interpretación. En algunos casos los grupos incluyen repeticiones de muestras de algunos ranchos.

Todos estos datos se muestran en el cuadro No.1.

6.- A los 14 días posteriores se revisaron las cajas de Petri y se tomaron de cada caja de Petri, 1g de huevos, equivalente a 20,000 larvas que se obtuvieron 25 días después de haber sido incubadas dentro de un vial de vidrio, por predio ganadero, en la incubadora a una temperatura no menor de 28 C y con una humedad relativa de 85%.

En el cuadro No.1, se enlistan las fechas de las colectas realizadas, las fechas programadas para realizar el retiro de la oviposición y las fechas programadas para realizar la impregnación de los papeles filtro y posteriormente los paquetes de larvas.

7- Una vez obtenidas las larvas de 5-14 días de nacidas, se practicó la prueba de Stone y Haydock o bien prueba de paquetes de larvas (2,16,37).

8.- Para cada prueba a realizar, se prepararon 150 ml de vehículo (2 partes de disolvente tricloroetileno por una parte del aceite de oliva ), por cada producto a utilizar (flumetrina,

cipermetrina y deltametrina) para las muestras procedentes de los veinticinco ranchos que se muestrearon en el Municipio de Tecolutla, Veracruz.

- 9.- Posteriormente, se procedió a impregnar los papeles filtro (7.5cm x 8.5cm) con los productos químicos antes mencionados a sus diferentes dosis discriminantes previamente determinadas en el laboratorio (32).

Las soluciones se prepararon calculando, en primera instancia, los gramos de cada producto químico a evaluar requeridos para preparar 50 ml de la solución madre (vehículo + gramos del principio activo de los 3 diferentes compuestos químicos), mediante la siguiente fórmula :

$$\frac{1\% \times 100\%}{(2) (3)} = \text{gramos del principio activo}$$

pureza para obtener 50 ml de la solución madre.

- 10.- Los papeles filtro se rotularon de la siguiente forma:

Número del predio: 1-25

Larvas de garrapata a tratar: B. microplus

Iniciales del producto con el que se impregnó: ciper., flu., ó delta.

La impregnación de los papeles filtro se llevó a cabo con una pipeta volumétrica de 1 ml ( 1 para cada producto químico). Se tomaron .67 ml de cada dilución preparada (flumetrina al 0.01% + 100 ml de tricloroetileno + 50 ml de aceite de oliva ; cipermetrina al 0.05% + 100 ml de tricloroetileno + 50 ml de aceite de oliva; deltametrina al 0.08% + 100 ml de tricloroetileno + 50 ml de aceite de oliva) y se impregnaron 2 papeles filtro de cada uno de los compuestos x predio ganadero.

11.-Por cada predio ganadero a evaluarse, se utilizaron en total 8 papeles filtro (2 para cada producto químico y 2 para los testigo) para la realización de los paquetes de larvas, con 100-120 larvas de Bopophilus microplus en su interior.

Los papeles testigo, sólo se impregnaron con tricloroetileno + el aceite de oliva (2:1).

Cepas de <u>B. microplus</u>	Deltametrina al 0.08%	Flumetrina al 0.01%	Cipermetrina al 0.5%	Testigo
Cepa experimental de campo.	2 repeticiones por predio ganadero	2 repeticiones por predio ganadero.	2 repeticiones por predio ganadero.	2 repeticiones x predio ganadero.

12.-Los papeles filtro se dejaron secar al aire libre durante una hora para proceder a la realización de los paquetes de larvas. Para la preparación de los paquetes de larvas, se utilizaron una charola de acero con agua jabonosa, papel filtro, el cual se dobla a la mitad por su parte más larga, para sellar sus extremos con pinzas de 5 mm, una vez habiendo introducido las larvas con un pincel y una aguja de disección ; se utilizó una tapa de una caja de Petri y se colocó dentro de la charola de acero con agua jabonosa para mantener la superficie seca y poner el paquete de larvas y de esta manera obtener los pínolillos del vial de vidrio con un pincel e introducirlos a los paquetes ayudándose con una aguja de disección para facilitar el depósito de éstos dentro del paquete, sin tocar la superficie del mismo evitando de esta forma una contaminación. El número de larvas que quedaron depositadas fueron de 100-120

larvas, lo que corresponde a un pincelazo y posteriormente se cerraron los paquetes con una la tercera y última pinza de 5 mm por su parte superior.

