



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA
PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL**

**ESTADO Y EVOLUCIÓN DE LA RESISTENCIA EN LA
GARRAPATA *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* A
IXODICIDAS, EN DOS MUNICIPIOS DEL ESTADO DE
TAMAULIPAS**

TESIS

**PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO
EN CIENCIAS**

**PRESENTA
FRANCISCO ALBERTO OLVERA VALENCIA**

COMITÉ TUTORAL

**TUTOR:
Dr. ROGELIO ALEJANDRO ALONSO MORALES**

COMITÉ TUTORAL

Dr. RODRIGO ROSARIO CRUZ

Dr. SERGIO RODRIGUEZ CAMARILLO



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

El presente trabajo fue realizado en las instalaciones del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal en Jiutepec, Morelos.

Realizado bajo la dirección del Dr. Rodrigo Rosario Cruz; Investigador del Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria (CENID-PAVET) y el Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales; Investigador del Laboratorio de Genética Molecular.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca autorizada para poder realizar mis estudios de Maestría.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por la formación académica y por permitirme ser parte de esta institución.

Al Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal y al Departamento de Ectoparásitos y Dípteros en Jiutepec, Morelos por las facilidades brindadas.

A Jetzebi Haydee Mendoza Lagunas por su amor, apoyo moral, por mantener la paciencia en mis malos ratos, por ayudarme a lograr un sueño y una meta en la vida.

A mis padres Pablo Olvera Vargas, María Ernesta Valencia Serrano, mis hermanos Eveling y Carlos Olvera Valencia por todo el apoyo, amor y por haber acudido a mi llamado cuando los necesite.

Al personal del CENAPA en especial al Director del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal MVZ Juan Gay Gutiérrez, Subdirector de Parasitología MVZ Fernando Parrodi López Aguado, Jefe de Departamento de Ectoparásitos y Dípteros MVZ Salvador Neri Orantes y a la Subdirectora de Apoyo a la Sanidad e Inocuidad Acuícola y Pesquera Biol. Maria del Rosario Quezada Delgado por su gran apoyo y facilidades brindadas.

A Dios Por darme salud, fortaleza y no dejarme solo en los errores y tropiezos cometidos, de los cuales también aprendí.

A mis tutores Dr. Rodrigo Rosario Cruz y Dr. Rogelio Alejandro Alonso Morales y al Dr. Sergio Camarillo Rodríguez integrante del comité Tutorial que me dieron la oportunidad, dedicaron tiempo y principalmente me permitieron poder concluir este estudio.

CONTENIDO

Tema	Pag.
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
1. INTRODUCCIÓN	8
1.1 Mecanismos de resistencia a ixodicidas	11
1.2. Factores que influyen en la evolución de la resistencia	15
1.3 Evolución de la resistencia a los ixodicidas empleados en el control de la garrapata <i>R. microplus</i> en México	16
2. JUSTIFICACIÓN	20
3. HIPÓTESIS	21
4. OBJETIVOS	21
5. MATERIAL Y MÉTODOS	21
5.1. Material biológico	21
5.2. Diagnóstico de susceptibilidad en larvas <i>R.</i> <i>microplus</i> mediante la Técnica de Stone & Haydock	22
5.2.1 Preparación de solución concentrada	22
5.2.2 Preparación de Dosis Discriminantes (D.D.):	23
5.2.3. Impregnación de papeles.	24
5.3 Técnica de inmersión larval modificada	25
6. RESULTADOS	26
6.1 Análisis de susceptibilidad a los ixodicidas de la familia de los piretroides sintéticos en larvas de garrapatas <i>R. microplus</i>	26
6.2 Análisis de susceptibilidad a los ixodicidas de la familia de los organofosforados en larvas de garrapatas <i>R. microplus</i>	31

6.3 Análisis de susceptibilidad a los ixodicidas de la familia

las amidinas en la garrapatas <i>R. microplus</i>	35
7. DISCUSIÓN	37
8. CONCLUSIÓN	39
9. REFERENCIAS	40
10. LISTA DE CUADROS	46
11. LISTA DE FIGURAS	47
12. ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS	48
13. ANEXOS	49

RESUMEN

El sector ganadero en el trópico y subtrópico mexicano es amenazado por garrapatas pertenecientes a la especie *Rhipicephalus microplus* la cual ocasiona daños directos a la industria agropecuaria o bien participan como vectores de enfermedades. Actualmente el principal método utilizado para el control de *R. microplus*, es la aplicación de ixodicidas, sin embargo en algunas partes de la República Mexicana se han vuelto ineficaces debido al surgimiento de poblaciones resistentes. El objetivo del presente trabajo consistió en estimar la tasa de susceptibilidad mediante la técnica de paquetes de larvas, a los principios químicos piretroides sintéticos, organofosforados y amitraz, en larvas de garrapatas *R. microplus* colectadas en Aldama Y Soto la Marina, Tamaulipas y compararlos con los resultados del año 2006. Los resultados de susceptibilidad a ixodicidas empleando la técnica de paquete de larvas (LPT), en muestras de garrapatas colectadas en los municipios de Aldama y Soto la Marina, indican que el fenómeno de la resistencia de las garrapatas *R. microplus* a las distintas familias de moléculas empleadas como ixodicidas, se ha incrementado considerablemente de 2006 a 2009 presentándose cada vez menos casos de susceptibilidad y tasas elevadas de resistencia a los ixodicidas empleados para su control.

Palabras claves: *R. microplus*, piretroides, organofosforados, amitraz, resistencia.

ABSTRACT

The livestock sector in the tropics and subtropics of Mexico is threatened by ticks belonging to the species *Rhipicephalus microplus* which causes direct damage to the agricultural industry or involved as disease vectors. Currently the main method used to control *R. microplus*, is the application of ixodicides, however in some parts of Mexico have become ineffective due to the emergence of resistant populations. The aim of this study was to estimate the rate of susceptibility using the technique of packets of larvae, the chemical principles synthetic pyrethroids, organophosphate and amitraz in larvae of ticks *R. microplus* collected in Aldama and Soto la Marina, Tamaulipas and compare the results of 2006. Susceptibility results using the technique ixodicides package larvae (LPT) in ticks collected samples in the municipalities of Aldama and Soto la Marina, indicate that the phenomenon of resistance of ticks *R. microplus* to different families of molecules used as ixodicides has increased considerably from 2006 to 2009 presenting fewer cases of high rates of susceptibility and resistance to control ixodicides employees.

Key words: *R. microplus* , pyrethroids, organophosphate, amitraz, resistance

1. INTRODUCCIÓN

En México la producción de ganado bovino en pie, carne y leche; significó en el año 2009 un ingreso monetario superior a los 161 millones de pesos. El estado de Tamaulipas ocupa el decimosegundo lugar dentro de los estados con mayor producción ganadera a nivel nacional y el tercero en volumen de ganado en pie, con destino a la exportación a los Estados Unidos de América (<http://www.siap.gob.mx>).

El estado de Tamaulipas está localizado geográficamente entre los paralelos 22°12' 31" y 27°40' 42" latitud Norte, y los meridianos 97°08' 38" y 100° 08' 52" de longitud Este, presenta una diversidad de climas, que van desde los climas sub-húmedo y húmedo con lluvias en verano en la zona sur-sureste, hasta climas templados en el altiplano Tamaulipeco y serranías, que varían de húmedo a seco según la altitud. Por sus condiciones climáticas, Tamaulipas es propicio para el desarrollo de las actividades agrícolas y ganaderas (<http://www.campotamaulipas.gob.mx/>).

Tamaulipas cuenta con una superficie de 4 millones 809 mil 434 hectáreas dedicadas a la actividad pecuaria, de las cuales 3 millones 703 mil 207 hectáreas son de agostadero y 1 millón 106 mil 227 hectáreas de praderas, estas representan el 60% de la superficie estatal. La producción total de animales en el sector ganadero está constituida por: el 47 % producción de ganado bovino, 23% de cerdos, 12% aves, 10% Caprinos y 8% Ovinos.

El sector ganadero y agrícola en Tamaulipas y otras partes de la República Mexicana, se ven amenazados por garrapatas que ocasionan severos daños directos a la industria agropecuaria o bien participan como vectores de enfermedades. Los programas de control de infestaciones por artrópodos u otros insectos, radican en la utilización de compuestos químicos que por la interferencia de algún sistema fisiológico o bioquímico produce un efecto letal sobre el parásito (Nolan 1985).

Las garrapatas representan uno de los grandes problemas que afectan la salud animal en el mundo. Estas parasitosis afectan al ganado bovino y en especial las garrapatas de la especie *R. microplus* porque causan gran impacto económico, derivado tanto de las medidas preventivas para evitar su presencia en áreas libres, como también de las medidas de control y tratamientos en regiones en donde están presentes. Se estima que los costos por los daños directos de las garrapatas y las enfermedades que transmiten al ganado son de US\$ 13.9 y US\$ 18.7 billones anualmente respectivamente (Ghosh *et al.* 2007). En Brasil las pérdidas económicas por este parásitos son de alrededor de dos mil millones de dólares por año (Andreotti *et. al.* 2003).

La garrapata *R. microplus* es de los ectoparásitos con mayor importancia en la industria ganadera, debido a que la mitad de su ciclo de vida lo realiza sobre los bovinos, aunque también se le puede encontrar sobre fauna silvestre como venados (*Odocoileus virginianus*). Los Estados que presentan mayor frecuencia e incidencia de garrapatas en el ganado son: Tamaulipas, Tabasco, Veracruz, Chiapas, Guerrero, Oaxaca y Jalisco, ya que presentan las condiciones climáticas favorables de trópico húmedo, que le permite desarrollar su ciclo biológico, aunado a que es en estos estados donde se encuentra concentrada la mayor población de ganado en el país.

R. microplus ocasiona la disminución de ganancia de peso de los bovinos, alarga los ciclos productivos, reduce la producción láctea, causa daño en las pieles bajando notablemente su valor comercial para la curtiduría. Adicionalmente tiene la particularidad de ser trasmisor de enfermedades hemoparasitarias como protozoarios (babesiosis), rickettsias (anaplasmosis) y enfermedades virales. Además incrementan los costos de producción por el uso de medicamentos y tratamientos garrapaticidas utilizados para su control (Rajput *et al.* 2006).

