



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**EVALUACIÓN DE LA EFECTIVIDAD DE UN IXODICIDA EXPERIMENTAL
CONTRA UNA CEPA SUSCEPTIBLE DE *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*
EN BOVINOS ESTABULADOS**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JORGE ALBERTO OLIVERA GARCÍA

TUTOR: MA. TERESA C. QUINTERO MARTÍNEZ

COMITÉ TUTORAL: FROYLÁN IBARRA VELARDE

ZEFERINO GARCÍA VÁZQUEZ

México, D.F.

2010



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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.

ÍNDICE

Índice.....	I
Índice de figuras, cuadros y gráficas.....	IV
Abreviaturas.....	VI
Resumen.....	1
Introducción.....	2
Clasificación taxonómica.....	3
Morfología.....	3
Ciclo biológico.....	4
Resumen del ciclo de vida.....	5
Distribución mundial.....	6
Distribución en México.....	6
Control.....	7
Ixodicidas y mecanismos de acción.....	7
Organofosforados.....	7
Piretroides.....	8
Amidinas.....	8
Macrólidos o lactonas macrocíclicas.....	9
Inhibidores del desarrollo.....	9
Fenilpirazolonas.....	9
Resistencia hacia los ixodicidas.....	10
Alternativas de Control.....	10
Características del Ixodicida experimental.....	11

Justificación	13
Objetivos	13
Objetivo General.....	13
Objetivos Específicos.....	13
Hipótesis	14
Material y métodos	14
Ubicación.....	14
Larvas de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	15
Prueba de establo.....	16
Bovinos.....	16
Infestaciones.....	16
Conteos.....	17
Tratamiento.....	17
Colecta.....	18
Prueba de laboratorio.....	19
Inmersión de larvas (Técnica de Shaw).....	19
Diseño experimental.....	19
Conducción del estudio.....	20
Evaluación <i>in vitro</i> de larvas de <i>R. (Boophilus) microplus</i>	20
Porcentaje de Efectividad.....	20
Evaluación de los parámetros reproductivos.....	21
Análisis estadístico.....	21
Resultados	23
Evaluación <i>in vitro</i>	23

Evaluación en prueba de establo.....	23
Medición de parámetros reproductivos.....	23
Discusión.....	31
Conclusiones.....	34
Referencias.....	35

ÍNDICE DE FIGURAS, CUADROS Y GRÁFICAS

Figura 1.	Hembra de <i>R. (Boophilus) microplus</i>	3
Figura 2.	Macho de <i>R. (Boophilus) microplus</i>	3
Figura 3.	Detalles de vista ventral.....	4
Figura 4.	Vista dorsal a detalle.....	4
Figura 5.	Ciclo biológico de <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	4
Figura 6.	Mapa de la Situación Zoonosanitaria actual en la Campaña Nacional contra la garrapata <i>Boophilus spp.</i>	6
Figura 7.	Mapa de Querétaro.....	14
Figura 8.	Hembra repleta de <i>R. (Boophilus) microplus</i>	15
Figura 9.	Bovinos utilizados en la prueba.....	16
Figura 10.	Infestación artificial.....	16
Figura 11.	Bovino infestado con <i>R. (Boophilus) microplus</i>	17
Figura 12.	Aplicación de tratamiento ixodicida.....	17
Figura 13.	Garrapatas colectadas.....	18
Figura 14.	Hembra ovipositando.....	18
Figura 15.	Inmersion de larvas por técnica de Shaw.....	19
Figura 16.	Producto experimental Tlalaxin 13.....	19
Figura 17.	Huevos, cascarones y larvas desecadas.....	21
Cuadro 1.	Porcentaje de mortalidad <i>in vitro</i> de larvas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> sometidas a la técnica de diagnóstico de resistencia de Shaw (modificada usando Tlalaxin 13)	24

Cuadro 2. Número de garrapatas hembras repletas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> cepa “Susceptible” colectadas por día (con sumatoria y media) en bovinos infestados artificialmente en el grupo Testigo.....	25
Cuadro 3. Cuadro 3 : Número de garrapatas hembras repletas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> cepa “Susceptible” colectadas por día (con sumatoria y media) en bovinos infestados artificialmente en el grupo tratado con Tlalaxin 13 aplicado por aspersión a la Concentración Comercial Recomendada (CCR).....	26
Cuadro 4. Número promedio de garrapatas contabilizadas en los grupos Testigo y tratado con Tlalaxin 13 y porcentaje de efectividad sobre la repleción (Prueba de establo).....	27
Cuadro 5. Promedio, varianza y desviación estandar obtenidos de los grupos Testigo y tratado en la Prueba de Establo.....	27
Cuadro 6. Comparación de diversos Parámetros biológicos obtenidos de las garrapatas colectadas de los grupos Testigo y tratado con Tlalaxin 13 mediante una Prueba de establo.....	28
Gráfica 1. Número de garrapatas hembras repletas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> cepa “Susceptible” colectadas por día en bovinos infestados artificialmente en el grupo Testigo.....	28
Gráfica 2. Número de garrapatas hembras repletas <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i> cepa “Susceptible” colectadas por día en bovinos infestados artificialmente en el grupo tratado con Tlalaxin 13 aplicado por aspersión a la Concentración Comercial Recomendada (CCR).....	29
Gráfica 3. Comparación de los promedios de garrapatas repletas en los grupos Testigo y tratado con Tlalaxin 13.....	30

ABREVIATURAS

<i>A. marginale</i>	<i>Anaplasma marginale</i>
<i>B. annulatus</i>	<i>Boophilus annulatus</i>
<i>B. bigemina</i>	<i>Babesia bigemina</i>
<i>B. bovis</i>	<i>Babesia bovis</i>
CENAPA	Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal
FMVZ	Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
GABA	Ácido gama amino butírico
g	Gramos
K	Potasio
MFA	Monofosfato de Adenosina Cíclico
Na	Sodio
<i>R. (Boophilus) microplus</i>	<i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>
SAGARPA	Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación
SENASICA	Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria
SNC	Sistema Nervioso Central
<i>spp</i>	Especies
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México

I. RESUMEN

El objetivo de este estudio fue el de evaluar la eficacia terapéutica y toxicidad del ixodicida experimental Tlalaxin 13 contra garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* bajo condiciones *in vitro* y en prueba de establo. Para el escrutinio *in vitro*, se determinaron los porcentajes de mortalidad larvaria utilizando la técnica de Shaw, así como los parámetros reproductivos de las garrapatas. Para la prueba de establo se utilizaron 12 bovinos *Bos taurus*, los cuales fueron infestados artificialmente durante 3 días consecutivos con 20,000 larvas de la cepa Susceptible, siendo observados diariamente hasta la aparición del estadio adulto. A los 21 días posteriores a la infestación, se procedió a contar el número de garrapatas adultas para realizar el tratamiento. Los bovinos fueron divididos en 2 grupos de 6 animales cada uno. El grupo 1 (tratado) recibió un baño de aspersion aplicando 6 litros de Tlalaxin 13 por bovino a la concentración comercial recomendada por el fabricante y se procedió a realizar conteos en los primeros 5 días postratamiento para determinar el porcentaje de efectividad con base en el derribo de garrapatas adultas. El grupo 2 fungió como Testigo sin tratamiento. Se llevó a cabo una colecta de 40 garrapatas adultas del grupo tratado y 40 del grupo Testigo, las cuales fueron llevadas al laboratorio para evaluar los parámetros de oviposición y eclosión. Los datos obtenidos se sometieron a un Análisis T de Student. Los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro* mostraron una efectividad del 100% y de 46.86 % en la prueba de establo. Con relación a los parámetros reproductivos se encontró un Porcentaje de Oviposición de 43.22 % en el grupo Testigo y de 24.96 % en el grupo tratado; en cuanto a los porcentajes de Eclosión, el grupo Testigo obtuvo 72.97%, mientras que el grupo tratado obtuvo 59.99%. Se demostró que existen diferencias significativas entre ambos grupos, con un nivel de significancia $P < 0.05$ según el análisis T de Student. Se concluye que bajo las condiciones en las que se realizó el estudio y aunque los resultados no fueron satisfactorios en la prueba de establo, se tienen evidencias de que el producto experimental Tlalaxin 13 mostró alta efectividad a nivel laboratorio, por lo que es necesario realizar evaluaciones futuras para determinar su potencial real como ixodicida.

I. INTRODUCCIÓN

Las garrapatas son artrópodos, ectoparásitos hematófagos, de amplia distribución mundial y que tienen un impacto significativo en la salud humana y animal, al ser transmisoras de un gran número de organismos patógenos como protozoarios (*Babesia spp* y *Anaplasma sp*), bacterias como rickettsias, espiroquetas y virus. Además de afectar potencialmente a la industria ganadera, causando graves pérdidas económicas en la producción (Magnarelli *et al*, 2009). La severidad del problema dependerá de la región geográfica, géneros y especies involucradas como agentes transmisores, población de huéspedes, situación socioeconómica y avance tecnológico en las medidas de control (Ghosh *et al*, 2007).

El impacto económico negativo de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a la ganadería se debe a efectos directos e indirectos. El efecto directo, es el resultado del daño a las pieles por acción de las picaduras, costos de acaricidas y mano de obra para su aplicación, pérdida de sangre y disminución de parámetros productivos y reproductivos (Pereira *et al*, 2009). El efecto indirecto está dado por los agentes etiológicos que transmiten (*Babesia bigemina*, *B. bovis* y *Anaplasma marginale*) (Rodríguez *et al*, 2006). Se han estimado costos globales de entre US \$ 13.9 y US \$ 18.7 billones de dólares al año (Ghosh *et al*, 2007). La FAO estima que en los países desarrollados, el daño ocasionado por las garrapatas fluctúa entre un 10 y 20 % del total de la producción, mientras que en países en vías de desarrollo, las pérdidas pueden ser de entre 30 y 40 % (Gaxiola, 2008). Como puede observarse, las pérdidas son más severas en países subdesarrollados, por la menor cantidad de recursos para la prevención y control (Walker *et al.*, 2003).