13.-Los paquetes llenos se pusieron sobre una charola de acero seca y se introdujeron en una estufa a 27 C y con una humedad de 85% durante 24 horas.

14.-A las las 24 horas, se procedió a realizar la lectura de los paquetes, iniciando por los paquetes testigo.El conteo se hizo minucioso con ayuda de un contador manual y una lupa y se anotaron el número de larvas muertas y el número de larvas vivas. A las larvas que poseían desplazamiento y no solo movimientos de sus coxas después de haber sido confrontadas con los piretroides sintéticos, y con el aceite de oliva y el tricloroetileno, se les consideró como vivas y se hizo una interpretación de resistencia.

En caso de que se hallaran larvas vivas después de la confrontación con los piretroides sintéticos, se interpretaría como resistencia de la garrapata Boophilus microplus a estos compuestos, la cual hoy en día, todavía no se detecta en México.

En caso de que se detectara algún foco de resistencia se realizarían dos repeticiones más a aquellas larvas de el o los predios en los que se haya observado la resistencia y otras dos repeticiones al azar para confirmar los resultados.

En caso de que se encontrara resistencia, los datos se analizarían utilizando la Metodología Probit, que es un método útil para estandarizar los experimentos y hacer comparaciones válidas entre diferentes curvas (8).

En el siguiente cuadro(Cuadro No.1), se indican las fechas en las que fueron muestreados los diferentes ranchos y las fechas exactas en las que se realizaron los retiros de oviposición y las pruebas de paquetes de larvas.

Propietario y No.de muestreos realizados en cada uno.	GRUPO	Colecta	Retiro de oviposición	Realización de la prueba.
1.- Parcela Escolar(2)	A C	26Abr92 30May92	10May92 13Jun92	4Jun92 8Jul92
2.- Alfredo Betancourt(3)	A C E	26Abr92 30May92 20Jun92	10May92 13Jun92 4Jul92	4Jun92 8Jul92 29Jul92
3.- Lorenzo Bernardino(2)	A C	26Abr92 30May92	10May92 13Jun92	4Jun92 8Jun92
4.- Eliazar Cabagnet (3)	A C E	27Abr92 30May92 19Jun92	11Jun92 13Jun92 3Jul92	5Jun92 8Jul92 29Jul92
5.- Gilberto Zorrilla(1)	A	1 May92	15May92	9Jun92
6.- Guillermo Zorrilla(1)	A	1 May92	15May92	9Jun92
7.- Guillermo Zorrilla(1)	A	3 May92	17May92	11Jun92
8.- Luis Noruya (1)	A	3 May92	17May92	11Jun92
9.- Olivio Thomás(2)	A A	3 May92 6 May92	17May92 20May92	11Jun92 14Jun92
10.-Miguel A.González(2)	A E	3 May92 17Jun92	17May92 1Jul92	11Jun92 26VJUL92
11.-Hugo Méndez(1)	A	4 May92	18May92	12Jun92
12.-Parcela Moy (1)	A	4 May92	18May92	12Jun92
13.-Thomás Russi (1)	B	18May92	2Jun92	27Jun92
14.-Leonel Vázquez (1)	B	19May92	3Jun92	29Jul92
15.-Juan Romacnoli (1)	B	20May92	4Jun92	30Jul92
16.-Zeferino Ortega (1)	B	22May92	6Jun92	1Jul92
17.-Prudencio Palacios(2)	B E	24May92 15Jun92	8Jun92 30Jun92	3Jul92 25Jul92
18.-Samuel Martínez(1)	E	17Jun92	1Jul92	26Jul92
19.-Equileo Bernardino(1)	C	30May92	13Jun92	8Jul92
20.-Lorenzo Séliz (1)	D	2Jun92	16Jun92	11Jul92
21.-Rafael Cabagnet(1)	C	30May92	13Jun92	8Jul92
22.-Saúl Medina(1)	D	2Jun92	16Jun92	11Jul92
23.-Eleuterio Espinoza(1)	E	18Jun92	2Jul92	27Jul92
24.-Hugo Méndez(1)	E	18Jun92	2Jul92	27Jul92
25.-Alejandro Rodríguez(1)		19Jun92	3Jul92	28Jul92