Villarino *et al.* (2001) menciona que el uso continuo de los acaricidas han ocasionado en las garrapatas y diversos géneros de insectos resistencia hacia

estos, lo cual reduce considerablemente su eficacia durante los programas de control.

La resistencia a ixodicidas no es un problema que se esté suscitando en los últimos años, en alguna región geográfica determinada o en alguna especie de insecto en particular; ya en el año de 1963, Busvine enlistó una serie de artrópodos de importancia para la salud pública, en los cuales se han presentado casos de doble o triple resistencia a los insecticidas en un corto periodo de tiempo; por ejemplo en la garrapata *Dermacentor variabilis* en 1959 se reportó su resistencia al Dicloro Difenil Tricloroetanol (DDT), y en el mismo año se observó el primer reporte de resistencia a insecticidas a base de gamma benceno hexacloruro (BHC) y dieldrin; otro ejemplo de los cambios evolutivos que han tenido que hacer las especies de insectos para sobrevivir a los insecticidas, es la mosca doméstica que en 1946 se reporta el primer caso de resistencia al DDT, lo cual fue debido en parte al uso de productos como el BHC y el dieldrin que en tan sólo tres años después de usarlos se reportan casos de resistencia y en el año de 1955 surgieron los primeros casos de resistencia a los insecticidas pertenecientes a la familia de los organofosforados.

Otra de las especie en la que también se ha observado que con el tiempo presenta cambios en la susceptibilidad a insecticidas ó bien resistencia, es la mosca *Lucilia cuprina*, en Australia para su control se utilizaron productos químicos de la familia organofosforados específicamente diazinon el cual fue remplazando en 1958 por el producto dieldrin y después de siete años (1965) de ser utilizado se presentaron casos de resistencia a este último (McKenzie and Batterham, 1998).

Actualmente el principal método utilizado para el control de *R. microplus* es la aplicación de ixodicidas, sin embargo en algunas regiones de México se han vuelto ineficaces, teniendo que ser suplantados cronológicamente por moléculas como las lactonas macrocíclicas o fenilpirazolonas las cuales ofrecen una alternativa de control mayor.

Los laboratorios farmacéuticos permanentemente están reformulando los productos químicos de uso agrícola o pecuarios para que ofrezcan una alternativa de control mayor. En el año 2002 los volúmenes de producción de insecticidas fueron de 22,494 toneladas, en el 2004 este volumen se vio disminuido a 19,225 toneladas, posteriormente en 2005 se produjeron 28,186 toneladas y los últimos datos que se tienen referente a la producción de insecticidas son del 2007, e indican que se produjeron 27,884 toneladas de plaguicidas (INEGI. 2008).

Factores como el uso generalizado de insecticidas, el tiempo de utilización, así como los malos manejos que se les da a dichos compuestos empleados en el control de insectos, que son vectores de enfermedades en humanos y animales, han creado una presión de selección, favoreciendo el desarrollo y evolución de la resistencia en más de medio millar de artrópodos de importancia en salud pública, agrícola y veterinaria. (Dzul *et al.* 2007; Rivero *et al.* 2010).

El fenómeno denominado resistencia a insecticidas, consiste en que un sector de una población de artrópodos adquiere la capacidad de sobrevivir a dosis de químicos que generalmente son letales para una población normal de la misma especie (Alonso *et al.* 2006), aún cuando los productos sean utilizados conforme a las recomendaciones del laboratorio productor.

1.1 Mecanismos de resistencia

La resistencia a los acaricidas puede ser originada por dos mecanismos principalmente:

1) La insensibilidad del insecticida en el sitio blanco, por lo general en el sistema nervioso del insecto, debido a un polimorfismo de una sola base o por sus siglas en inglés single nucleotide polymorphism (SNP).

El principal mecanismo de resistencia en artrópodos es conocido como knockdown (kdr) y fue descubierto en la mosca doméstica y subsecuentemente en muchos otros insectos y especies de arácnidos. Existen investigaciones

convincientes que muestran que el mecanismo kdr es causado por mutaciones en el canal de sodio (Tan *et al.* 2005).

Las mutaciones que causan resistencia kdr, son más comúnmente encontradas en la región del dominio II del canal de sodio resultado del cambio de aminoácidos lo cual provoca la insensibilidad del sistema nervioso de los insectos a los insecticidas (Kulkarni, *et al.* 2006) (Figura 1), dónde cinco diferentes residuos se han involucrado. Met918 en la unión entre IIS4-IIS5, Leu925, Thr929, y Leu1014 en el IIS6. La mutación más común es L1014F, que fue originalmente encontrada en la mosca doméstica (O'Reilly, *et al.* 2006).

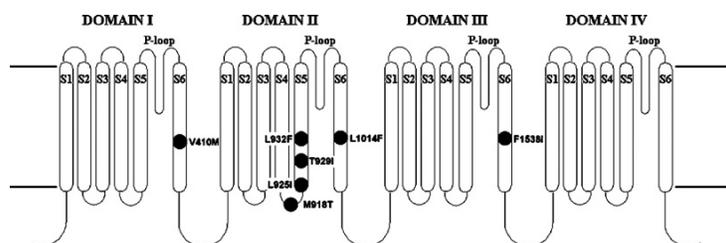


Figura1. Topología transmembranal del canal de sodio. Los poros de la sub unidad alfa compuesta de una sola cadena polipeptídica con cuatro dominios homólogos internos (I-IV), cada uno con seis hélices transmembranales (S1-S6). La identidad y la localización de las mutaciones kdr asociadas a piretroides se muestran, con residuos numerados de acuerdo a la secuencia del canal de sodio de la mosca (O'Reilly, *et al.* 2006).

Dentro de los cambios a nivel molecular que se han reportado en los insectos que producen un fenotipo de resistencia están las mutaciones de nucleótidos tal y como lo muestran los estudios realizados por Hartley *et al.* (2006) en Australia, donde comprobaron que dos mutaciones en el gen $\alpha E7$ (el cual codifica para la esterasa 3-E3) confieren resistencia en la mosca *Lucilia cuprina* a dos insecticidas específicamente diazinon y malathion. La resistencia a diazinon es causada por el cambio del aminoácido Gly137Asp, otorgando a la enzima una nueva actividad para hidrolizar el Of; la resistencia al malathion es ocasionada por la mutación de Trp251Leu, confiriendo bajos niveles de actividad para hidrolizar al malathion.

da Silva y de Azeredo-Espin (2009) sugieren que en *C. hominivorax* la mutación Trp251Ser, en el gen de la esterasa E3 es asociada con la hidrólisis de los piretroides.

La *M. domestica* es de los primeros insectos en los que se reportaron cambios en los genes de AChE (Val-180-Leu, Gly-262-Ala, Gly-262-Val, Phe-327-Tyr y Gly-365-Ala, confiriéndoles resistencia a los insecticidas organofosforados y carbamatos (Walsh *et al.* 2001).

La mosca de la fruta *D. melanogaster*, particularmente contiene cuatro mutaciones puntuales (Ile161Val, Gly265Ala, Phe330Tyr, Gly368Ala) en sitios altamente conservados en el gen que codifica para AChE, produciendo resistencia a Organofosforados y carbamatos. Los alelos que llevan estas mutaciones por separado o en combinación se han encontrado en las poblaciones naturales del mundo. Una sola mutación de este tipo, proporciona a la mosca de la fruta niveles moderados de resistencia (~75%), dos mutaciones en combinación originan altos niveles de resistencia (~80%), mientras tanto con tres o cuatro mutaciones conllevan a una fuerte resistencia a prácticamente a todos los organofosforados (Karasov *et al.* 2010).

En Kenia, África se han utilizado mosquiteros impregnados con piretroides para reducir los casos de malaria, a partir de 1991 se vio la reducción en la susceptibilidad a permetrina por *An. Gambiae*, un año después de la introducción de los mosquiteros tratados con piretroides. La resistencia a piretroides en *An. gambiae* está siendo ampliamente reportada en el oeste y centro de África. Esta resistencia es ampliamente asociada con la insensibilidad del sitio blanco, derivado de una mutación puntual en el gen canal de sodio y se caracteriza por una sustitución de una leucina a fenilalanina en el Oeste de África y una mutación de una leucina a serina en el Este de África (Rubaihayo *et al.* 2008).

2) por un incremento de la tasa de metabolización enzimática, la cual acelera la eliminación de los insecticidas, antes de que alcancen su objetivo (Ffrench, 2006). Se ha comprobado que uno de los mecanismos de resistencia que emplean los insectos para contrarrestar los efectos letales de los insecticidas, es el aumento de la actividad enzimática de esterasas, GST ó monooxigenasas de función múltiple. Las enzimas más comunes encargadas de la detoxificación y metabolización de insecticidas organofosforados las carboxilesterasas las cuales son eficaces contra (Mouchés *et al.* 1987) y carbamatos, glutatión-S-transferasas o GST, eficiente contra insecticidas organofosforados, organoclorados y piretroides también citocromo P450 dependientes de monooxigenasas es eficaz contra la mayoría de los insecticidas, frecuentemente en conjunto con otras enzimas (Yang *et al.* 2001).

Mouchés *et al.* en 1987 observó que cepas de mosquitos *C. pipens* y *C. quinquefasciatus* son resistentes a organofosforados, debido a la detoxificación por el incremento en la producción de las enzimas esterasas. Munhenga *et al.* en el 2008, por su lado trabajó con la progenie de hembras de *Anopheles arabiensis* colectadas en Zimbabue durante el 2006, comprobando que en ocho cepas de moscos resistentes al DDT y permetrina presentaron significativamente alta actividad enzimática de GST, comparado muestras de referencia susceptibles. Lo cual les llevó a concluir que la alta actividad de GST es un fuerte candidato para explicar el fenotipo de resistencia.

En 1998 Raymond *et al.*, monitoreó en Montpellier, Francia la especie de mosquitos *Culex pipens* y su resistencia a los diferentes plaguicidas, notando que cuatro años después de que se comenzó a utilizar el clorpirifos, se identificó el primer gen de resistencia el cual participa en la sobreproducción de esterasas. Seguido por la aparición de una modificación en el sitio blanco en 1977 y dos pares de aloenzimas que incrementan la producción de esterasas A y B, ambas como resultado de la amplificación de los genes A4-B4 en 1984 y A2-B2 en 1991.