En México se estima que las pérdidas producidas en la ganadería bovina por garrapatas y las enfermedades que transmiten son de aproximadamente 48 millones de dólares (USD) anuales (Rodríguez *et al*, 2006)

Por cada garrapata repleta o ingurgitada que infesta a un animal, se reduce la ganancia diaria de peso en 0,6g , del cual, 65 % es atribuido a la inapetencia del bovino producida por la infestación y 35 % a la acción directa de la garrapata (Sutherst, 1989; Treviño, 1987; Valencia, 2004). Treviño (1987) reporta que en infestaciones altas hay una disminución de 0,0045 g/día/garrapata, para infestaciones medias 0,0038 g/ día/garrapatas y para infestaciones bajas 0,0022 g/día/ garrapata. Tapia (2004) señala que las pérdidas de peso vivo son del orden de 0,28 a 0,8 kg por garrapata al año.

Clasificación Taxonómica de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Canestrini, 1888), pertenece al Phylum: *Arthropoda*, clase: *Arachnida*, Subclase: *Acari*, suborden: *Metastigmata*, familia: *Ixodidae* (Krantz, 1978). Anteriormente, era bien conocido que las especies del subgénero *Boophilus* se clasificaban como miembros del género *Boophilus* en su clasificación original, (Walker *et al*, 2003) sin embargo, tanto *B. microplus* como *B. annulatus*, han sido cambiadas el género *Rhipicephalus* por su proximidad filogenética y evolución, por tanto, actualmente en nomenclatura se utiliza el nombre de *Boophilus* como subgénero (Horak *et al*, 2002; Nava *et al*, 2009).

Morfología

Las garrapatas pertenecientes a la familia *Ixodidae* se caracterizan por tener un escudo dorsal (completo en el caso de los machos e incompleto en el caso de las hembras). Todos los estadios evolutivos de esta familia presentan un gnatosoma anterior, con hipostoma dentado, los palpos se presentan a los lados del hipostoma y se componen de 4 segmentos. El gnatosoma presenta áreas porosas en el caso de las hembras (ausentes en los machos). Las placas estigmatales se encuentran posteriores a la coxa IV. El dimorfismo sexual es muy marcado (Mathews, 1992; Walker *et al*, 2003).

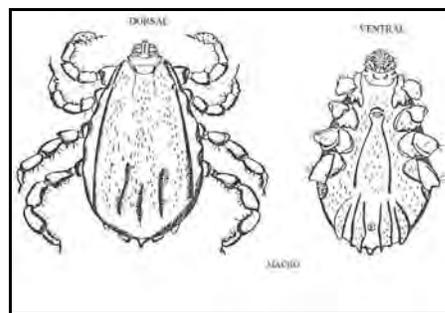
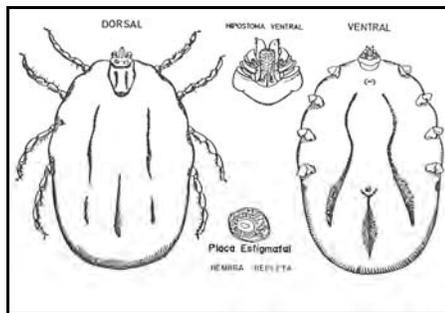


Figura 1: Hembra de *R. (Boophilus) microplus* (SENASICA, 2004) Figura 2: Macho de *R. (Boophilus) microplus* (SENASICA, 2004)

R. (Boophilus) carece de festones u ornamentación. Presentan tiene 4 hileras de dientes en su hipostoma, la base del gnatosoma es hexagonal. Los machos de esta especie tienen una espina caudal (Walker *et al*, 2003).

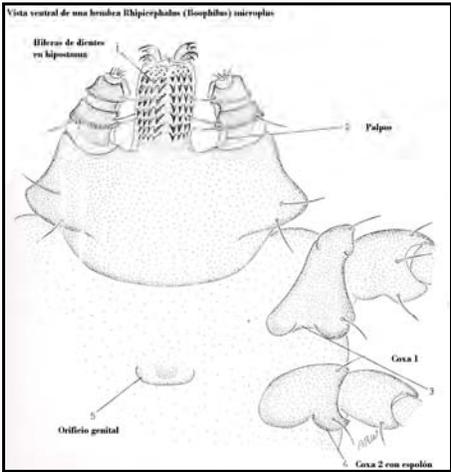


Figura 3: Detalles de vista ventral (Walker *et al*, 2003)

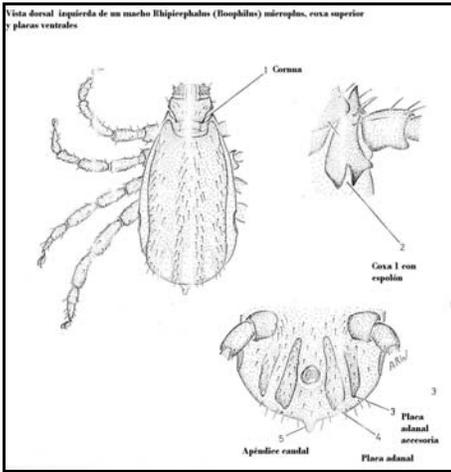


Figura 4: Vista dorsal a detalle de un macho (Walker *et al*,

Ciclo biológico

Tiene 4 estadios evolutivos: huevo, larva, ninfa y adultos macho y hembra. Las garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* son de un hospedero y necesitan cursar 3 fases: No parasítica, de encuentro y parasítica (Rodríguez *et al*, 2006).

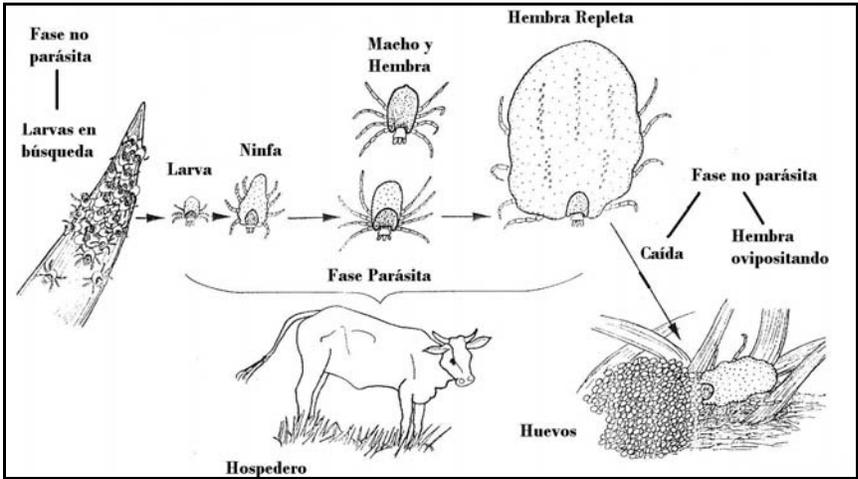


Figura 5: Ciclo biológico de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Walker *et al*, 2003)

Fase No parasítica: También llamada de vida libre y comprende desde que la garrapata repleta se desprende del hospedero hasta la aparición de larvas en la vegetación. Esta fase se divide en 5 etapas:

- a) Preoviposición: Abarca desde el desprendimiento de la garrapata repleta hasta la postura del primer huevo.
- b) Oviposición: Se considera así al tiempo que transcurre desde el inicio de la postura de los primeros huevos hasta los últimos.
- c) Postoviposición: Período desde que la garrapata pone el último huevo hasta su muerte.
- d) Incubación: Período comprendido desde que inicia la oviposición hasta que emergen las larvas.
- e) Eclosión: Dentro de este período las larvas emergen de los huevos.

Fase de Encuentro: Se define como el proceso de transferencia de las larvas desde la vegetación al hospedero.

Fase Parasítica: Período en el que se completa el ciclo biológico, siendo superada la implantación y donde se desarrollan algunos sucesos patológicos sobre el hospedero (Rodríguez *et al*, 2006).

El ciclo se caracteriza por el uso de un solo hospedero, sobre el cual ocurre la fase parasítica (larva, ninfa y adultos). Asimismo, se lleva a cabo la cópula de los adultos, posteriormente, la hembra fecundada se desprende y cae al suelo, iniciando la fase no parasítica y de encuentro. En general, esta etapa del ciclo dura de 19 a 21 días en circunstancias óptimas (Rodríguez *et al*, 2006).

Resumen del ciclo de vida

La hembra deposita	de 2,500 a 3,500 huevos
Período de preoviposición	de 2 a 39 días
Período de oviposición	de 4 a 44 días
Incubación de huevos	de 14 a 146 días
Repleción y muda de la larva	de 7 a 12 días
Repleción y muda de la ninfa	de 5 a 17 días
Repleción de las hembras	de 5 a 23 días
Supervivencia de la larva sin alimento	hasta 240 días

(Rodríguez *et al*, 2006)

Distribución mundial

Originaria del sureste asiático y ampliamente distribuida en zonas tropicales y subtropicales localizadas en Centroamérica, América del Sur, Australia, este y sur de África, al oeste de la India, Micronesia y en el Oriente (Jittapalapong *et al*, 2004).