## RESULTADOS

En total se muestrearon 25 predios ganaderos ubicados en 7 diferentes localidades dentro del mismo Municipio de Tecolutla, Veracruz, que se encuentra yendo por la carretera Nacional Poza Rica-Nautla. Se realizaron cinco visitas en total para obtener todas las muestras de los diferentes predios ganaderos mencionados en el cuadro No.1.

En la primer visita se realizaron muestreos en 13 predios ganaderos siendo para la segunda vez 5 ranchos los muestreados, 5 para la tercera ocasión, 2 ranchos para la cuarta vez y por último 8 ranchos en el período comprendido del 15 al 20 de junio de 1992.

Se estimaba recolectar a contrapelo un promedio de 20 garrapatas hembras adultas (repletas o bien semirrepletas) por rancho, parcela o bien predio ganadero, pero se obtuvieron un promedio de 10 garrapatas hembras adultas por cada rancho.

Algunos ranchos resultaron ser doblemente muestreados o inclusive hasta tres veces para obtener el número de muestras lo mayor posible para que en caso de que alguna muestra se hechara a perder como lo fué el caso de las muestras obtenidas del rancho del Sr.Martín Vázquez del Ejido Ricardo Flores Magón y del Sr.Prudencio Palacios y así de ésta forma obtener resultados altamente confiables.

Al realizar la prueba de paquetes de larvas, resultaron 5 grupos de larvas, cada grupo de muestras se les practicó la prueba al mismo tiempo y se hicieron las lecturas el mismo día para cada grupo y de esta forma resultó más sencillo, práctico y económico obtener los resultados.

En la lectura de los paquetes del primer grupo, realizada el 11 de junio de 1992, el 100% de las larvas de los paquetes impregnados con los tres piretroides sintéticos ( cipermetrina, flumetrina y deltametrina ) resultaron muertas y las larvas de los dos paquetes testigo resultaron un 99% vivas.

El segundo grupo se confrontó el primero de julio de 1992, realizándose la lectura 24 h después resultaron de la misma forma, el 100% de las larvas muertas.

Las pruebas para el tercer grupo se llevaron a cabo el 10 de julio de 1992, obteniéndose 24 h después un 100% de las larvas muertas . Asimismo el 15 de julio después de la lectura de los 18 paquetes de larvas impregnadas 6 con cipermetrina, 6 con deltametrina y 6 con flumetrina, se observó que ninguna fué capaz de sobrevivir a las dosis discriminantes determinadas previamente. Por último el 4 de agosto de 1992, se realizaron las últimas pruebas de 5 ranchos, no hubo ninguna señal de algún tipo de resistencia de la garrapata Boophilus microplus a estos tres productos químicos.

Todos estos datos se mencionan en el cuadro No. 2 y No.3.

Cuadro No. 2

Gupo	Propietario	Localidad	Frp
A	Parcela Escolar	Monte Gordo	11 Jun 92
	Eliazar Cabagnet		
	Alfredo Betancourt	Flores Magón Plan de Villa Cuauhtémoc La Guadalupe Costa Esmeralda Playa Paraíso La Guadalupe La Guadalupe La Guadalupe La Guadalupe	11 Jun 92
	Lorenzo Bernardino		
	Gilberto Zorrilla		
	Guillermo Zorrilla		
	Luis Noruya		
	Guillermo Zorrilla		
	Olivio Thomás I.		
	Pedro Rivera		
Miguel A. González			
Hugo Méndez			
Parcela Moy			
B	Leonel Vázquez	Ejido Ricardo Flores Magón	1 Julio 92
	Juan Romacnoli R.		
	Zeferino Ortega Prudencio Palacios		
C	Equileo Bernardino	Ejido Monte Gordo	10 Jul 92
	Alfredo Betancourt		
	Lorenzo Bernardino		
	Eliazar Cabagnet Parcela Escolar		
D	Lorenzo Sélix	Ejido Monte Gordo	15 Jul 92
	Rafael Cabagnet		Repet. 2 Ago 92
	Saúl Medina		
E	Samuel Martínez	Costa Esmeralda	4 Ago 92
	Miguel A. González	E. La Guadalupe	
	Eliazar Cabagnet	E. Monte Gordo	
	Alfredo Betancourt	E. Monte Gordo	
	Prudencio Palacios	E. Flores Magón	