A la fecha, en más de 500 especies de insectos y ácaros se ha reportado que desarrollaron resistencia a alrededor de 300 componentes de insecticidas. Entre estas especies el 56 % son plagas de cultivos, 39% son artrópodos de importancia médica - veterinaria y 5 % son especies de insectos benéficas (Nwane *et. al.* 2009).

1.2. Factores que influyen en la evolución de la resistencia

Dentro de los factores que influyen en la selección y velocidad del desarrollo de la resistencia a acaricidas en las poblaciones de ácaros de campo se encuentran; los A.) Factores genéticos y B) Factores biológicos, los cuales son intrínsecos a las especies, por lo tanto se escapan del control humano y C). Factores operacionales que si pueden ser manejados a fin de evitar o retardar el desarrollo de la resistencia (Bisset, 2002):

A. Factores genéticos

1. Frecuencia de alelos Resistentes.
2. Número de alelos Resistentes.
3. Dominancia de alelos Resistentes.
4. Penetración, expresividad e interacción entre alelos Resistentes.
5. Selección pasada por otros productos químicos.

En los factores genéticos la dominancia es un factor determinante sobre los genes que confieren resistencia. El grado de dominancia del gen influye en el incremento de individuos resistentes en una población bajo presión de selección. Cuando el alelo resistente es recesivo, la población resistente se incrementara después de nueve generaciones (F9), mientras que cuando el alelo es dominante el incremento de individuos resistentes ocurrirá en la generación F4 (Alonso *et al.* 2006).

B. Factores Biológicos

1. Renovación de la generación.
2. Progenie por generación.

3. Monogamia, poligamia y partenogénesis.
4. Aislamiento y migración.

C. Factores operacionales

1. Químicos.

- a) Naturaleza química del plaguicida.
- b) Frecuencia y aplicación.
- c) Relación con sustancias químicas usadas anteriormente
- d) Persistencia de residuos de formulación

Aguirre et. al (2000) mencionan que la población de ganado en Argentina está distribuida en dos regiones con baja prevalencia de garrapatas (región Oeste) y alta prevalencia de garrapatas (región Este); en la región Este, el número de tratamientos que se aplican por año van de 6 a 12, contrariamente en la región Oeste el ganado es tratado de 1 a 4 veces al año, concluyendo que las poblaciones de garrapatas *R. microplus* resistentes a los acaricidas están localizadas en la región Este, mientras que no hay signos de resistencia en las poblaciones de garrapatas de la región Oeste.

1.3 Evolución de la resistencia a los ixodicidas empleados en el control de la garrapata *R. microplus* en México.

La continua búsqueda de nuevos principios activos que solucionen las dificultades ocasionadas por el uso de los productos clorados, a fin de evitar por un lado los residuos en tejidos de los animales tratados y por otro los problemas relacionados con la resistencia adquirida por la garrapata a este tipo de compuestos, llevó al surgimiento y utilización de ixodicidas pertenecientes a nuevas familias químicas.

Mundialmente, los organofosforados se introdujeron en los años 1950-1960 y fueron utilizados desde entonces fuertemente alrededor de todo el mundo. Pocos años después de su introducción comenzaron a emerger casos de alelos AChE resistentes al acaricida, hoy la resistencia a este tipo de ixodicidas está

siendo observada y caracterizada en numerosas especies de artrópodos (Karasov *et al.* 2010).

En México los ixodicidas organofosforados (Of) se comenzaron a utilizar en forma intensiva y periódica en el año de 1974 (Soberanes *et al.* 2002), son preparados orgánicos derivados del ácido fosfórico. En insectos el blanco primario de los ixodicidas organofosforados y carbamatos es la enzima acetilcolinesterasa (AchE) (Karasov *et al.* 2010).

El modo primario de acción de los ixodicidas organofosforados es inhibiendo la enzima acetilcolinesterasa (Núñez, *et. al.* 1987) en las uniones sinápticas por fosforilación, cerca o en su centro activo (Bisset 2002, Sogorb 2003). Actúan como análogos estructurales de la acetilcolina (ACh) (Sei Kim *et al.* 2003); formando enlaces covalentes muy estables con la enzima fosforilada. La liberación de esta enzima todavía puede ocurrir pero la reacción es mucho más lenta que con la Ach. Por lo tanto, la AchE no puede reaccionar eficientemente con la Ach liberada, el transmisor no se restablece y la función del nervio se altera (Bisset, 2002).

En el año de 1981, en México se reportó la presencia de garrapatas del genero *R. microplus* resistentes a los ixodicidas de la familia de los organofosforados y organoclorados, demostrando que la distribución de la resistencia era amplia en la región este y noroeste de México (en el área de las Huastecas) (Soberanes *et al.* 2002).

Debido a la presencia de cepas de garrapatas *R. microplus* resistentes a los organofosforados y como una alternativa de control, en el año de 1986 se dio la autorización para el uso de los piretroides sintéticos. Los cuales se caracterizan porque su sitio blanco o de acción es el canal de sodio (Guerrero *et al.* 2002; Singh *et al.* 2009). Se consideran que actúan a nivel de la membrana de la célula nerviosa, interfiriendo en cambios conformacionales de las proteínas en la interface lípido-proteína, provocando un retardo en el cierre de los canales de

sodio después que el impulso ha pasado (Bisset, 2002), ocasionando cambios en la permeabilidad de los iones sodio y potasio; produciendo un incremento del potencial negativo, seguidas de hiperexcitación (Narahashi *et al.* 2007) y posterior bloqueo de la conducción nerviosa, lo cual lleva a la parálisis de las garrapatas intoxicadas (Núñez, *et. al.* 1987).

En el año de 1993 se detectaron cepas de garrapatas con características toxicológicas de resistencia a piretroides y organofosforados, en las zonas ganaderas del Golfo de México, noreste y sur de Tamaulipas, en el este de San Luis Potosí, sureste de Tabasco, noreste de Chiapas, norte y sur del estado Veracruz (Soberanes *et al.* 2002).

Como alternativa de control a las garrapatas doble resistentes, se comenzó el uso del amitraz, el cual pertenece a la familia de las formamidinas y ha sido utilizado por su habilidad de imitar la acción del neurotransmisor octopamina en los artrópodos, causando sobre estimulación sináptica (Bravo *et al.* 2008), biológicamente su eficacia radica en la capacidad de inhibir la ovoposición en las hembras ingurgitadas, interfiriendo su ciclo evolutivo. Los primeros brotes de cepas de garrapatas en México resistentes al amitraz fueron localizadas en el estado de Tabasco en el año 2001 (Soberanes *et. al.* 2001).

En Nueva Caledonia después de seis años de utilización del ixodicida deltametrina se reportó el primer caso de resistencia. Posteriormente durante un periodo de dos años fue utilizado el producto Dursbel ND (Chlorpyriphos-ethyl) el cual fue sustituida su utilización en 2006 por el amitraz (Tactic), en aquellos lugares con resistencia a la deltametrina (Ducornez, *et. al.* 2005).

En otras partes del mundo como en Queensland, Australia, también se encuentra presente la garrapata del género *R. microplus* la evolución y la aparición de la resistencia a los diferentes ixodicidas fue de la siguiente forma (Alonso *et al.* 2006):

IXODICIDA	Año de introducción	Año de reconocimiento de resistencia
Arsénicos	1895	1937
DDT	1946	1954
BHC	1950	1952
Diazion	1956	1963
Dioxation	1958	1963
Coumafos	1959	1966
Clorpirifos	1966	1970

Cuadro 1. Resistencia de *R. microplus* a los ixodicidas en Queensland, Australia.

En ranchos de la costa oeste de Gadji cuya producción de ganado Charolais y Hereford es semi-intensiva, se comenzó con el uso del amitraz, en aquellos ranchos con presencia de resistencia a piretroides sintéticos. Por el uso intensivo del amitraz, la resistencia a este ixodicida en estos ranchos apareció después de 5 años. En estos ranchos el número de tratamientos por año con el ixodicida amitraz de 1998 a 2003 fueron: 12, 11, 14, 15, 15 y 19 respectivamente. Concluyéndose que la aparición de la resistencia fue reportada después de 86 tratamientos (Ducornez, *et. al.* 2005)

2. JUSTIFICACIÓN

El estado de Tamaulipas es un alto productor de ganado bovino, tan solo los municipios Aldama y Soto La Marina produjeron en el año 2006 poco más de 46,000 toneladas de animales en pie y carne en canal, mientras que en el año 2009 la producción se incrementó a 95,083.91 toneladas. Además de ser el tercer estado Mexicano con mayor número de bovinos exportados a los Estados Unidos de America (<http://www.siap.gob.mx>).

La mayor parte de la producción ganadera en el estado de Tamaulipas es realizada en campos de pastoreo, lo que predispone a los animales a sufrir infestaciones por garrapatas. Los ganaderos al ver que sus animales son afectados por las garrapatas, cotidianamente recurren al control químico con la finalidad de contrarrestar las infestaciones de las mismas y disminuir los daños indirectos que producen.

Tomando como modelo estos municipios en los cuales la aplicación de ixodicidas ha sido de forma cotidiana y con ayuda del estudio en los cambios de la resistencia a los garrapaticidas permitiría establecer nuevas estrategias de control en aquellos estados, en los cuales se comienza a reportar fallas en el uso de productos garrapaticidas, lo que reducirá los costos de producción por incremento en las fallas de los productos garrapaticidas, tratamientos de enfermedades transmitidas por las garrapatas *R. microplus* también se podrán criar animales que fueron expuestos en menor número de veces a productos químicos y los productos derivados de estos serán más inocuos para el consumo humano.

3. HIPÓTESIS

Las poblaciones naturales de garrapatas *R. microplus* en el estado de Tamaulipas han modificado en el transcurso del tiempo su respuesta toxicológica a ixodicidas permitiéndoles tener una mayor tasa de sobrevivencia.