Distribución en México

Las condiciones climáticas (humedad relativa, temperatura) y ecológicas (vegetación) de México, son determinantes en la distribución geográfica de especies (Delabra *et al.*, 1996). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* presenta un área de distribución que cubre 1,043 722 km², representando el 53 % del territorio nacional y que abarca zonas tropicales, templadas y áridas (Fragoso *et al*, 2001). En los estudios de Woodham (1983) y Olivera (2007), *R. (Boophilus) microplus* fue la garrapata más ampliamente distribuida en México, con presencia en 30 y 21 estados respectivamente. La situación zoonosanitaria al 4 de noviembre de 2009, indica como estados libres de garrapata a Aguascalientes, Baja California, Chihuahua, DF, Durango, Sonora y Tlaxcala (SENASICA, 2009).



(Figura 6: Mapa de la Situación Zoonosanitaria actual en la Campaña Nacional contra la garrapata *Boophilus spp.*, SENASICA, 2010)

Control

El control de las garrapatas consiste en romper su ciclo biológico y puede efectuarse química, biológica y culturalmente. Sin embargo se ha privilegiado al control químico (ixodicidas) sobre cualquier otro debido, entre otras cosas, a la facilidad para aplicarlo, al aumento en la densidad de población en las zonas ganaderas y a la excesiva publicidad alrededor de este método (Andrew *et al*, 2007).

Los ixodicidas químicos para el control de las garrapatas se aplican sobre el cuerpo del hospedero a diferentes intervalos determinados por la región ecológica, especie a la que se va a combatir y eficacia residual del ixodicida (Valencia, 2004). Existen diversas formas de aplicación como los baños de aspersión o inmersión, de aplicación por derrame dorsal o epicutáneo conocidos como “Pour on”, los cuales son ixodicidas concentrados que se aplican sobre el animal y actúan después de dispersarse sobre la superficie del bovino o después de absorberse a través de la piel o por ingestión del artrópodo (George, 2000; Ortíz, 1989). Las diferentes familias de productos que se han utilizado para el control de las garrapatas incluyen los arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas cíclicas, piretroides, ivermectinas, biorreguladores del crecimiento (IGR's) y fenilpirazolonas (Nolán, 1982).

Ixodicidas y mecanismos de acción

Organofosforados: Son compuestos que poseen un átomo de Fósforo en el centro de la molécula, son derivados del ácido fosfórico, cuyos grupos hidroxilos están sustituidos por elementos como flúor, azufre, cloro, grupos aminos y radicales orgánicos. Son lipofílicos, de rápida absorción por la piel y se acumulan en tejido graso, de donde se liberan lentamente al torrente sanguíneo y otros líquidos fisiológicos. Tienen una permanencia de 4 a 8 días. Los compuestos más usados de este grupo son: Clorfenvinfos, Clorpirifos, Coumafos y Diazinon (Tapia, 2004). Penetran rápidamente a través de la cutícula de la garrapata, siendo el tipo de solvente utilizado, uno de los factores que pueden hacer variar la capacidad de penetración y la actividad del principio activo. Su modo de acción está basado en el bloqueo de la enzima acetilcolinesterasa, mediante una fosforilación irreversible, la cual interviene en reacciones de impulsos nerviosos, impidiendo su transmisión normal. Aumenta el neurotransmisor acetilcolina que al ascender a niveles críticos origina una tetanización y finaliza con la muerte (Prado, 2009).

La toxicidad depende diversos factores, tales como: raza, edad, especie, estado nutricional y la administración simultánea de otros fármacos. Su preparación y aplicación conlleva cierto peligro para el manipulador, por lo que es indispensable utilizar medios de protección como mascarilla y guantes (García *et al*, 1999).

Piretroides: Debido a su alta efectividad, baja toxicidad en mamíferos y reducido impacto ambiental, se consideran los plaguicidas de elección en muchas partes del mundo, con mayores probabilidades de éxito a corto plazo sobre todo por su utilidad en el control de garrapatas que han desarrollado resistencia a otras familias de ixodicidas. Los piretroides tienen efecto residual de aproximadamente 15 días. Los fármacos más usados de este grupo son: Cipermetrina, deltametrina y flumetrina (Rodríguez *et al*, 2006)

Las piretrinas naturales son extractos de las flores del crisantemo (*Chrysanthemum cineranaefolium*). Existen seis piretrinas naturales que son ésteres de tres alcoholes ciclopentanolones (piretrolona, cinerolona y jasmolona). Los análogos sintéticos “de primera generación” resultaron inestables a la luz. En la década de 1960 a 1970 se lograron piretroides fotoestables como la permetrina, cipermetrina y fenilvalerato, llamados “de segunda generación”, la deltametrina y flumetrina fueron piretrinas logradas a partir de una sustitución en los componentes de la fórmula. La introducción del fenoxibencil (permetrina) o ciertos alcoholes halogenados (teflutrina) mejoraron la estabilidad química y permitieron el uso de los piretroides en el campo. Estos piretroides son más tóxicos a temperaturas menores, una propiedad única entre los acaricidas. Los piretroides tienen 2 tipos de efecto sobre los parásitos: un efecto inicial rápido de abatimiento o derribo conocido como “kd” (“knockdown”), pérdida de movimiento y un efecto letal subsecuente. Los piretroides son neurotoxinas, producen lesiones similares en las terminales de los nervios motores de una variedad de insectos y pueden actuar tanto en los nervios periféricos como en el sistema nervioso central. Los piretroides que actúan preferentemente en los nervios periféricos se conocen como tipo I, mientras que aquellos con acción central (principalmente los piretroides con el grupo a-ciano) son conocidos como tipo II. A nivel molecular, los piretroides pueden interactuar con los canales de Sodio (Mejía *et al*, 2008; Tapia, 2004). El mecanismo de acción de los piretroides consiste en cambiar la polaridad de la membrana nerviosa a nivel bomba de Na y K actuando a nivel de sistema nervioso central y periférico presentando primero una fase de intensa agitación, seguida de una inmediata parálisis general en el organismo blanco, dando lugar a un efecto de choque conocido como efecto de derribo, siguiéndole un efecto de mortalidad (Rodríguez *et al*, 2006).

Amidinas: Debido a sus propiedades acaricidas se han usado varios compuestos amidinas, el principal compuesto de esta serie era el clordimeformo, pero se ha limitado su uso por su oncogenicidad. El compuesto que aun se usa de este grupo es el amitraz, el cual, además de tener una amplia acción residual, pasa por una conversión metabólica y se convierte en un metabolito activo llamado U-40481 o BTS-27271, es ligeramente soluble al agua, pero soluble en solventes orgánicos. Este compuesto imita la acción del neurotransmisor octopamina, el cual regula el comportamiento de excitación dentro del SNC y también tiene acciones sobre los tejidos periféricos. La

octopamina se liga a un receptor que eleva los niveles del segundo mensajero, el monofosfato de adenosina cíclico (MFA). Entonces el MFA cíclico inicia procesos que originan excitación de las neuronas (Tapia, 2004). Su modo de acción es la interferencia de los procesos metabólicos de las garrapatas y se caracteriza por inhibición del sistema enzimático monoamino oxidasa. La inhibición de ésta provoca un estímulo debido a la separación del aparato bucal del animal parasitado, se presenta una rápida parálisis de la musculatura, una incapacidad para digerir proteínas sanguíneas y un bloqueo en el desarrollo de los ovarios que causa la muerte (Rodríguez *et al*, 2006; Soberanes *et al*, 2002).

Macrolidos o Lactonas macrocíclicas: Las avermectinas (avermectina, ivermectina, doramectina y eprinomectina) y las milbemicinas (moxidectina), son derivadas del actinomiceto *Streptomyces avermitilis* y de derivados de la fermentación de *S. higroscopicus aureolacrimosus*, respectivamente (García *et al*, 1999; Prado, 2009) Su acción ha sido determinada a nivel de ácido gama amino butírico (GABA), que es un neurotransmisor inhibitorio de los estímulos nerviosos en la placa neuromuscular. Esta inhibición provoca parálisis e incluso la muerte del parásito y puede afectar la producción de huevos (Rodríguez *et al*, 2006).

Inhibidores del desarrollo: La sustancia más usada es el fluazurón. Interfieren específicamente con el sistema biosintético de la formación de quitina en garrapatas, que es requerida durante la alimentación, muda y embriogénesis (Neri *et al*, 2001). La limitante de este producto es que no mata instantáneamente a las garrapatas, sino que reducen su capacidad reproductiva (Rodríguez *et al*, 2006). Es persistente por aproximadamente doce semanas, sus residuos se almacenan en grasa (Prado, 2009).

Fenilpirazolonas: Están relacionadas con las avermectinas por el modo de acción (Rodríguez *et al*, 2006). Actúa a nivel de sistema nerviosos central del parásito, interrumpiendo el paso de iones cloro a través del sistema receptor GABA (ácido gama amino butírico), cuando se bloquean los canales del sistema GABA, el resultado es la excitación nerviosa y muerte del parásito (Neri *et al*, 2001). El fipronil es la sustancia más usada en presentación de “pour on” (Rodríguez *et al*, 2006).

Los ixodicidas químicos han jugado un rol importante en el control de las garrapatas. Sin embargo, entre sus desventajas se encuentran la contaminación del medio ambiente y alimentos y, como consecuencia del uso extensivo e indiscriminado de los acaricidas, *R. (Boophilus) microplus* ha desarrollado resistencia a la mayoría de los acaricidas en muchos países, lo que lo vuelve ineficaz este tipo de control, haciendo difícil el manejo de las poblaciones de garrapatas. En la mayoría de los casos, estos productos propiciaron alteraciones en las garrapatas que conducen a través del fenómeno de selección genética a una adaptación que les permite sobrevivir bajo las

nuevas condiciones artificiales impuestas (Bittencourt, 2000; Camillo *et al.*, 2009; Rodríguez *et al.*, 2007).