Cuadro No. 2

En este cuadro se mencionan las Localidades donde se ubican los diferentes predios ganaderos que fueron muestreados en el periodo comprendido entre el 26 de Abril y el 20 de Junio de 1992 y las fechas exactas en las que se realizaron las pruebas de paquetes de larvas (Frp).



Cuadro No 3

Grupo	Cipermetrina %	De	Flumetrina Mortalidad	Deltametrina	Testigo
A	100%		100%	100%	.01%
B	100%		100%	100%	0%
C	100%		100%	100%	0%
D	100%		100%	100%	0%
E	100%		100%	100%	.01%

Cuadro No.3

El porcentaje de mortalidad para todos los paquetes de larvas que se confrontaron con los tres piretroides sintéticos más utilizados hoy en día, fué de 100% para todos los grupos de garrapatas y para los paquetes de larvas que se utilizaron como Testigo. Para 2 de los grupos el porcentaje de mortalidad fué de 99%.

## DISCUSION

Se muestrearon 27 predios ganaderos diferentes, pero se incluyeron en este trabajo sólo 25 ya que las muestras de 2 ranchos se echaron a perder por exceso de humedad y otras se murieron posiblemente por la aplicación del tratamiento garrapaticida muy poco tiempo antes del muestreo, suceso no informado.

Debido a que la incidencia de la garrapata Boophilus microplus no fue elevada en los diferentes ranchos muestreados, fué necesaria la repetición de muestreos, donde hubo ciertas facilidades para la realización de dichos muestreos, como las fueron ;

- 1.- El gran interés por parte de los propietarios hacia las pruebas a realizarse y sobre todo a los resultados que se obtuvieran, para tomar las medidas necesarias y mantener en mejores condiciones a sus animales, buscando una mayor productividad de sus ranchos y por lo tanto mayores ganancias.
- 2.- La localización de algunos ranchos los hizo muy accesibles a ser visitados y muestreados y volverlos a muestrear, debido a que el número de garrapatas Boophilus microplus que se encontró infestando al ganado vacuno no fueron las esperadas para realizar las pruebas de paquetes de larvas.
- 3.- Los dueños, trabajadores y encargado, prestaron parte de su tiempo y mostraron ser del todo amigables deseando participar activamente en el trabajo apoyando siempre con el transporte, gasolina, casa, comida e infinidad de atenciones que siempre brindaron.

Aunque el número de garrapatas que se encontraron infestando al

ganado no fué el esperado, sus oviposiciones obtenidas fueron suficientes para el llenado de los paquetes en la prueba de Stone y Haydock o bien prueba de paquete de larvas.

La literatura menciona que la edad requerida de los pinolillos para realizar estas pruebas es no menores de tres días y no mayores de 14 días, así que tomando esto en consideración los pinolillos obtenidos de garrapatas provenientes de distintos ranchos en fechas variadas, no rebasaron este límite y aunque poseían diferentes edades con solo unos días de diferencia no pudo haber habido ningún factor que alterara los resultados por lo que se consideran altamente confiables.

El objetivo de realizar las pruebas con las garrapatas en su estadio larvario, es diagnosticar la resistencia de éstas a los diferentes compuestos garrapaticidas en este estado que es cuando presentan una mayor tolerancia y así de esta forma, nos asegura que si muere un 100% de la población, ninguna se desarrollará y producirá mermas; en cambio si solo una de mil garrapatas llega a sobrevivir al tratamiento garrapaticida a las dosis recomendadas por los laboratorios, esta misma se reproducirá y generará un promedio de 3000 pinolillos, algunos de los genes que les dan la característica de resistir a estos compuestos químicos, se transmitirán de generación a generación e indudablemente la frecuencia de alelos resistentes irá aumentando proporcionalmente a la intensidad del uso de los acaricidas, situación menos deseada para la producción y salud animal.