4. OBJETIVOS

- a. Estimar la tasa de susceptibilidad de garrapatas *R. microplus* a piretroides sintéticos y organofosforados, mediante la técnica de Stone & Haydock.
- b. Determinar la tasa de susceptibilidad al amitraz en muestras de garrapatas *R. microplus* mediante la Técnica de Shaw modificada.
- c. Comparar los porcentajes de mortalidad a piretroides sintéticos, organofosforados y amitraz en larvas de *R. microplus* obtenidas de garrapatas colectadas en Tamaulipas en los años 2006 y 2009.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Material biológico

Durante el 2006 se colectaron 66 muestras de garrapatas *R. microplus* en los municipios de Aldama y SLM, Tam.: 46 muestras provinieron de Aldama y 20 muestras de Soto La Marina; durante el año 2009 el número total de muestras de garrapatas adultas hembras *R. microplus* colectadas fueron 45; siendo 20 muestras procedentes del municipio de Aldama y 25 muestras de Soto la Marina. Las muestras se colocaron en cajas petri desechables y ubicadas en incubadoras a 28 ± 2 °C y una humedad relativa de 80 ± 10 % por 14 días (partiendo de la fecha de colecta). Las cajas petri fueron retiradas de las incubadoras y los huevos fueron depositados en viales en cantidad de 1 g por vial, e incubados a 28 ± 2 °C y 80 ± 10 % de humedad relativa por 26 días más partiendo de la fecha de retiro de oviposición, para que eclosionen los huevos, al final de este tiempo las larvas eclosionadas tuvieron una edad aproximada de 7 días.

5.2. Diagnóstico de susceptibilidad en larvas *R. microplus* mediante la Técnica de Stone & Haydock

La técnica de paquetes de larvas ha sido ampliamente utilizada para el estudio de los fenómenos de resistencia a los acaricidas en garrapatas ixodidas. Fue desarrollada por los investigadores australianos Stone & Haydock en 1962 y básicamente consiste en la exposición de larvas durante 24 horas en papeles filtro impregnados con principios químicos de diferentes familias.

5.2.1 Preparación de solución concentrada

Para preparar la concentración inicial del principio químico con el que se va a tratar a las larvas, es preciso determinar el valor porcentual de esa concentración, el volumen que se requiere, y conocer la concentración a la que viene la forma técnica para poder aplicar la fórmula, que permite conocer la cantidad en gramos que se debe pesar para obtener la concentración en porcentaje del químico en el volumen deseado de la primera dilución (Stone and Haydock, 1962).:

$$\left(\frac{(\% \text{ C.I.})}{(f \times 3)} \right) \times \left(\frac{(100\%)}{(\% \text{ C.F.T.})} \right) = \text{g de principio técnico}$$

Donde:

% C.I. = Porcentaje de la concentración que se desea obtener.

f = Es el valor fraccionario que se asigna al volumen que se quiere preparar, tomando como entero 100 ml.

3 = es un número que se usa como constante, y que expresa también en este caso el valor fraccionario resultante de la siguiente consideración: El fijador que se utiliza es el aceite de oliva, y como diluyente se usa el tricloroetileno. El aceite de oliva se utiliza en una proporción de 1 parte en dos partes del diluyente (o sea, existe un tercio de aceite en esa mezcla, 1/3).

% C.F.T. porcentaje de concentración de la forma técnica del reactivo a utilizar.

El principio técnico se mezcla con el disolvente para impregnar el papel filtro, posteriormente es necesario proporcionar una hora de secado para que se lleve a cabo la evaporación del tricloroetileno

5.2.2 Preparación de las Dosis Discriminantes (D.D.):

La D.D. es aquella concentración que elimina al 100 % de garrapatas en una población susceptible pero permite la sobrevivencia de las que son resistentes (Stone and Haydock, 1962) (Cuadro 2):

FAMILIA QUÍMICA	IXODICIDA	D.D.
Organofosforados	COUMAPHOS	0.2 %
	DIAZINON	0.08 %
	CHLORPIRIFOS	0.3 %
Piretroides Sintéticos	FLUMETRINA	0.01 %
	DELTAMETRINA	0.09 %
	CIPERMETRINA	0.5 %
Amidina	Amitraz	0.0002 %

Cuadro 2. Dosis Discriminantes para el diagnóstico de susceptibilidad en muestras de garrapatas *R. microplus* cepa "Susceptible".

A partir de la solución concentrada, se prepara la D.D. mediante la siguiente fórmula:

$$(C_i) (V_i) = (C_f) (V_f)$$

Donde:

C_i = Concentración inicial del producto ixodicida

V_i = Volumen inicial que se toma del producto ixodicida para ser diluido

C_f = Concentración final del producto a preparar

V_f = Volumen del producto ixodicida que se desea preparar

5.2.3. Impregnado de papeles.

Con la solución D.D. se procede al impregnado de los rectángulos de papel filtro de 7.5 X 8.5 cm., los cuales se utilizaron para depositar las larvas. Estos deben ser previamente identificados con lápiz de grafito con el nombre de la molécula que se vaya a utilizar. La impregnación se realizó con ayuda de una micro pipetas graduada con capacidad de 1,000 μ l, y se emplean 670 μ l (0.67 ml) de la dilución correspondiente por cada papel y dejando secar durante una hora, para que se evapore el tricloroetileno y quede solo el aceite y la molécula impregnada en la superficie del papel (Stone and Haydock, 1962).

Para el llenado de los paquetes se utiliza un pincel y una aguja de disección por muestra, tomando aproximadamente 100 larvas con una edad larval de 7 - 14 días y colocándolas dentro del paquete el cual es sellado en los extremos con broches de presión. Cuando se concluyó el llenado de todos los paquetes, fueron introducidos durante 24 horas en incubadoras mantenidas a 28 ± 2 °C. y un rango de 80 a 90% de humedad relativa.

El criterio de respuesta que se evaluó en la prueba es mortalidad o parálisis, todas las larvas que puedan caminar o deslizarse por sí mismas se consideran como vivas. Para facilitar la separación de vivas y muertas se utiliza un pedazo de masking tape. Ya separados los especímenes, se cuentan las vivas sobre el mismo masking tape y las muertas sobre el papel filtro (Stone and Haydock, 1962).

5.3 Técnica de inmersión larval modificada (Shaw's immersion sandwich technique) para el amitraz.

Para la realización de ésta técnica se utilizó el producto acaricida Taktic[®] formulado comercialmente. En la validación de la técnica de Shaw modificada por Soberanes (2001). los ensayos produjeron dosis respuesta de 0 a 100% de mortalidad en la cepa susceptible, además de que la prueba es capaz de detectar y cuantificar la susceptibilidad al amitraz en cepas de garrapatas *R. microplus* susceptibles y resistentes y es más sensible comparada con otras técnicas (Miller et. al.2007).

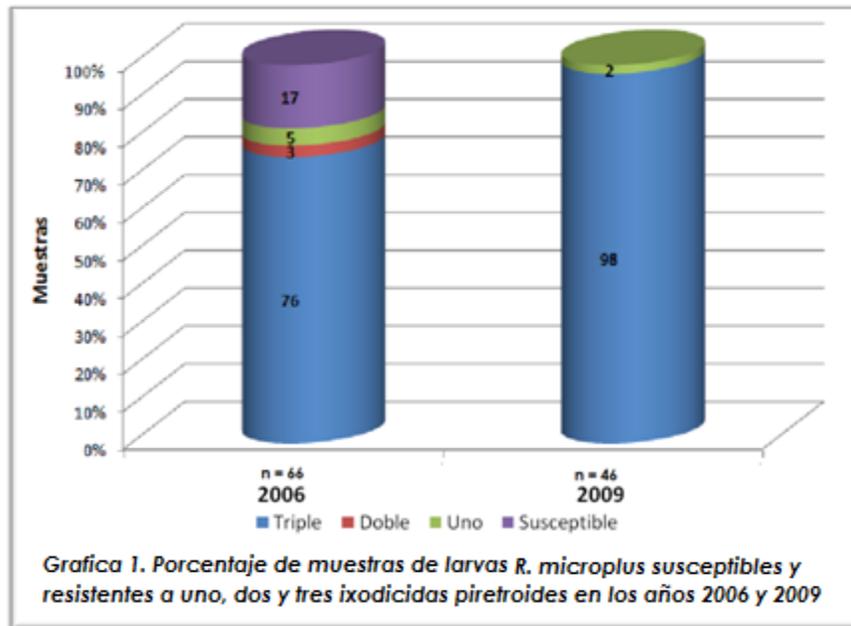
En una caja petri de vidrio de 15 cm de diámetro, se colocó papel filtro Whatman No. 1 de 12.5 cm de diámetro y colocadas de 300-500 larvas que son distribuidas en el papel. El papel filtro se impregnó con 10 ml de amitraz preparado a 0.0002%, una vez que se colocadas las larvas sobre el papel filtro, se cubrieron con otro papel filtro por 10 minutos. Una cantidad de \approx 100 larvas son extraídas de los dos papeles y fueron colocadas en paquetes de papel filtro. Se incubaron por 72 horas a una temperatura de $28 \pm 2^{\circ}$ C y 80-90 % de humedad relativa Soberanes (2001).

6. RESULTADOS

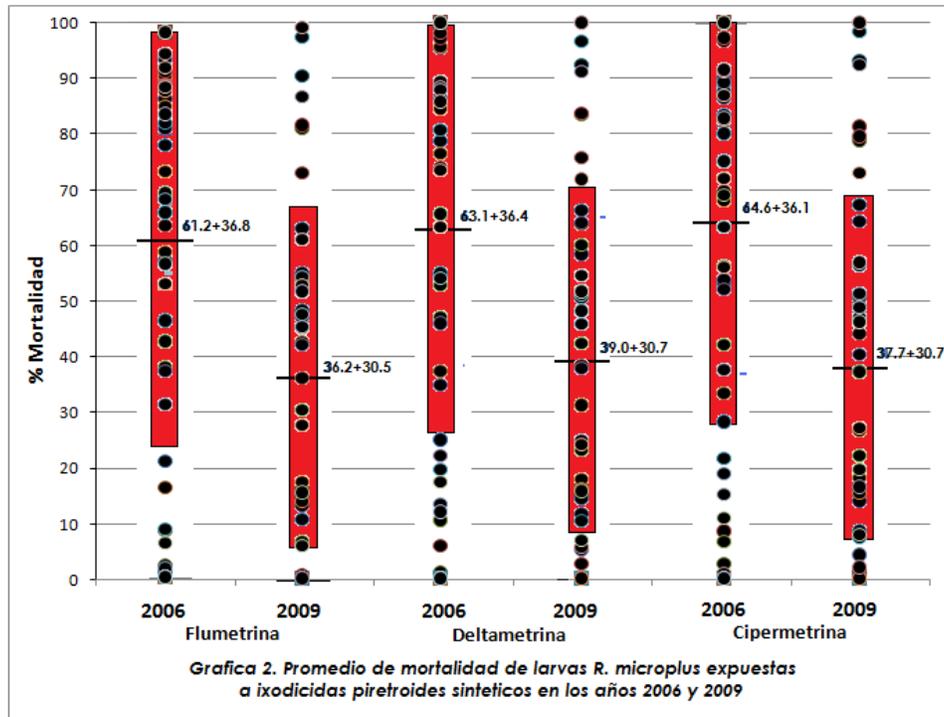
6.1 Análisis de susceptibilidad a los ixodicidas de la familia de los Piretroides Sintéticos en larvas de garrapatas *R. microplus*.