Resistencia hacia los ixodicidas

La resistencia se define como la capacidad adquirida por individuos de una población parásita que les permite sobrevivir a dosis de químicos que generalmente son letales para una población normal (Alonso *et al.*, 2006; Rodríguez *et al.*, 2007)

Alternativas de control

La problemática de la resistencia a los ixodicidas ha generado la búsqueda de métodos alternativos de control (Rosado *et al.*, 2009). Se han realizado estudios sobre diversas alternativas, algunas de las cuales parecen ofrecer perspectivas a futuro, entre ellas, el uso de extractos vegetales. Para su uso se requiere de múltiples estudios que demuestren su aplicación práctica y efectividad biológica (Fragoso *et al.*, 2001). Los ingredientes provenientes de la plantas y sus extractos son conocidos por sus propiedades acaricidas, (repelente, inhibición del crecimiento y evitar la muda de estadio) (Rosado *et al.*, 2009). Se encuentran disponibles reportes donde se muestran las evaluaciones de las propiedades de algunos extractos herbales contra diferentes estadios de vida de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* con resultados altamente alentadores (Ghosh *et al.*, 2007; Thakur *et al.*, 2007). El extracto de *Hypericum polyanthemum* ha resultado ser altamente tóxico contra las larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en ensayos *in vitro* (Sardá-Ribero *et al.*, 2007), así como los extractos de *Calea serrata* que tuvieron efecto sobre la oviposición y eclosión de sus huevos (Sardá-Ribero *et al.*, 2008), aunque su potencial como ixodicida en campo aun no ha sido determinado.

Otro estudio en Brasil (Duarte *et al.*, 2008) reporta que 6 análogos de *Hyacinthanine spp* (Hiacintáceas= Jacinto entre otras) tuvieron efecto en la mortalidad de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, así como inhibición en la oviposición.

En un estudio *in vitro* en Irán (Pirali *et al.*, 2009), los resultados obtenidos con aceites esenciales de plantas (*Pelargonium roseum* = Geranio; *Eucalyptus globulus* = Eucalipto), muestran que ambas pueden ser candidatas potenciales para el control biológico de *Rhipicephalus (Boophilus)* en campo.

En India (Zahir *et al.*, 2009), los estudios con extractos de etil acetato de *Achyranthes aspera* (Malpica), metanol de *Gloriosa superba* (Gloriosa) y metanol de *Ricinus communis* (Ricino), tuvieron alta mortalidad contra las larvas de *R. (Boophilus) microplus*, asimismo, se sugiere que además tienen el potencial para ser usadas como una alternativa benévola con el ambiente.

Otro estudio en India (Rahul *et al*, 2008) en donde utilizaron extractos de hojas, corteza y semillas de *Azadirachta indica* (“Neem” o nim) para evaluar su efecto contra garrapatas *R. (Boophilus) microplus*, mostró que los extractos de las semillas de *A. indica* tuvieron una alta eficacia (80%) después de 5 horas del tratamiento. Además de este efecto, se observó una reducción en la oviposición.

En México también se han usado extractos de hojas de plantas como alternativa de control de la garrapata *R. (Boophilus) microplus*, teniendo resultados variables que van del 9 al 96%, siendo *Petiveria alliacea* (Anamú) y *Havardia albicans* (Chukum), las que produjeron mortalidad larvaria superior al 90% en concentraciones del 10 % y bajo condiciones *in vitro* (Rosado *et al*, 2010).

La caracterización del principio activo en los componentes de los extractos herbales probados tiene un gran alcance para la comercialización y tiene potencial para formar parte de un manejo integral de plagas por su efecto sostenido (Ghosh *et al*, 2007).

Características del Ixodicida experimental

Tlalaxin 13 Concentrado emulsionable

Permetrina 16 %

Ácidos grasos provenientes de extractos herbales 33 %

Las propiedades de este ixodicida son los componentes adicionales de los extractos herbales.

Plaga: Garrapata

Indicaciones de uso según el método de aplicación

Aspersión Túnel, manga	20 ml por cada 10 litros/agua 700 ml por cada 100 litros/agua	Aplicar: 4 o 6 litros por cada bovino adulto
Baño de inmersión o aspersión con depósito	2 litros por cada 1000 litros de agua	4 o 6 litros por cada bovino adulto por aspersión
Carga inicial del baño	2 litros por cada 1000 litros de agua	Agitación a lo largo de la tina de baño, utilizando una premezcla previa en un recipiente de 20 litros.
Recarga de baño (reajuste de nivel)	2 litros por cada 1000 litros de agua	Agitación adecuada del baño

Incompatibilidad: Es incompatible con acaricidas, garrapaticidas e insecticidas organoclorados u organofosforados, con materiales alcalinos, cal o cualquier materia con pH mayor a 7.5

Recomendaciones: Para que el producto se conserve para el siguiente tratamiento se requiere tapar el baño con una lona o láminas posteriormente a su uso, así como retirar toda la materia orgánica (pelo, hojas, etc), de la superficie del baño.

Permetrina 3- (Fenoxfenil) metil (4) cistransdicloroetenil- 2- 2- dimetil

Ciclopropano carboxilato (equivalente a 168 grs de I.A./ litro 16 %)

Extractos vegetales 33 %

Solventes y componentes relacionados 51 %

Total 100 %

Según el fabricante, la permetrina actúa a nivel del Sistema Nervioso, ocasionando paro respiratorio, mientras que el extracto herbal actúa por medio de ácidos grasos quemando el sistema digestivo de los ácaros.

Al mezclarse los ácidos grasos con la permetrina se logra una sinergia importante generando los siguientes resultados:

*Derribo total de garrapatas

*Efecto repelente

*Bajo nivel de toxicidad, no peligroso en las dosis recomendables para fauna y humanos

*Acción residual no contaminante

*Acción prolongada en baños.

II. JUSTIFICACIÓN

A pesar de los avances científicos, el control de las garrapatas sigue llevándose a cabo con acaricidas químicos hasta la actualidad y cuando estos son usados indiscriminadamente, generan contaminación ambiental, así como la generación de resistencia de las garrapatas hacia los ixodicidas. La resistencia se ha convertido en un gran obstáculo para los esfuerzos de control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten al ganado, por lo que es de importancia el desarrollo de estrategias y tecnología para su manejo. Se han realizado estudios sobre diversas alternativas, algunas de las cuales parecen ofrecer perspectivas a futuro, entre ellas, el uso de extractos herbales, los cuales son conocidos por sus propiedades acaricidas (repelente, inhibición del crecimiento, impidiendo la muda) contra los diferentes estadios de vida de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Para su uso se requiere de múltiples estudios que demuestren su aplicación práctica y efectividad biológica. Por ello, se propone la utilización de un producto experimental (Tlalaxin 13), elaborado a base de un piretroide (Permetrina) y además contiene extractos vegetales para evaluar su uso potencial como ixodicida.

III.OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la eficacia terapéutica y toxicidad de un ixodicida experimental (Tlalaxin 13), desafiando garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos infestados de forma artificial y mediante una prueba de laboratorio.

Objetivos Específicos

- 1.- Determinar la efectividad del ixodicida experimental en bovinos infestados artificialmente con garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* mediante tratamiento de baño de aspersion.
- 2.- Determinar los parámetros reproductivos de las garrapatas colectadas postratamiento de los grupos Testigo y Tratado en prueba de establo.
- 3.- Determinar el porcentaje de mortalidad de las larvas postratamiento con Tlalaxin 13, utilizando la técnica de inmersión de larvas de Shaw.

Cepa

Para la realización de este experimento se utilizó la cepa “Susceptible” de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, la cual fue donada por el Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA-SENASICA-SAGARPA). Para la obtención de la cepa se llevaron a cabo infestaciones con larvas de 15 a 35 días de edad en bovinos de raza *Aberdeen angus* confinados en establo. A los 21 días posteriores a la infestación se colectaron las hembras adultas (mayores a 8 mm de tamaño), los especímenes se limpiaron y depositaron en cajas Petri para su oviposición, así mismo se identificaron y se enviaron al laboratorio de Parasitología de la FMVZ-UNAM, donde se incubaron a 28°C y a 80% de Humedad Relativa. A los 15 días posteriores a la colecta, se retiró la masa de huevos, se pesan y se colocan en viales de vidrio (1 g de huevos por vial), los cuales se mantuvieron en las condiciones de temperatura y humedad descritas anteriormente hasta la obtención de larvas de 7 a 14 días, las cuales fueron destinadas para la Prueba de Shaw y para la infestación de los bovinos en la prueba de establo.



(Figura 8 : Hembra repleta de *R. (Boophilus) microplus*, cepa “Susceptible”)

Prueba de establo

Bovinos

Se utilizaron 12 bovinos (cruza de raza de *Bos taurus*) con un peso promedio de 310 kg, procedentes del estado de Zacatecas. Los bovinos fueron mantenidos en corrales; su alimentación consistió en avena y alfalfa como forraje, así como concentrado, los cuales eran ofrecidos 2 veces al día (7:00 am y 14:00 pm). El agua se ofreció *at libitum*.



Figura 9: Grupo de bovinos utilizados en la prueba

Infestaciones

Se realizaron 3 infestaciones consecutivas, aplicando 1 gramo de huevos (aproximadamente 20,000 larvas) por día por bovino sobre la región dorsal de los animales. Se observaron diariamente hasta la aparición de hembras adultas repletas.



Figura 10: Infestación

Conteos

Una vez detectadas las garrapatas adultas, se realizó un conteo pretratamiento para determinar el número de hembras repletas, los bovinos fueron separados en 2 grupos: Testigo y tratado. Se realizaron 5 conteos posteriores al tratamiento en ambos grupos, éstos conteos se efectuaban por la mañana (8:00 am).



Figura 11: Bovino infestado con *R. (Boophilus) microplus*

Tratamiento

Al grupo Tratado se le aplicó el producto experimental Tlalaxin 13 mediante baño de aspersión (6 litros/bovino) a la Concentración Comercial Recomendada (CCR) por el fabricante.