Con estos fines se colectaron garrapatas de 25 predios ganaderos y fué necesario realizar 5 viajes para la obtención de todas las

muestras y las pruebas de paquetes de larvas se llevaron a cabo conforme las colectas se realizaron, las cuales se obtuvieron en un período no mayor de 10 días en cada viaje.

La mortalidad de las larvas tratadas con los tres piretroides sintéticos que se probaron (cipermetrina, flumetrina y deltametrina), fué sin duda alguna la que se deseaba, más no la que se esperaba por las diferentes notificaciones que han sido publicados de la resistencia que ya se ha determinado en Boophilus microplus a estos tres diferentes piretroides sintéticos en otras partes del mundo, como lo es en Africa, Brasil, Australia, existiendo así la amplia posibilidad de presentarse este fenómeno en México y con mayor razón en esta zona donde la utilización de estos compuestos ha sido indiscriminado, (cada 15 a 21 días dependiendo el rancho ). Por esta razón se esperaba encontrar resistencia de esta especie de garrapata porque como ya se sabe ésta ha sido constantemente controlada a base de compuestos organoclorados y posteriormente con la utilización de compuestos organofosforados, por lo que ya es sin duda alguna resistente a ambos compuestos químicos.

Los avances Científicos y Tecnológicos logrados por investigadores han brindado a la humanidad innumerables beneficios como lo es el descubrimiento de las piretrinas naturales y la posterior realización de las piretrinas sintéticas. Estos compuestos químicos en la actualidad se consideran como los ixodicidas más potentes de los que se dispone y lo seguirán siendo hasta que aparezcan cepas resistentes a los piretroides sintéticos, no solo en otras partes del mundo sino en México, donde no existe por

escrito ningún reporte de resistencia de las garrapatas a los piretroides sintéticos.

### CONCLUSION

Con este estudio se reafirma lo efectivo que son los piretroides sintéticos para el control de la garrapata y lo seguirán siendo mientras no aparezca ningún tipo de resistencia de las garrapatas hacia estos compuestos.

Pese a que se realizaron las pruebas con pinolillos de diferentes edades y a que se repitieron muestreos en los mismos ranchos en condiciones distintas y con repeticiones de paquetes de larvas, no se encontró evidencia alguna de resistencia de garrapatas Boophilus microplus hacia estos compuestos garrapaticidas y por lo tanto permanecerán en el mercado como los mejores garrapaticidas por más tiempo y continuarán siendo los más utilizados.

Estos resultados son muy significativos tanto para los ganaderos como para las diferentes Industrias fabricantes de estos compuestos, así como para los animales porque sus utilidades se ven altamente incrementadas y a la vez se promueve la salud de los animales los cuales son muy nobles para el ser humano por todos los beneficios que brindan al ser humano.

## LITERATURA CITADA

1. Aguirre, E.J. : Resistencia de las garrapatas hacia los ixodidas. Memorias del Curso de Identificación de Garrapatas y Diagnóstico de las Enfermedades Hemoparasitarias que transmiten. Centro Nacional de Parasitología Animal, Jiutepec, Morelos, México. 1989. 34-38. Dirección de Salud Animal. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Jiutepec, Morelos, México (1989).
2. Aguirre, E.J. : Garrapata: En: Enciclopedia de México. Tomo VI. 11 a. ed. Secretaría de Educación Pública. 3231-3239. Compañía Editora de Enciclopedias de México, S.A. de C.V., México, D.F., 1987.
3. Aguirre, J.A., Hernández, C., Ortiz, A., Román, E., Santamaría, V. y Sobrino, L.: Resistencia de las garrapatas en México. Memorias del IV Seminario Internacional de Parasitología Animal, Jiutepec, Morelos, México. 1986. 281-306. Dirección de Salud Animal. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Jiutepec, Morelos, México (1986).
4. Anónimo: Barricade, Piretroide garrapaticida e insecticida para baños de inmersión. Boletín Técnico de Shell. Shell de México. México, D.F., 1986 (Manual).
5. Bayer, Departamento Técnico de Veterinaria: La Garrapata. Boletín Técnico de Bayer. Bayer de México. México, D.F., 1986 (Manual).
6. Bayer, Departamento Técnico de Veterinaria: Bayticol. Boletín Técnico de Bayer. Bayer de México, México, D.F., 1986 (Manual).
7. Bulman, G.M., Aguilar, M., Díaz, C.R., Brunel, C.M., Cicuta, M.E. y Etchechqury, H.M.: Evaluación de la Acción garrapaticida de un nuevo piretroide sintético foto-estable en un rodeo de zona infestada por Boophilus microplus en el área subtropical