Los porcentajes de susceptibilidad a los principios químicos flumetrina, deltametrina y cipermetrina pertenecientes a la familia de los piretroides sintéticos fueron obtenidos mediante la técnica de Stone & Haydock (1962) en muestras de garrapatas *R. microplus* procedentes de los municipios Aldama y Soto La Marina en Tam.

La grafica 1 presenta los porcentajes de muestras que resultaron susceptibles o resistentes a uno, dos o tres de los principios químicos utilizados en los ixodicidas, mediante la exposición de las larvas en paquetes impregnados en el año 2006 y 2009. En el 2006 el 76% de las muestras analizadas presentó resistencia a los tres piretroides, 3% de las muestras fue resistente a dos piretroides, 5% de las muestras resultó resistente a un solo piretroide y solo el 17% de las muestras fueron susceptibles a los tres piretroides. En lo que respecta a las pruebas de susceptibilidad hechas a las poblaciones de garrapatas colectadas en el 2009 el 98% de las muestras resultaron resistentes a flumetrina, deltametrina y cipermetrina y el 2% restante tuvo resistencia a un piretroide.



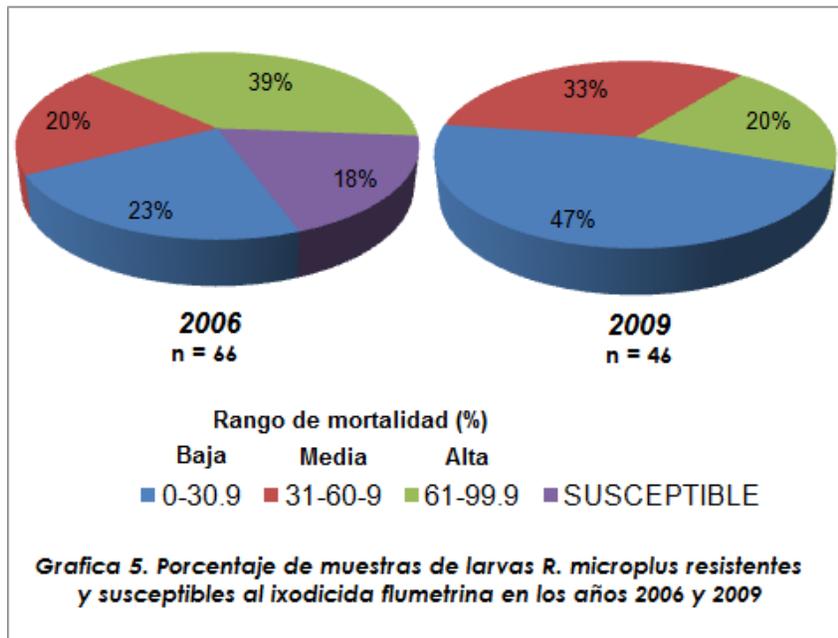
El promedio de mortalidad para los ixodicidas piretroides sintéticos y sus desviaciones estándar (DE) respectivas de las muestras de garrapatas colectadas en los años 2006 y 2009 están representadas en la gráfica 2. Con el ixodicida flumetrina la mortalidad promedio durante el año 2006 fue $61.24 \pm 38.84\%$ y en el 2009 el promedio de mortalidad disminuyó a $36.29 \pm 30.52\%$. Para el ixodicida deltametrina en el 2006 la mortalidad promedio fue de $63.17 \pm 36.49\%$ y posteriormente la mortalidad en el 2009 se redujo a $39.05 \pm 30.78\%$. Con cipermetrina en 2006 la mortalidad fue de $64.60 \pm 36.17\%$ y en 2009 el promedio de mortalidad de todas las muestras fue $37.78 \pm 30.79\%$. El análisis estadístico indica que si existe diferencia significativa $p < 0.05$ entre los porcentajes de mortalidad de las muestras del 2006 y 2009 en los principios químicos flumetrina, deltametrina y cipermetrina.



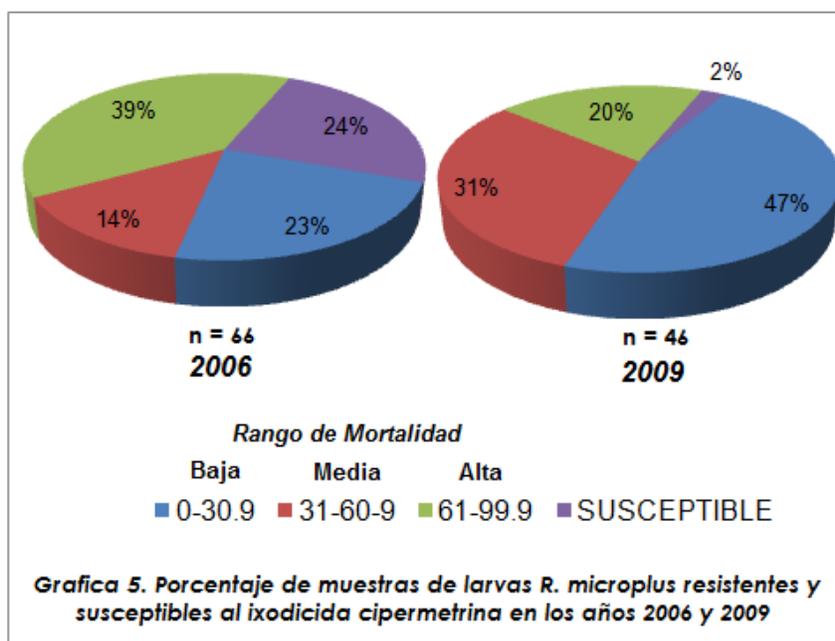
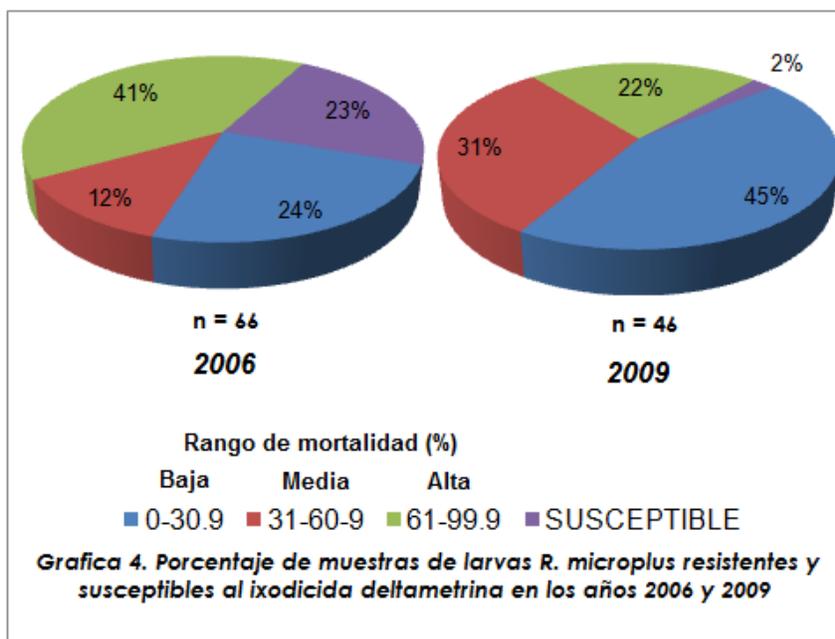
Los resultados de la técnica de paquete de larvas se agruparon en cuatro categorías, dependiendo del grado de mortalidad que se observó posterior a la exposición de los ixodocida: la categoría de baja mortalidad es para aquellas muestras que tuvieron un porcentaje de mortalidad comprendido entre 0 a 30.9%, las muestras con media mortalidad fue para aquellas en las cuales se contabilizó una mortalidad de 31% a 60.9%, las muestras catalogadas con alta mortalidad fueron aquellas en las que se observó una mortalidad de 61% a 99.9% y finalmente en aquellas muestras en las que el total de individuos resultaron muertos posterior a la exposición del ixodocida, fueron clasificadas como susceptibles o 100% de mortalidad.

En la grafica 3, se agrupan los resultados del año 2006 notando que un 18% de muestras son susceptibles, 39% de muestras con alta mortalidad, 20% de las muestras tienen mortalidad media y el porcentaje de las muestras con mortalidad baja es solo de 23%, en el año 2009 los casos de muestras susceptibles desaparecieron totalmente y sin embargo los casos con baja mortalidad se incrementaron a 47%, de igual forma el porcentaje de muestras con

mortalidad media se incrementan a 33% y el porcentaje de muestras con alta mortalidad disminuyó a 20%.