Figura 12: Aplicación de tratamiento ixodicida

Colecta

Para la determinación de los parámetros reproductivos *in vitro*, se colectaron 40 garrapatas repletas del grupo Testigo y 40 del grupo tratado del día 1 postratamiento para evaluar los parámetros de oviposición y eclosión. Las garrapatas fueron pesadas e incubadas hasta su oviposición, una vez obtenida esta, se le tomó peso y se incubó hasta la obtención de larvas de 14 días. Con los datos obtenidos de peso de oviposición y peso de hembras repletas, mediante el uso de fórmulas se obtuvo el porcentaje de oviposición y el porcentaje de inhibición de oviposición. Se sacrificaron las larvas por medio de desecación en una estufa a 45°C durante 3 días, transcurrido este tiempo se mezcló cuidadosamente el contenido de los viales y se realizaron 5 lecturas por vial para obtener el porcentaje de eclosión.



Figura 13 : Garrapatas colectadas.



Figura 14: Hembra ovipositando.

Prueba de Laboratorio

Inmersión de larvas

Se utilizó la técnica de Shaw con la finalidad de obtener el porcentaje de mortalidad de las larvas sometidas a inmersión con el producto experimental Tlalaxin 13, usando la CCR se prepararon 250 ml de solución (0.5 ml Tlalaxin y aforando con agua). En cajas Petri con una hoja de papel filtro se colocaron aproximadamente 100 larvas, se colocó otra hoja de papel filtro sobre las larvas y se impregnaron con 10 ml de la solución preparada durante 10 minutos, posteriormente, con ayuda de un pincel se tomaron las larvas y se depositaron en paquetes de papel filtro y se incubaron a 27°C y a 80% de humedad relativa. Pasadas 72 horas se procedió a realizar la lectura de resultados. El grupo Testigo pasa por el mismo procedimiento pero solo se trató con agua. Se realizaron 3 ensayos del grupo tratado con 3 replicas cada una. Se usó un grupo Testigo común con 3 repeticiones.

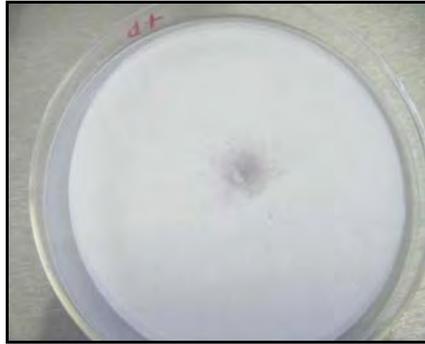


Figura 15: Inmersión de larvas *R. (Boophilus) microplus*, cepa "Susceptible", por Técnica de Shaw

Diseño experimental

Se trabajó con el producto experimental Tlalaxin 13 (Laboratorios Shark S.A. de C.V.) a las dosis recomendadas por el fabricante.



(Figura 16: Producto Experimental Tlalaxin 13)

Conducción del estudio

Evaluación *in vitro* de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Se realizó la técnica de inmersión de larvas de Shaw en el laboratorio de Parasitología de la FMVZ-UNAM para obtener el porcentaje de mortalidad larvaria. Para el grupo Testigo se uso solo agua, mientras que para el grupo tratado se utilizó el producto experimental Tlalaxin 13 a la dosis comercial recomendada. Los resultados se obtuvieron a las 72 horas postratamiento.

Prueba de Establo

Porcentaje de efectividad sobre la repleción

Para corroborar la efectividad del producto se llevó a cabo una prueba de establo, en la cual se realizaron 3 infestaciones consecutivas, aplicando 1 g de huevos (20,000 larvas) por día por bovino en el lomo de los animales, se observaron diariamente hasta la aparición de hembras adultas repletas, una vez detectadas estas, se realizó un conteo y los bovinos fueron separados en 2 grupos: Testigo y tratado. Al grupo tratado se le aplicó el producto experimental Tlalaxin 13 mediante baño de aspersión (6 litros/bovino), se alojaron en corrales separados. Se realizaron conteos en ambos grupos en los siguientes 5 días postratamiento, éstos conteos eran realizados por la mañana (8:00 am). Se compararon el número de garrapatas del grupo Testigo y tratado (observando el derribo de garrapatas) para determinar el porcentaje de efectividad.

Evaluación de los parámetros reproductivos

Para la determinación de los parámetros reproductivos *in vitro*, se recolectaron 40 garrapatas del grupo Testigo y 40 del grupo tratado del día 1 postratamiento para evaluar los parámetros de oviposición y eclosión. Las garrapatas fueron pesadas e incubadas hasta su oviposición, una vez obtenida esta, se le tomó peso y se incubó hasta la obtención de larvas de 14 días. Con los datos obtenidos de peso de oviposición y peso de hembras repletas, mediante el uso de fórmulas se obtuvo el porcentaje de oviposición y el porcentaje de inhibición de oviposición. Se sacrificaron las larvas por medio de desecación en una estufa a 45°C durante 3 días, transcurrido este tiempo se mezcló cuidadosamente el contenido de los viales y se realizaron 5 lecturas por vial para obtener el porcentaje de eclosión.



Figura 17: Huevos, cascarones y larvas desecadas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La información obtenida fue sometida a un Análisis de T de Student para conocer si había diferencias entre ambos grupos, usando los datos del Porcentaje de Efectividad sobre la Repleción.

EVALUACIÓN DE RESULTADOS

Para el cálculo del Porcentaje de Efectividad, se tomó en cuenta el número de garrapatas colectadas diariamente durante los períodos pre y postratamiento en los grupos Testigo y Tratado

$$\% E = 1 - \frac{(A) (D)}{(B) (C)} (100)$$

Donde:

A: Número promedio de garrapatas del lote Testigo antes del tratamiento.

B: Número promedio de garrapatas del lote Testigo por día de conteo posterior al tratamiento

C: Número promedio de garrapatas del lote Tratado antes del tratamiento.

D: Número promedio de garrapatas del lote Tratado por día de conteo posterior al tratamiento.

Para calcular el Porcentaje de inhibición de oviposición de cada grupo, se obtiene primero el porcentaje de oviposición (PO). Una vez obtenido el PO se calcula el porcentaje de inhibición de oviposición mediante las siguientes fórmulas:

$$PO = \frac{\text{peso de los huevos (g)}}{\text{peso de las hembras (g)}}$$

$$\% \text{ de Inhibición de oviposición} = \frac{PO \text{ grupo control} - PO \text{ grupo tratado}}{PO \text{ grupo control}} \times 100$$

Para la obtención del porcentaje de eclosión, se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de eclosión} = \frac{C}{C+H} \times 100$$

Donde:

C = Cascarones

H = Huevos

VI. RESULTADOS

Evaluación *in vitro* (Técnica de Shaw)

En el cuadro 1 se muestra que a la concentración comercial recomendada de Tlalaxin 13, se obtuvo mortalidad total de las larvas sometidas a la técnica de Shaw a los 3 días postratamiento en las 3 repeticiones del experimento, que corresponde al 100% de efectividad.

Evaluación en Prueba de estable

En el cuadro 2 y 3 se expone el número de garrapatas repletas contabilizadas por día, así como la sumatoria y la media de los grupos Testigo y tratado respectivamente.

Se observa en el cuadro 4 el número promedio de las garrapatas contabilizadas en los grupos Testigo y tratado, así como la efectividad en el derribo de garrapatas adultas. Se observó que en el primer día postratamiento, el grupo Testigo presentaba un promedio de 100 garrapatas adultas mientras que el grupo tratado presentaba un promedio de 43 garrapatas adultas, lo que corresponde a un 46.86% de efectividad. En general, el grupo tratado mostró un número menor de garrapatas comparado con el grupo Testigo, el número máximo de garrapatas en el grupo Testigo fue de 100, mientras que el número mínimo fue de 19.66 con un promedio de 59.83 garrapatas y en el grupo tratado el número máximo de garrapatas fue de 43 y el número mínimo fue 13.83 con un promedio de 28.41 garrapatas.

El cuadro 5 muestra los datos necesarios para el análisis estadístico T de Student: Promedio, Varianza y desviación estándar.

Medición de los parámetros reproductivos

Los datos obtenidos de estos parámetros se encuentran disponibles en el cuadro 6.

Con la finalidad de dar seguimiento a los parámetros reproductivos *in vitro* y en virtud de la presencia de un número elevado de garrapatas adultas por bovino en el grupo tratado, se llevó a cabo una colecta el día 1 postratamiento de 40 garrapatas del grupo Testigo y 40 garrapatas del grupo tratado.

Con relación al peso de las hembras, se encontró que las del grupo Testigo tuvieron un peso mayor respecto a las del grupo tratado (13.0615 y 11.8129 respectivamente).

En cuanto al peso de la oviposición se encontraron diferencias, siendo mayor el peso de los huevos de las garrapatas del grupo Testigo (5.6455).

El porcentaje de oviposición del grupo Testigo fue de 43.22 %, mientras que el porcentaje de oviposición del grupo tratado fue de 24.96 %.

En cuanto al porcentaje de eclosión se encontró un 72.97 % en el grupo Testigo, mientras que en el grupo tratado se obtuvo un 59.99%.

De manera general se puede observar que los parámetros evaluados del grupo tratado variaron considerablemente con respecto al grupo Testigo.