- de la República de Argentina. Gac. vet. , 42 : 338 - 351 (1980).
8. Calderón, Luz del C.: Análisis Probit. Manual del Centro Nacional de Parasitología Animal para el personal operativo de la Campaña Nacional contra la garrapata y laboratorios de Sanidad Animal. Centro Nacional de Parasitología Animal, Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. 1-47. Dirección de Salud Animal, Jiutepec, Morelos, México. 1989.
9. Camacho, E.M.: Antecedentes Históricos de la Campaña Nacional contra la garrapata en México, hasta la creación de un Fideicomiso para su Desarrollo. Memorias de Producción de leche en el trópico. Martínez de la Torre, Veracruz. 1981. 196-203. Fac. de Med. Vet. Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. (1981).
10. Castellanos, H.J.L.: Patogenia de Boophilus microplus. Memorias del Curso de Identificación de Garrapatas y Diagnóstico de las Enfermedades Hemoparasitarias que transmiten. Centro Nacional de Parasitología Animal, Jiutepec, Morelos, México. 1989. 45-51. Dirección de Salud Animal. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Jiutepec, Morelos, México (1989).
11. CENAPA; Informe sobre los trabajos realizados con la cepa "Tuxpan". Fideicomiso Campaña Nacional contra la garrapata. 1983. Centro Nacional de Parasitología Animal. Jiutepec, Morelos, México. 1983.
12. Cordovés, C. y Fleites, A.R.: Efecto "Knock Down" del deltamethrin en bovinos infestados con garrapatas Boophilus microplus. Ci. Tec. Agr. 10 (2):15-21 (1988).



13. Darrow, I.D. and Whetstone, M.T.: Age and susceptibility of nymphal lone star ticks to selected ixodicides. J. Econ. Entomol., 65:156-158 (1972).
14. Drummond, R.O.: Resistance in ticks and insects of veterinary importance. Livestock insects laboratory. J. Econ. Entomol., 70 : 303-313 (1977).
15. Heller, H.A., Varma, M.G.R. and Cook, S.: The effect of synthetic pyrethroids on some african ixodidae. Recent Adv. Acarol., 11: 18-21 (1979).
16. Khan, H.M. and Sirvastava, C.S.: Evaluation of synthetic pyrethrin against cattle tick. Boophilus microplus. Indian vet., 63:383-386 (1982).
17. Miller, A.T. and Adams, E.M.: Mode of action of pyrethroids. Academic Press, Inc., New York, 1982.
18. Muñoz, G.R.: Los insecticidas piretroides. Agro-Síntesis, 18(3): 42-48 (1987).
19. Narro, A., Guerrero, R.E., Lozoya, S.A. y Landeros, F.J.: Garrapatas de animales domésticos en el área de influencia de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila. Noticias Médico Veterinarias, 1(4):14-19 (1986).
20. Newton, L.G.R. Acaricide resistance and cattle tick control. Austr. vet. J., 43: 389-397 (1967).
21. Nicholson, R.A., Chalmers, A.E., Hart, R.J. and Wilson, G.R.: Piretroides, acción y degradación en la garrapata del ganado vacuno (B. Microplus). Academic Press., New York, 1980.
22. Nolan, J.: Current developments in resistance to amidine and pyrethroid tickicides in Australia. Austr. vet. J., 6: 84-90 (1981).