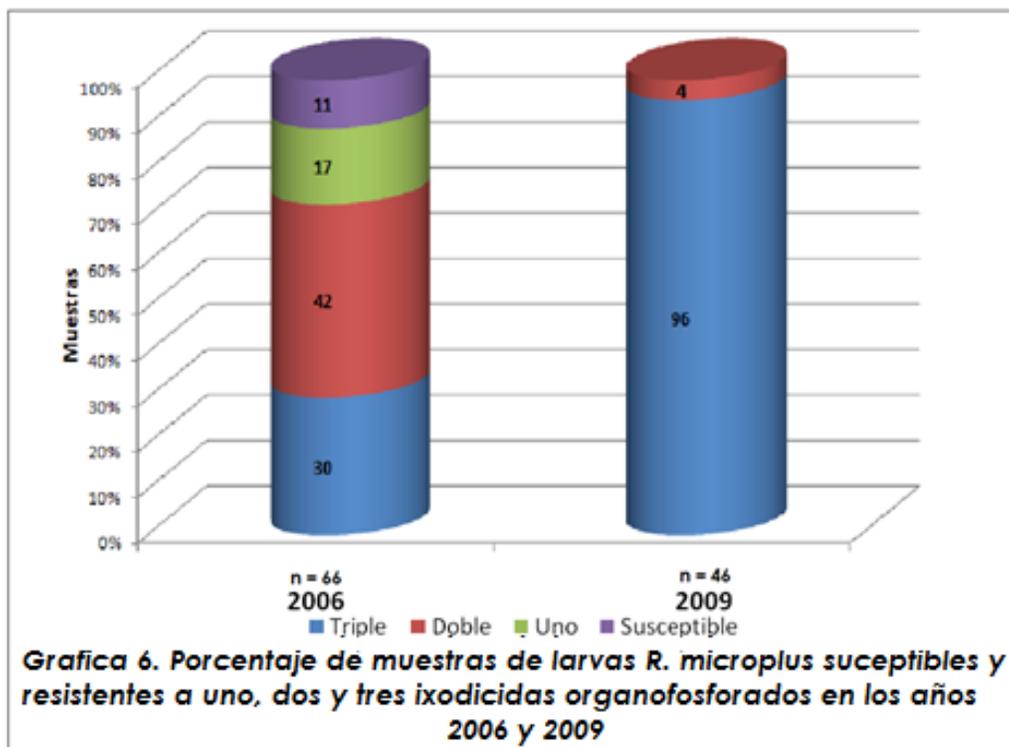


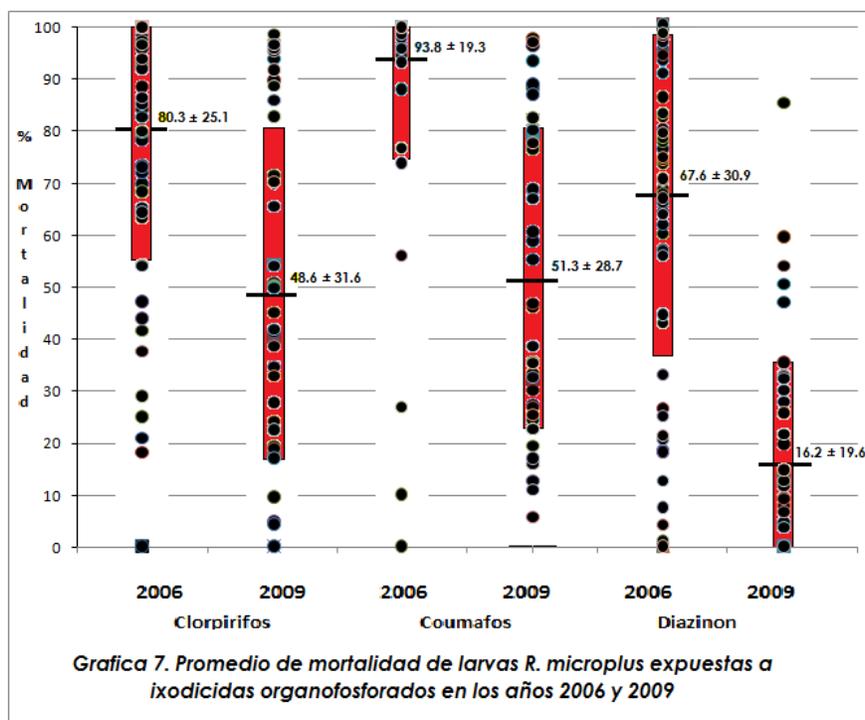
En lo que respecta a deltametrina y cipermetrina, el resultado de la exposición de las larvas fue muy homogéneo en ambos ixodocidas, en el 2006 el porcentaje de las muestras susceptibles fue de 23% y 24% respectivamente, los casos con alta mortalidad fueron de 41% y 39%, con media mortalidad de 12% y 14%, y los porcentajes de las muestras con baja mortalidad de 24% para deltametrina y 23% en cipermetrina. En el 2009 el porcentaje de muestras susceptibles en ambos ixodocidas se redujo a solo un 2% y se incrementaron los porcentajes de muestras con baja mortalidad ó en su defecto alta resistencia a 45% en deltametrina y 47% en cipermetrina (Graficas 4 y 5).



6.2 Análisis de susceptibilidad a los ixodídeos de la familia Organofosforados en larvas de garrapatas *R. microplus*

En el 2006 el 11% de las muestras fueron susceptibles a los tres organofosforados, el 17% presentó resistencia al menos a un organofosforado, la mayor parte de las muestras fueron resistentes a dos ixodídeos organofosforados (42%) y solo el 30% de las muestras fueron resistentes a los tres organofosforados. En el 2009 el cambio de susceptibilidad de las muestras es muy drástico, ya que el 96% de las muestras analizadas presentaron resistencia a los tres ixodídeos que fueron desafiadas las larvas y un 4% de las muestras fueron resistencia a dos ixodídeos. No se encontraron muestras susceptibles a los tres organofosforados (Grafica 6).

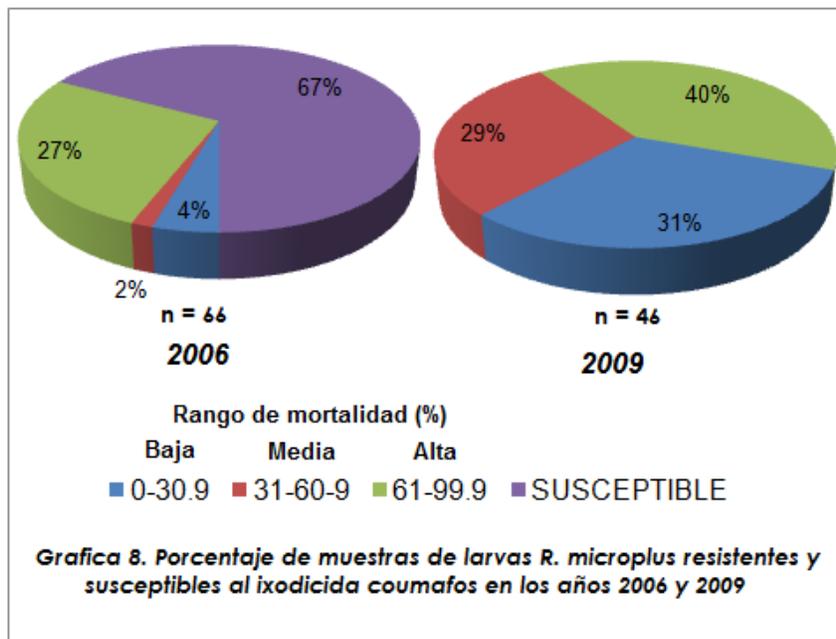




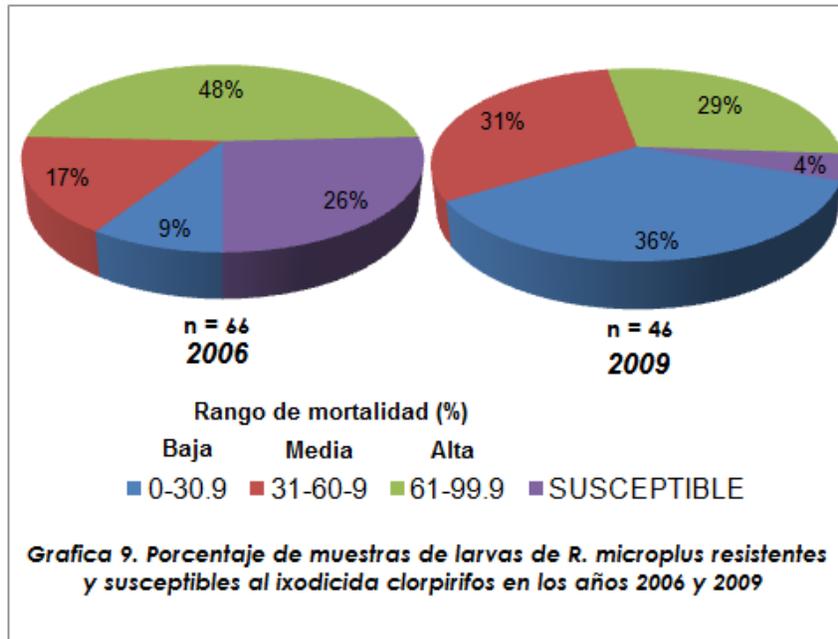
Los promedios de mortalidad a los ixodicidas organofosforados se representan en la gráfica 7. Como puede observarse en el 2006 el promedio de mortalidad en las muestras de garrapatas utilizando el ixodicida organofosforado clorpirifos fue de $80.3 \pm 25.1\%$, mientras que en el 2009 el promedio disminuye a $48.6 \pm 31.6\%$. En cuanto al coumafos en el año 2006 la mortalidad fue de $93.89 \pm 19.38\%$ y en el 2009 la mortalidad promedio resultante fue $51.33 \pm 28.78\%$. En el ixodicida diazinon la mortalidad promedio durante el 2006 es de $67.61 \pm 30.90\%$ y en 2009 disminuyó a $16.28 \pm 19.67\%$. El análisis estadístico indicó que existe diferencia significativa $p < 0.05$ entre los porcentajes de mortalidad de las muestras del 2006 y 2009 en los principios químicos clorpirifos, coumafos y diazinon.