Cuadro 1: Porcentaje de mortalidad *in vitro* de larvas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* sometidas a la técnica de diagnóstico de resistencia de Shaw (modificada usando Tlalaxin 13)

Grupo	Formulación	Dosis	Tiempo de inmersión	Porcentaje de mortalidad
Testigo 1	250 ml agua	10 ml	10 minutos	0
Testigo 2	250 ml agua	10 ml	10 minutos	0
Testigo 3	250 ml agua	10 ml	10 minutos	0
Tratado A	0.5 ml Tlalaxin 13 /250 ml agua	10 ml	10 minutos	100
Tratado B	0.5 ml Tlalaxin 13 /250 ml agua	10 ml	10 minutos	100
Tratado C	0.5 ml Tlalaxin 13 /250 ml agua	10 ml	10 minutos	100

Cuadro 2: Número de garrapatas hembras repletas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cepa “Susceptible” colectadas por día (con sumatoria y media) en bovinos infestados artificialmente en el grupo Testigo

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Bovino 1	159	105	69	43	28	18
Bovino 2	173	164	114	40	29	30
Bovino 3	56	89	114	61	26	19
Bovino 4	31	55	67	32	10	21
Bovino 5	10	59	65	38	14	17
Bovino 6	45	129	84	47	16	15
sumatoria	474	601	513	261	123	120
media	79	100.17	85.5	43.5	20.5	20

Cuadro 3 : Número de garrapatas hembras repletas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cepa “Susceptible” colectadas por día (con sumatoria y media) en bovinos infestados artificialmente en el grupo tratado con Tlalaxin 13 aplicado por aspersión a la Concentración Comercial Recomendada (CCR)

	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
Bovino 1	70	98	73	70	54	33
Bovino 2	67	47	23	5	14	10
Bovino 3	27	11	9	11	2	12
Bovino 4	35	38	36	13	14	6
Bovino 5	83	52	20	27	23	4
Bovino 6	43	18	26	26	7	18
sumatoria	325	264	187	152	114	83
media	54.17	44.00	31.17	25.33	19.00	13.83

Cuadro 4: Número promedio de garrapatas contabilizadas en los grupos Testigo y tratado con Tlalaxin 13 y porcentaje de efectividad sobre la repleción (Prueba de establo).

Día	Promedio de garrapatas del grupo Testigo	Promedio de garrapatas del grupo Tratado	Porcentaje de efectividad sobre la repleción
Pretratamiento	79.00	54.17	
Postratamiento			
Día 1	100.17	43.83	36.19
Día 2	85.5	31.16	46.86
Día 3	43.5	25.33	15.08
Día 4	20.5	19	0
Día 5	19.66	13.83	0

Cuadro 5: Promedio, varianza y desviación estandar obtenidos de los grupos Testigo y tratado en la Prueba de Establo.

Datos	Grupo Testigo	Grupo Tratado
Promedio	58.11	31.22
Varianza S ⁽³⁾	1207,14	234,39
Desviación estandar	34,74	15,31

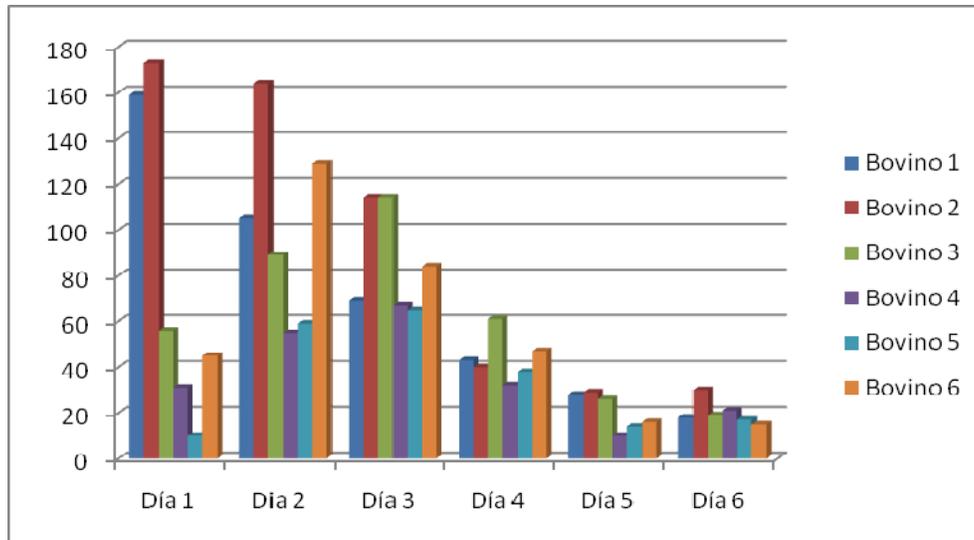
Cuadro 6: Comparación de diversos Parámetros biológicos obtenidos de las garrapatas colectadas de los grupos Testigo y tratado con Tlalaxin 13 mediante una Prueba de establo.

Grupo	No. de hembras	Peso de hembras (g)	Peso huevos (g)	Porcentaje de oviposición	% de inhibición de oviposición	% de eclosión
Testigo	40	13.0615	5.6455	43.22	-----	72.97
Tratado	40	11.8129	2.9485	24.96	42.25	59.99

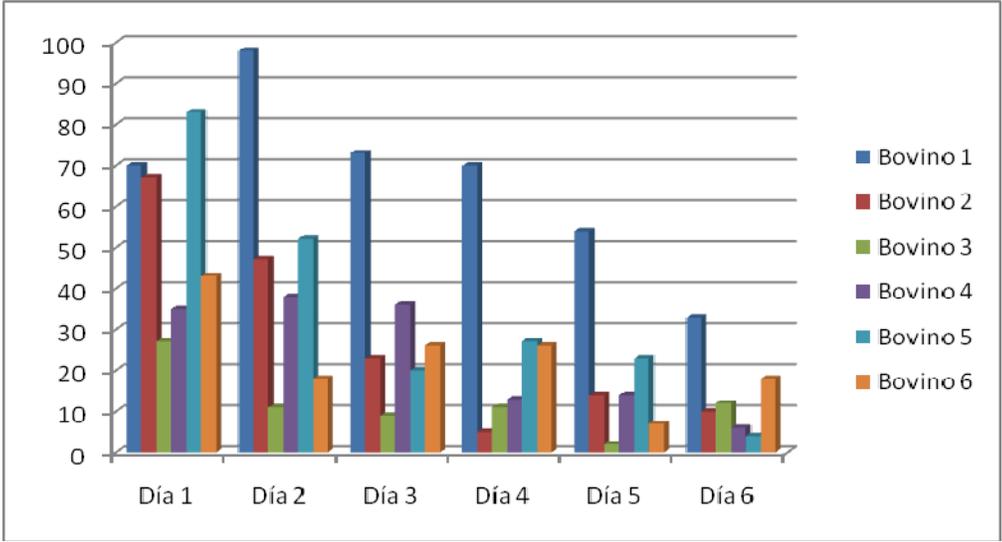
Análisis estadístico

Se demostró que existen diferencias significativas entre ambos grupos con un nivel de significancia $P < 0.05$ según el análisis t de Student, aplicado a los datos de Porcentaje de Efectividad sobre la Repleción (Cuadro 4) .

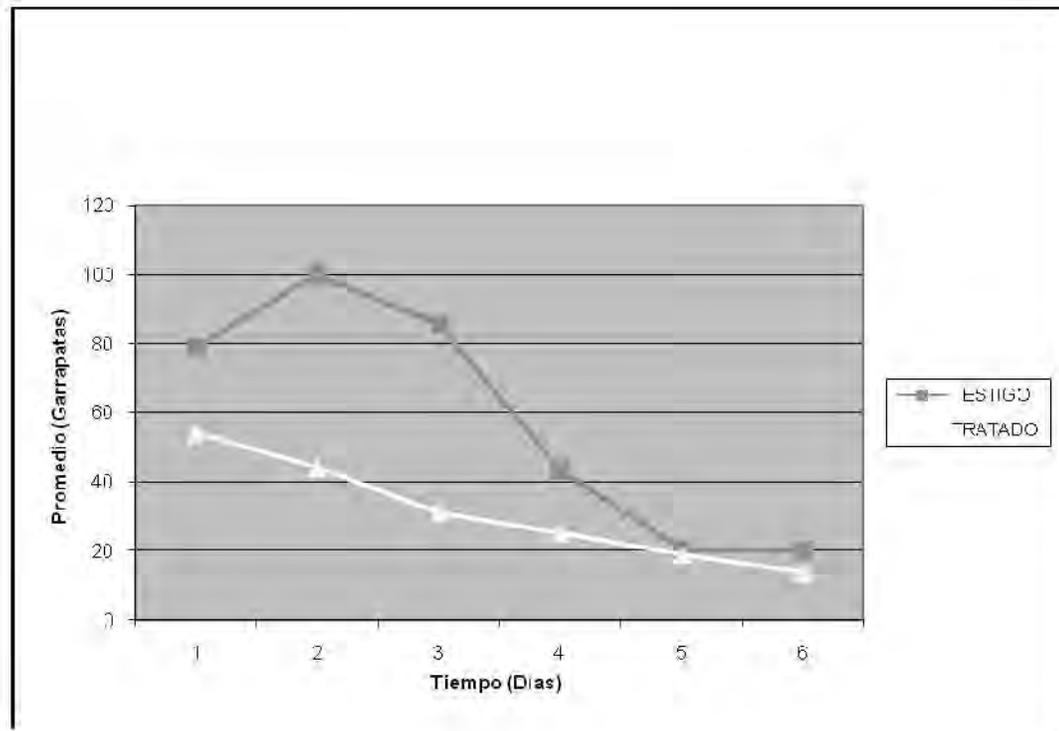
Gráfica 1: Número de garrapatas hembras repletas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cepa “Susceptible” colectadas por día en bovinos infestados artificialmente en el grupo Testigo



Gráfica 2: Número de garrapatas hembras repletas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cepa “Susceptible” colectadas por día en bovinos infestados artificialmente en el grupo tratado con Tlalaxin 13 aplicado por aspersión a la Concentración Comercial Recomendada (CCR).