23. Nolan, J.; Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. vet.Parasitol,18: 155-166 (1985).
24. Nolan, S. and Roulston, W.J.:Acaricide resistance as a factor in the management of acari of medical and veterinary importance. Recent Adv.Acarol.Academic Press,New York,1979.Citado por: Aguirre, J., et al.
25. Nolan, J., Roulston, W.T. y Schnitzerling, H.J.:The potencial of some synthetic pyrethroids for control of the cattle tick (Boophilus microplus). J.Austr. vet.,55: 101-107 (1977).
26. Nolan, J., William, J., Roulston, W.T. and Wharton, H. : Resistance to synthetic pyrethroids in a DDT-resistant strain of Boophilus microplus.Pestic.Sci.9: 484-486 (1977).
27. Nolan, J., wilson, J.T., Green, P.E. and Bird, E.P.:Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick (B. microplus).J.Austr.vet.,66: 179-182 (1980).
28. Ocampo, L. y Sumano, H.: Los piretroides y su desarrollo.Agro-Síntesis, 18 (2): 56-59 (1987).
29. Ortiz, S.M. y Aguirre, E.J.: Colecta y conservación de especímenes. Memorias del Curso de Identificación de Garrapatas y Diagnóstico de las Enfermedades Hemoparasitarias que Transmiten. Centro Nacional de Parasitología Animal, Jiutepec, Morelos, México. 1989. 17-18.Dirección de Salud Animal,Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.Jiutepec, Morelos, México (1989).
30. Osorio, M.J.:Efecto de diferentes concentraciones de deltametrina sobre 6 cepas de ixodidos mediante la prueba de establo

- con cámaras. Tesis de licenciatura. Fac. de Cienc. Biol. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Cuernavaca, Morelos, México, 1989.
31. Roulston, W.J.: Prospects for chemical control of Boophilus microplus in Australia. Memories of the 3rd International Congress of Acarology. Prague. 1971. 693-695. Division of Entomology, Long Pocket Laboratories, Indooroopilly, Birsbane, Australia (1971).
32. Santamaría, V.M., Franco, B.R. y Arreola, G.T.: Determinación de las dosis discriminantes a tres piretroides sintéticos en cepa de Boophilus microplus susceptible. Memorias del II Congreso Nacional de Parasitología Veterinaria. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de Veracruz. Veracruz, Ver.. 1992. Fac. de Med. Vet. y Zoot. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. (1992).
33. SARH: Manual de Procedimientos para la Evaluación y Registro de Ixodíctidas. Programa de Acreditación de Médicos Veterinarios Zootecnistas. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. México, D.F., 1990.
34. Soffer, C.H., Quiroz, R.H., Meza, R.B., Berruecos, V.J.M., Pablos, H.J. y Castillejos, G.R.: Efecto del lavado con agua sobre la eficiencia de tres acaricidas contra Boophilus microplus in vitro. vet. Mex., 19:231-232 (1988).
35. Solís, S.S.: Ecología de Garrapatas en México. Memorias del VI Congreso Nacional de Parasitología Animal. Jiutepec, Morelos, México. 1986. 2-7. Dirección de Salud Animal. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Jiutepec, Morelos, México, (1986).

36. Stendel, W.,: The relevance of different tests methods for the evaluation of tick controlling substances. J. South Afr. vet. Ass., 51:147-152 (1980).
37. Stone, B.F. y Haydock, K.P.: A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick Boophilus microplus. Bull. Entomol. Res., 53: 563-578 (1962).
38. Trápaga, B.J.: Desarrollo de la Campaña contra la Garrapara en México. Centro Nacional de Parasitología Animal. Jiutepec, Morelos, México. 1986. 329-335. Dirección de Salud Animal. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Jiutepec, Morelos, México (1986).
39. Vázquez, R.C.: Experiencias en México con la flumetrina para el control de la garrapata. Memorias del VI Congreso Nacional de Parasitología Animal. Centro Nacional de Parasitología Animal. Jiutepec, Morelos, México. 1986. 276-280. Dirección de Salud Animal. Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos. Jiutepec, Morelos, México (1989).