Al agrupar los resultados del diagnóstico de susceptibilidad conforme a la clasificación utilizada con los piretroides, se observa que en el año 2006 utilizando el ixodicida coumafos el 67% de las muestras analizadas resultaron susceptibles, el 27% de las muestras tuvieron una mortalidad alta, el 2% mortalidad media y solo el 4% presentó baja mortalidad. En el año 2009 la mortalidad de las muestras

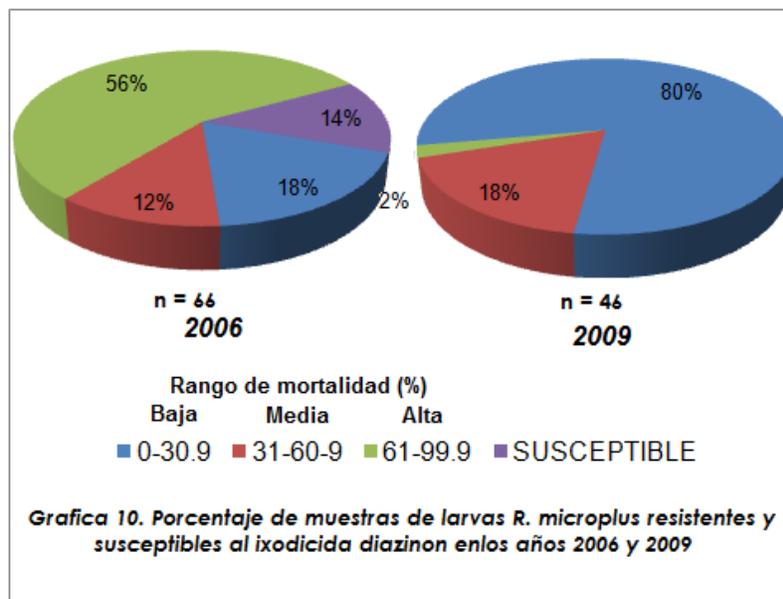
varió notablemente. No se encontraron muestras de garrapatas susceptibles en los municipios de Aldama y Soto la Marina, y se incrementó el porcentaje de muestras con alta mortalidad a 40%. El promedio de las muestras con mediana mortalidad fue de 29% y en el rango de muestras con baja mortalidad paso de 4% en el 2006 a 31% en el 2009 (Gráfica 8).



Con el ixodocida clorpirifos en 2006 el 26% de las muestras fueron susceptibles, la mortalidad alta estuvo presente en el 48% de las muestras, en 17% de las muestras la mortalidad fue media y en el 9% fue baja. De los ixodocidas organofosforados analizados durante el 2009, es únicamente en éste donde se encontró el 4%, de muestras susceptibles, mientras que el 29% de las muestras tienen alta mortalidad, el 31% tuvo una mortalidad mediana y un 36% de las muestras presentó baja mortalidad (Gráfica 9).

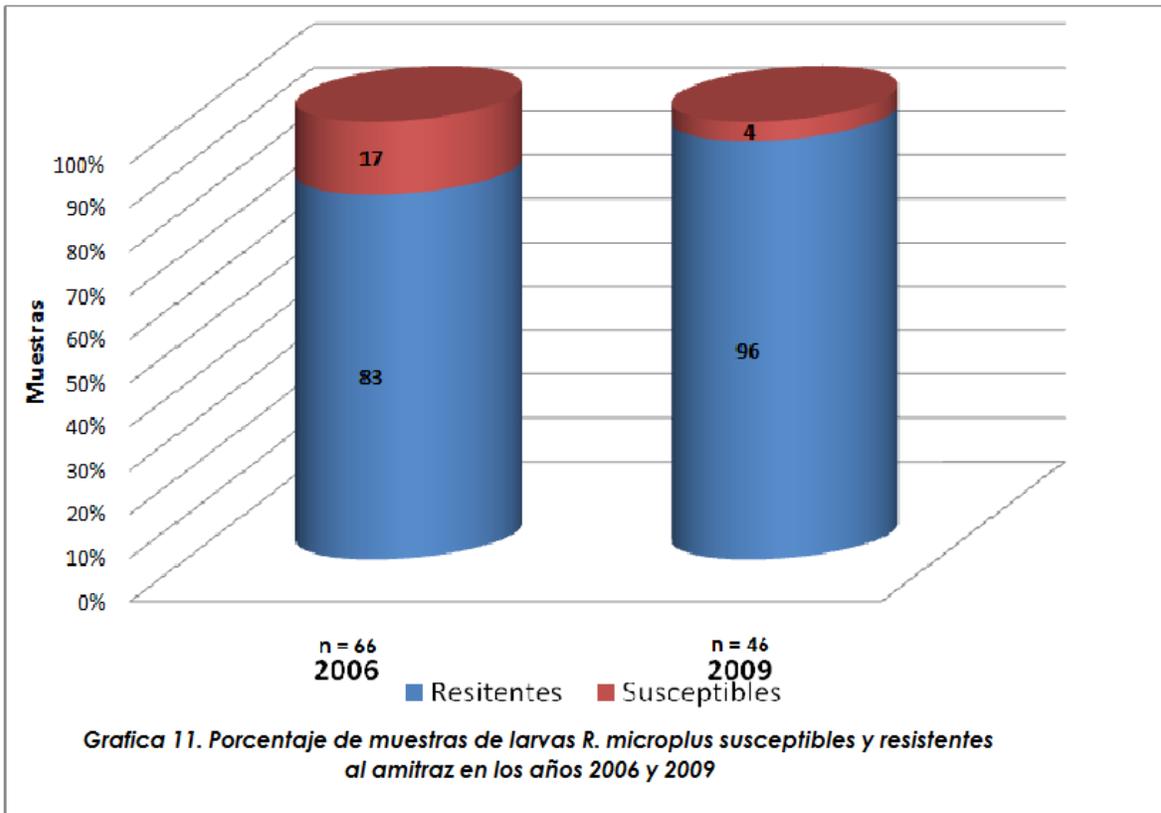


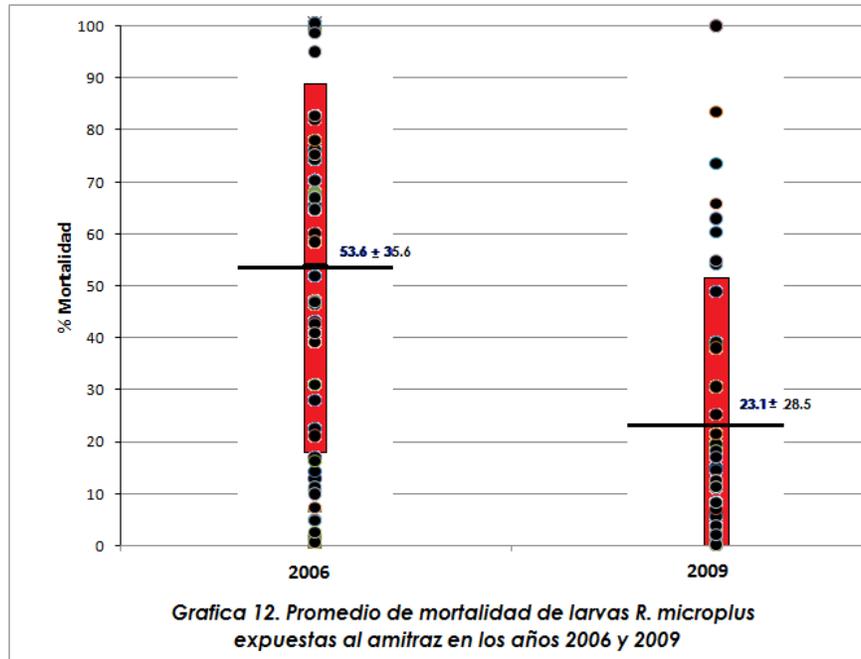
En el 2006 el 14% de las muestras presentaron susceptibilidad al diazinon, 56% tenían alta mortalidad, 12% media y solo un 18% de las muestras se ubicaron en baja mortalidad. Sin embargo en el 2009 el 80% de las muestras presentó una baja mortalidad, 18% de las muestras tiene una mortalidad media y solo el 2% tuvo alta mortalidad (gráfica 10).



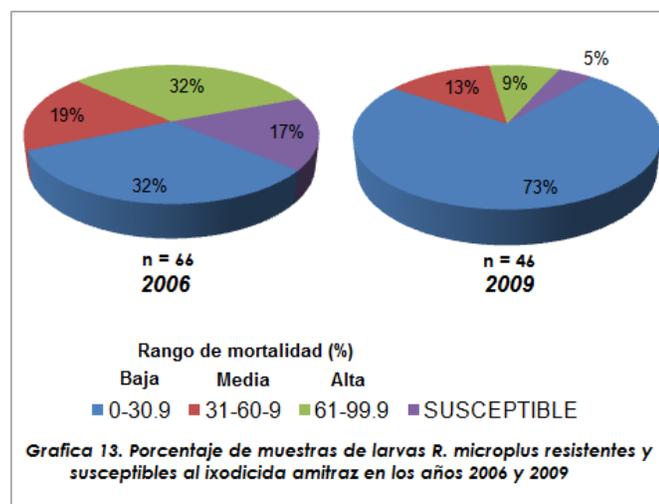
6.3 Análisis de susceptibilidad al ixodicida de la familia Amidinas en larvas de garrapatas *R. microplus*

Los porcentajes de muestras susceptibles y resistentes que se determinaron bajo la técnica de Shaw modificada en el año 2006 fueron 17% muestras susceptibles y 83% de muestras resistentes estas últimas con un promedio de mortalidad de $53.68 \pm 35.55\%$. En 2009 solo 4% de las muestras fueron susceptibles y 96% resistentes cuyo promedio de mortalidad fue $23.12 \pm 28.54\%$ (Graficas 11 y 12). El análisis estadístico indicó que existe diferencia significativa $p < 0.05$ entre los porcentajes de mortalidad de las muestras del 2006 y 2009 en el ixodicida amitraz.





Agrupando los casos de muestras susceptibles y resistentes conforme a su porcentaje de mortalidad se observa que en 2006 el 32% de las muestras tuvieron baja mortalidad, 19% media y 32% alta. El 17% de las muestras fueron susceptibles. En el 2009 el 5% de las muestras resultaron susceptibles, 9% tienen una alta mortalidad, 13% son de mediana mortalidad y el 73% de las muestras restantes presentan baja mortalidad (Grafica 13).



7. DISCUSIÓN

En México se requirieron siete años de utilización continua de los ixodicidas organofosforados y piretroides, para que se presentaran los primeros focos de resistencia (Soberanes *et. al.* 2002). Conforme a lo observado con los resultados de las pruebas de susceptibilidad en larvas de garrapatas *R. microplus*, colectadas en los municipios de Aldama y Soto la Marina, Tamaulipas; durante el 2009 y al ser comparados con los resultados del 2006, se observó que: 1) las poblaciones de garrapatas en tan solo tres años han modificado su susceptibilidad a los ixodicidas permitiéndoles sobrevivir y continuar su ciclo biológico y 2) la tasa de resistencia es mayor, siendo esto demostrado en los ensayos con el principio químico coumafos que en el año 2006 el 67% de las muestras analizadas fueron susceptibles y para el 2009 ninguna muestra lo fue. Sin embargo la cantidad de muestras con baja mortalidad se incrementó a 31% cuando en 2006 solo el 4% de las muestras presentó baja mortalidad.