Gráfica 3: Comparación de los promedios de garrapatas repletas en los grupos Testigo y tratado con Tlalaxin 13.



VII. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos *in vitro* utilizando la técnica de Shaw, fueron satisfactorios, ya que se obtuvo una mortalidad larvaria del 100% en todas las repeticiones del grupo tratado.

En un estudio *in vitro* realizado por Rosado *et al* (2010), utilizando extractos metanólicos de hojas de *Petiveria alliacea* y *Havardia albicans* al 10%, contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, obtuvieron una mortalidad superior al 90%.

Pirali *et al* (2009), evaluaron la efectividad de los extractos de *P. roseaum* (Geranio) y de *E. globulus* (Eucalipto). Utilizando concentraciones de .31 a 5 % de extracto de *P. roseaum* contra hembras repletas de *R. (Boophilus) annulatus* encontraron una eficacia de 79.2 a 98.3 % en los días 1 y 6 postratamiento. Al analizar el efecto sobre la oviposición encontraron que en las garrapatas tratadas con *P. roseaum* tuvieron oviposiciones que iban de 0.02-0.41 g, mientras que con el extracto de *E. globulus* se obtuvieron mortalidades de 16.7 a 37.5 en los días 1 y 6 postratamiento respectivamente y se reportan oviposiciones de 0.33 a 0.44 g.

Por otro lado, Rahul *et al*, (2008) mencionan que al evaluar extractos de semilla de *A. indica* (nim o neem), tuvieron un 80% de efectividad contra hembras adultas de *R. (Boophilus) microplus* a las 5 horas postratamiento. Los autores también señalan que que la oviposición se vio significativamente afectada.

En el experimento de Álvarez *et al* (2008), utilizaron un producto comercial a base de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), se obtuvo 100% de mortalidad en hembras adultas usando la concentración pura, sin embargo, la actividad disminuyó casi en su totalidad (2.18%) cuando el producto fue evaluado en una dilución 1:1 en agua. Asimismo, mostró una efectividad de 14.40% en la reducción de la oviposición.

Otros estudios realizados por Bravo *et al*, en el 2008, en donde se evaluó la eficacia de piretroides sintéticos en preparación comercial, mostraron porcentajes entre el 14.3 al 43.23 %, señalando que las cepas usadas en este experimento eran de campo.

Con relación a nuestro estudio realizado en Querétaro, es importante aclarar que no se realizaron la 9 infestaciones artificiales con larvas “susceptibles”, que señala la Norma Oficial Mexicana NOM 006 ZOO 1993, ya que de acuerdo al SENASICA

(2009), este Estado se encuentra en estatus de Control. Tampoco se esperó a que las garrapatas cumplieran los 25 días postratamiento para la caída de teologinas ya que se corría el riesgo de realizar la diseminación de la cepa. Sin embargo, el tiempo de observación utilizado fue suficiente para obtener la información de efectividad requerida ya que como es sabido los piretroides y en este caso particular la cipermetrina derriban a las garrapatas en los primeros días postratamiento.

Los resultados obtenidos no mostraron la mortalidad esperada, la Norma específica que la efectividad promedio sobre el Potencial Reproductivo de las garrapatas debe ser de 98 % (Fragoso *et al*, 2001). Este porcentaje, basado en las experiencias obtenidas en los laboratorios del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CENAPA), garantiza que la descendencia no sobrevivirá y el control será mayor al reducir de manera drástica la población (NOM-006-ZOO-1993). No hubo eliminación total de hembras repletas en los bovinos del grupo tratado.

Es importante señalar que los resultados de laboratorio mostraron un peso menor de las hembras repletas Tratadas, en comparación de las del grupo Testigo.

El Porcentaje de oviposición del grupo Tratado fue de 24.96, mientras que el del grupo Testigo fue de 43.22. El porcentaje de inhibición de oviposición del grupo Tratado fue de 42.25%.

Con relación a los porcentajes de eclosión del grupo Tratado es de 59.99 % mientras que para el grupo Testigo, la media es de 72.97%.

Basu *et al* (2008) mencionan que el número de huevos producidos es directamente proporcional a la cantidad de peso o tamaño de las garrapatas hembras.

Entre las causas por las cuales no se alcanzó una mortalidad alta, se puede considerar a la forma de aplicación del producto experimental, ya que suele ser menos eficiente que la inmersión porque la aplicación y distribución del ixodicida puede ser diferente en las regiones corporales (Drummond *et al*, 1976; Prado, 2009).

En los diversos estudios en los que se usaron extractos herbales (Pirali *et al*, 2009; Rosado *et al*, 2009; Sardá-Ribero *et al.*, 2007; Zahir *et al*, 2009) mencionan buenos resultados en condiciones *in vitro*. Otros autores (FAO, 2003; Ghosh *et al*, 2007; Phonsena *et al*, 2006; Thakur *et al*, 2007) mencionan que los resultados obtenidos con extractos herbales son prometedores. Sin embargo, García *et al* (1999) y Parrodi (2005)

mencionan que los resultados obtenidos con este tipo de control son poco satisfactorios y algunos siguen sujetos a investigación, por lo que su uso en campo es limitado.

Fragoso *et al* (2001), indican que son necesarios múltiples estudios que demuestren su aplicación práctica y utilidad biológica

Soffer (1981), menciona que el agua puede tener algún efecto sobre el ixodicida aplicado, ya que encontraron una inhibición de la oviposición y la eclosión en adultas susceptibles usando coumafos y posteriormente lavando las muestras de 0 a 1 minuto posteriores al tratamiento. Sin embargo, cuando el lavado se hacía de 5 minutos a 8 horas postratamiento, no se veían afectados ni el porcentaje de Oviposición ni el de Eclosión.

Habría sido también interesante evaluar el efecto sinérgico, potenciador o de acción aditiva que producen los extractos de plantas adicionados a la permetrina. Sin embargo por razón de costos no fue posible incluir un grupo tratado solamente con extractos y otro solamente tratado con permetrina. Seguramente estudios futuros mostrarán las bondades de esta combinación como una más de las estrategias a obtener un mejor control de la garrapata *Boophilus spp.*

VIII. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos y a lo establecido por la NOM-006-ZOO-1993 sobre Requisitos de efectividad biológica para los ixodicidas de uso en bovinos y métodos de prueba, el producto experimental Tlalaxin 13 sometido a evaluación bajo las condiciones en que se llevó a cabo el estudio, no alcanza el porcentaje requerido en la Prueba de establo que es del 98%. Mientras que en la prueba *in vitro* (Técnica de Shaw), el porcentaje de efectividad obtenido fue del 100%, este porcentaje obtenido es esperado ya que se trabaja con una población de garrapatas susceptibles a los ixodicidas, además dentro del ciclo parasítico la fase larvaria es la más susceptible a los garrapaticidas.

No obstante, es necesario realizar múltiples estudios que demuestren su actividad biológica como ixodicida, dado que el producto experimental Tlalaxin fue evaluado bajo condiciones que no se apegaban en su totalidad a la Norma 006.

Es necesario profundizar aún más estos resultados preliminares para poder conocer el efecto real *in vivo* sobre las poblaciones de garrapatas a nivel campo y laboratorio.

Hay que tomar en cuenta aspectos ambientales, como el efecto a poblaciones no blanco y todo lo relacionado con residuos en productos de origen animal que se destinan para consumo humano.

IX. LITERATURA CITADA

- Alonso, D.M.A., Rodríguez, V.R.I., Fragoso, S.H., Rosario, C.R.; 2006. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodícidias. Arch Med Vet 38, (2): 105-113
- Álvarez, V., Loaiza, J., Bonilla, R., Barrios, M., 2008. Control *in vitro* de garrapatas (*Boophilus microplus*; Acari: Ixodidae) mediante extractos vegetales. Rev Biol Trop 56 (1): 291-302
- Andrew Y.L., Andrew, C.C., Robert J.M., Ronald, B.D, John, E.G.; 2007. Acaricide resistance and synergism between permethrin and amitraz against susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). Pest Manag Sci 63:882-889
- Basu, A.K., Haldar, D.P., 2008. Biology of *Boophilus microplus* (Canestini, 1887). Journal of Natural History (2008) 4 (2) 30-34
- Bittencourt, V.R.E.P., 2000, Trials to Control South American Ticks with Entomopathogenic Fungi. Ann N Y Acad Sci 916: 555-558
- Camillo, G., Vogel, F.F., Sangioni, L.A., Cadres, G.C., Ferrari, R., 2009. *In vitro* evaluation of acaricide efficacy against bovine ticks in Rio Grande do Sul State, Brazil. Cien Rur 39 (2): 490-495
- Delabra, V.G., Fragoso, S.H., Franco, B.R., Martínez, I.F., Ortíz, E.M., Ortíz, N.A., Osorio, M.J., Santamaría, V.M., Soberanes, C.N., 1996. Manual de Identificación Taxonómica de garrapatas. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura y SAGARPA. México. Pp: 1-2.
- Drummond, O., Ernest, E., Treviño, L., Gladney, J., Graham, H., 1976. Test of acaricides for control of *Boophilus annulatus* y *Boophilus microplus*. J Econ Entomol (69): 37-40
- Duarte, M.O., Ferrarini, S.R., Pazinato, M., Oliveira, E.R., Rolim, V, Eifler-Lima, V.L., Ribeiro, V.L.S., Poser, G. Von, 2008. Acaricidal activity of the hyacinthacine analogues derived from pyrrolizidine alkaloids on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Parasitol Res 103 (3) 723-726
- FAO, 2003. Producción y Sanidad Animal 157 .ISSN 1014-1200. *Resistencia a los Antiparasitarios: Estado Actual con Énfasis en América Latina*. Pp: 42
- Fragoso, S.H., Soberanes, C.N., 2001. Control de la resistencia a los ixodícidias a la luz de los conocimientos actuales. Memorias del XXV Congreso Nacional de Buiatría, Veracruz, Ver. Pp: 40-47

- García, P.A.L., Barral, M., 1999. Métodos de control de las garrapatas. Ovis, 1999 (65). Disponible en: <http://74.125.47.132/search?q=cache:rQTrxCKHabwJ:bscw.rediris.es/pub/bscw.cgi/S4aeb584f/d586473/M%C3%A9todos%20de%20control%20de%20las%20garrapatas.doc+cipermetrina+garrapatas&cd=44&hl=es&ct=clnk&gl=mx>
- Gaxiola, C.S.M., 2008. Dinámica estacional de la garrapata *Boophilus microplus* en bovinos del estado de Sinaloa. Tesis Doctoral, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. pp.: 1-4,9,19.
- George, J.E., 2000. Present and Future Technologies for Tick Control. Ann N Y Acad Sci. 916: 583-588
- Ghosh, S., Azhahianambi, P., Yadav, M.P., 2007. Upcoming and future strategies of tick control: a review. [J Vector Borne Dis.](#) , 44 (2): 79-89.
- Horak, I., Camicas, J., Keirans, J. 2002. The *Argasidae*, *Ixodidae* and *Nuttalliellidae* (*Acari:Ixodidae*): a world list of valid names. Exp. Appl. Acarol. (28): 27-54
- Jittapalapong, S., Jansawan, W., Ginkaeu, A., Barriga, O.O., Stich, R.W.; 2004. Protection of Dairy cows Immunized with tick tissues against natural *Boophilus microplus* infestations in Thailand. Ann. N.Y. Acad. Sci. 1026: 289-297.
- Magnarelli, L.A., 2009. Global importance of tick and associated infectious disease agents. Clin Microbiol Newslett 31 (5): 33-37
- Mathews, P.J., 1992. Ticks of Veterinary importance. Agriculture Handbook No. 485, United States Department of Agriculture. Pp.: 9
- Mejía, E.F., García, V.Z., Rosario, C.R., 2008. Control de garrapatas *Boophilus microplus* resistentes a piretroides en el municipio de Pichucalco, Chiapas. Disponible en: <http://www.ammveb.net/XXVIII%20CNB/memorias/parasitarias/par02.doc>
- Nava, S., Guglielmo, A.A., Mangold, A.J.; 2009. An overview of systematics and evolution of ticks. Front Biosci 14, 2857-2877.
- Neri, O.S., Martínez, I.F., Osorio, M.J., 2001. Curso Importancia económica, biología, control, diagnóstico de resistencia en garrapata *Boophilus microplus*, mosca del cuerno *Haematobia irritans* y helmintos gastroentéricos en bovinos. Comisión Nacional de Sanidad Agropecuaria. Dirección General de Salud Animal. Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal.
- NOM-006-ZOO-1993 Requisitos de efectividad biológica para los ixodídeos de uso en bovinos y método de prueba.

Nolan, J., 1982. Current developments on resistance to amidine and phytretoid tickicides in Australia. In: Whitehead, G.B., Gibson, J.D., Tick biology and control. Rhodes-Grahamstown University, South Africa. Pp: 109-114

Olivera, G.J.A., 2007. Frecuencia y Distribución Geográfica de garrapatas en México durante los años 2000 al 2005. Informe Final de Servicio Social Legal. Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Pp: 1.

Ortíz, E.M., 1989. Métodos de control en garrapatas. Memorias del curso de Identificación y Diagnóstico de enfermedades hemoparasitarias que transmiten. Secretaría de Agricultura, Ganadería y Recursos Hidráulicos. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Pp:

Parrodi, F., 2005. Guías Técnicas para el registro de parasitocidas en el mundo. 13^a Reunión Anual del CONASA, 30 de noviembre al 2 de diciembre del 2005. Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, D.F., Pp: 219

Pirali, K.K., Razzaghi, A.M., Halajian, A., 2009. Acaricidal effect of the *Pelargonium roseum* and *Eucalyptus globulus* essential oils against adult stage of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* *in vitro*. Vet Parasitol 162 (3/4) :346-349.

Pereira, J.R., 2009. The efficiency of avermectins (abamectin, doramectin and ivermectin) in the control of *Boophilus microplus*, in artificially infested bovines kept in field conditions. Vet Parasitol 162 : 116-119

Phonsena, P., Banchong, Y., Rawanghet, C., 2006. Efficacy of essential oils from Phlai (*Zingiber montanum*), Turmeria (*Curcuma longa*) and wan nang kham (*C. aromatica*) against brown dog ticks. 44th Kasetsart University Annual Conference Kasetsart, 30 January-2 February, 2006. Bangkok, Thailand.

Prado, O.M.G., 2009. Evaluación *in vitro* de la eficacia de nuevos carbamatos en garrapatas *Boophilus microplus*. Tesis de Maestría, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Universidad Nacional Autónoma de México, Estado de México. Pp.: 1-2,9-12,14-15

Rahul, S., Ghosh, S., Mandal, D.B., Azhahianambi, P., Singhal, P.S., Pandey, N.N., Swarup, D., 2008. Efficacy of *Azadirachta indica* extracts against *Boophilus microplus*. Parasitol Res 104 (1): 149-153

Rodríguez, V.R.I., Rodríguez, A.F., Alonso, D.M.A., Frago, S.H., Santamaría, V.M., Rosario, C.R.; 2006. Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico. Prev Vet Med 75: 280-286.

Rodríguez-Vivas, R.I., Rodríguez-Arévalo, F., Alonso-Díaz, M.A., Fragoso-Sánchez, H., Santamaría, V.M., Rosario-Cruz, R.; 2006. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the state of Yucatán, México. *Vet Parasitol* 136: 335-342.

Rodríguez, V.R.I., Rivas, A.L., Chowell, G., Fragoso, S.H., Rosario, C.R., García, Z., Smith, S.D., Williams, J.J., Schwager, S.J., 2007. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. *Vet Parasitol* 146: 158-169

Rodríguez, V.R.I., Rosado, A.A., Basto, E.G., García, V.Z.S., Rosario, C.R., Fragoso, S.H., 2006. Manual Técnico para el control de garrapatas en el ganado bovino. Publicación Técnica No. 4, CENID-Parasitología Veterinaria, Jiutepec, Morelos, México. Pp.: 1-3, 9-10,18-24.

Rosado, A.J.A., Aguilar, C.A.J., Rodríguez, V.R.I., Borge, A.R., García, V.Z., Méndez, G.M., 2010. Screening of the acaricidal efficacy of phytochemical extracts on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) by Larval Immersion. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 12 (2): 417-422

Sardá-Ribeiro, V., Avancini, C., Goncalvez, K., Toigo, E. y Von Poser, G., 2007. Acaricidal activity of *Calea serrata* (Asteraceae) on *Boophilus microplus* and *Rhipicephalus sanguineus*. *Vet Parasitol* (8):134-141

Sardá-Ribeiro, V., Toigo, E., Bordignon, S., Goncalvez, C., Von Poser, G., 2007. Acaricidal properties of extracts from the aerial parts of *Hypericum polyanthemum* on the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* (147): 199-203

SENASICA, SAGARPA. 2009. Disponible en <http://www.senasica.gob.mx/?doc=265>

Soberanes, C.,N., Santamaría V.M., Fragoso, S.H., García, V.Z., 2002. Primer caso de la resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Tec Pecu Mex* 40 (1): 81-92

Soffer C.I., 1981. Efecto del agua sobre la efectividad de 3 ixodicidas contra *Boophilus microplus in vitro*. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. pp.: 54

Sutherst, R.W., 1989. Resistance of cattle to ticks as one element in a tick control. The eradication of ticks. FAO. Rome. Pp: 154-164

Tapia, P.G.G., 2004. Un modelo para predecir el tiempo que tarda para desarrollarse la resistencia de las garrapatas *Boophilus microplus* a los acaricidas. Tesis de Doctorado, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Nacional Autónoma de México. Pp: 12-15

Thakur, G.T., Chiguve, G.M., Shirsikav, P.M., Khillare, B.S., Jayrav, A.K., 2007. In vitro trial of chemical and herbal acaricides against *Boophilus microplus* ticks. Royal Veterinary Journal of India 3 (2): 142-146

Treviño. J.B., 1987. Aspectos económicos del programa de erradicación de *Boophilus ssp* en México. La erradicación de las garrapatas. Estudio FAO Producción y Sanidad Animal 75. Actas de la Consulta de Expertos sobre la erradicación de las garrapatas con referencia especial a las Américas, 22-26 Junio, México, D.F. Pp: 96-97

Valencia, A.M., 2004. Comparación de los métodos de diagnóstico de resistencia en garrapatas por inmersión de hembras adultas e impregnación de larvas. Informe Final de Servicio Social Legal. Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco. Pp:3-6, 9-18

Walker, A.R., Bouattour, A., Camicas, J.L., Estrada-Peña, A., Horak, I.G., Latif, A.A., Pegram, R.G., Preston, P.M., 2003. Ticks of Domestic Animals in Africa, a guide to identification of species. University of Edinburgh. Bioscience Reports. Pp: 1-2,21-27,67,147,149,161,202

Woodham, C.B., González-Origel, A., López León y Guereña Morales, R.; 1983. Progresos en la erradicación de las garrapatas *Boophilus spp* en México 1960-1980. Revista Mundial de Zootecnia. FAO. Revista trimestral sobre Producción y Sanidad Animal y Productos pecuarios 48: 18-24.

Zahir, A.A., Rahuman, A.A., Kamaraj, C., Bagavan, A., Elango, G., Sangaran, A., Kumar, B.S., 2009. Laboratory determination of efficacy of indigenous plant extracts for parasites control. Parasitol Res 105 (2): 453-461