En 1989 se consideraba que el mejor método por el cual se habían tenido los mejores resultados en el control de la garrapatas era la utilización de acaricidas químicos, aplicados sobre los animales por medio de baños de inmersión o aspersion. Para el caso particular de las infestaciones por garrapatas en México y de la utilización de la deltametrina, se concluyó que mediante la estricta aplicación de la concentración comercial de 0.0025 % (25 ppm) y a través de calendarios de aplicación sistemática que no permitan que la fase de adultas de garrapatas se encuentre sobre los bovinos infestados se puede ofrecer los porcentajes de control adecuados para esta plaga (Osorio, 1989).

En el año 2006 la situación de las muestras analizadas fue que el 17% de las muestras resultaron susceptibles a los tres piretroides sintéticos, 83% de las muestras fueron resistentes y el promedio de mortalidad que presentaban estas últimas era alrededor de 63%. Tres años más adelante el panorama de resistencia a piretroides cambió nuevamente, considerándose que el 100% de las muestras analizadas son resistentes y su media de mortalidad disminuyó a menos de 39%.

En México a partir del surgimiento de cepas de garrapatas resistentes a los ixodicidas organofosforados y piretroides se intensificó el uso del amitraz principalmente en las zonas noreste y sur de Tamaulipas. Pasaron siete años para el surgimiento de cepas resistentes al amitraz (Soberanes *et al.* 2002). Durante este estudio los casos de susceptibilidad al amitraz se vieron reducidos a solo el 4% en las muestras analizadas en el año del 2009, cuando tres años atrás el 17% de las muestras analizadas fueron susceptibles.

Independientemente del mecanismo por el cual las garrapatas están evadiendo la acción de los ixodicidas, es importante señalar que los casos de resistencia múltiple ó triple resistencia a ixodicidas en los municipios de Aldama y Soto La Marina se han incrementado. En el año 2006 se presentaba un 3.03% de muestras susceptibles a todos los principios químicos de las tres familias de ixodicidas utilizados (piretroides sintéticos, organofosforados y amitraz), un 7.58% de muestras presentó al menos resistencia a un ixodicida, el 19.70% de las muestras resultó resistente a dos familias de ixodicidas y el 69.70% de las muestras resultó triple resistente. Para el año 2009 no se encontraron muestras susceptibles a todos los ixodicidas y con resistencia a al menos una familia, presentándose solamente un 4.44% de muestras con resistentes a dos familias de ixodicidas y el 95.56% de las muestras analizadas restantes fueron resistentes a las tres familias de ixodicidas.

8. CONCLUSIONES

Basándonos en los resultados de las pruebas de paquetes de larvas efectuadas a la progenie de las garrapatas colectadas en Aldama y Soto la Marian, Tamps en los años 2006 y 2009, se concluye que la susceptibilidad a ixodicidas por parte de las larvas del 2009 y al ser comparados con los resultados del 2006, se observó que las poblaciones de garrapatas modificaron su susceptibilidad a los ixodicidas permitiéndoles sobrevivir y continuar su ciclo biológico, de igual forma se presentó un incremento en la tasa de resistencia a los productos ixodicidas piretroides sintéticos, organofosforados y al amitraz.

9. REFERENCIAS

1. Alonso D. M., Rodríguez R. I., Fragoso S. H. y Rosario C. R. 2006; Resistencia de la garrapata *R. microplus* a los ixodicidas. Archivos de medicina Veterinaria. 38 (2), 105-113.
2. Aguirre D. H., Viñabal A. E., Salatin A. O., Cafrune M.M., Volpogni M. M., Mangold A. J. y Guglielmone A. A. 2000. Susceptibility to two pyrethroids in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) populations of northwest Argentina. Veterinary Parasitology 88: 329–334.
3. Andreotti R., Koller W. W., Tadei W. J., Prado A. P. Do, Barros J. C., Santos F. Dos, Gomes A. 2003. Ocurrance of the *Megeselia scalaris* (Loew, 1986) (Diptera, Phoridae) as a parasitoid of *Boophilus microplus* in Campo Grande, MS, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., 12, 1, 46-47
4. Bass C., Nikou D., Donnelly M. J., Williamson M. S., Ranson H., Ball A. Vontas J. and Field L. M. 2007. Detection of knockdown resistance (kdr) mutation in *Anopheles gambiae*: a comparison of two new high-throughput assays with existing methods. Malaria Journal. 6(111).
5. Bisset J. A. 2002. Uso correcto de insecticidas: control de la resistencia. Revista Cubana Medica Tropical. 54(3):202-219.
6. Bravo M. J., Coronado A. y Henríquez H. 2008. Eficacia in vitro del amitraz sobre poblaciones de *Boophilus microplus* provenientes de explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela. Zootecnia Tropical. 26(1).
7. Busvine J.R. 1963. The present status of insecticide resistance. Bull. Wld Hlth Org. 29: 31-40

8. Ducornez S., Barré N., Miller R. J. and de Garine-Wichatitsky. 2005. Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test. *Veterinary Parasitology*. 130 285-292.
9. Dzul F. A., Penilla R. P. y Rodríguez A. D. 2007. Susceptibilidad y mecanismos de resistencia a insecticidas en *Anopheles albimanus* del sur de la Península de Yucatán, México. *Salud Pública México*. 49:302-311.
10. French-Constant. 2006. Which came First: insecticides or resistance? *Trends in Genetics*. 23 (1).
11. Guerrero, F. D., Li, A. Y. y Hernández, R. 2002. Molecular diagnosis of pyrethroid resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 39 (5): 770-776.
12. Guerrero F. D., Pruet J. H. and Li A. Y. 2002. Molecular and biochemical diagnosis of esterase-mediated pyrethroid resistance in a Mexican strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental and Applied Acarology* 28: 257-264
13. Ghosh S., Azhahianambia P. and Yadav M. P. 2007. Upcoming and future strategies of tick control: a review. *J Vect. Borne Dis.* 44: 79-89.
14. Hartley C.J., Newcomb R. D., Russell R. J., Yong C.G., Stevens J. R., Yeates D. K., La Salle J. and Oakeshott J. G. 2006. Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. *PNAS* 103(23)
15. INEGI. *El Sector Alimentario en México, 2008*. Aguascalientes, Ags., 2008.

16. Karasov T., Messer P. W. y Petrov D. A. 2010. Evidence that adaptation in *Drosophila* is not limited by mutation at single sites. *Plos Genetics*. 6(6).
17. Kulkarni M. A, Rowland M., Alifrangis M., Mosha F. W, Matowo J., Malima R., Peter J., Kweka E., Lyimo I., Magesa S., Salanti A., Manfred E Rau and Chris Drakeley. 2006. Occurrence of the leucine-to- phenylalanine knockdown resistance (*kdr*) mutation in *Anopheles arabiensis* populations in Tanzania, detected by a simplified high-throughput SSOP-ELISA method. *Malaria Journal*, 5:56
18. McKenzie J. A. and Batterham P. 1998. Predicting insecticide resistance: mutagenesis, selection and response. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* 353, 1729-1734.
19. Miller R. J., Davey R. B., White W. H. and George J. E. 2007. A comparasion of three bioassay techniques to determine amitraz susceptibility in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Med. Entomol.* 44(2) 283-294.
20. Mouchés C., Magnin M., Berge J-B., De Silvestri Mo., Beyssat V., Pasteur N. and Geoughiou G. P. 1987. Overproduction of detoxifying esterases in organophosphate-resistant *Culex* mosquitoes and their presence in other insects. *Pro. Natl Acad. Sci.* 84: 2113-2116.
21. Munhenga G., Masendu H. T. , Brooke B. D., Hunt R H and Koekemoer L. K. 2008. Pyrethroid resistance in the major malaria vector *Anopheles arabiensis* Gwave, a malaria-endemic area in Zimbabwe. *Malaria Journal*. 7:247
22. Narahashi T, Zhao X, Ikeda T, Nagata K . and Yeh JZ. 2007. Differential actions of insecticides on target sites: basis for selective toxicity. *Hum. Exp. Toxicol.* 26(4): 361-366.

23. Nolan, J. 1985. Mechanisms of resistance to chemicals in arthropod parasites of veterinary importance. *Veterinary Parasitology*. 18; 155-166
24. Nwane P., Etang J., Chouaibou M., Toto J. C., Kerah-Hinzoumbé C., Mimpfoundi R., Awono-Ambene H. and Simard F. 2009. Trends in DDT and pyrethroid resistance in *Anopheles gambiae* s.s. populations from urban and agro-industrial settings in southern Cameroon. *BMC Infectious Diseases*. 9:163
25. Núñez, J. L., Muñoz, C. M. E. y Moltedo, H. L. 1987. *Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno. Ed. Hemisferio Sur.
26. O'Reilly A. O., Khambay B. P. S., Williamson M. S., Field L. M., Wallace B. A. and Davies T. G. E. 2006. Modelling insecticide-binding sites in the voltage-gated sodium channel. *Biochem. J.* 396, 255–263.
27. Osorio M. J. 1989. Efecto de diferentes concentraciones de deltametrina sobre 6 cepas de ixodidos, mediante la prueba de establo con camaras. Tesis para obtener el título de Biólogo. Universidad Autónoma del Estado de Morelos. Facultad de Ciencias Biológicas.
28. Pethuan S., Jirakanjanakit N., Saengtharatip S., Chareonviriyaphap, T., Kaewpa, D. and Rongnoparut, P. 2007 Biochemical studies of insecticide resistance in *Aedes (Stegomyia) aegypti* and *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Diptera: Culicidae) in Thailand. *Tropical Biomedicine* 24(1).
29. Pruet, J. H., Guerrero, F. D. and Hernández, R. 2002; Isolation and identification of an esterase from a mexican strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J. Econ Entomol.* 95 (5), 1001-1007.

30. Raymond M., Chevillon C., Guillemaun T., Lenormand T. and Pasteur N. 1998. An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Phil.Trans. R. Soc. Lond.* 353, 1707-1711.
31. Rajput Z. I., Hu S. H., Chen W. J., Arijó A. G. and Xiao C. W. 2006. Importance of ticks and their chemical and immunological control in livestock. *Journal of Zhejiang University Science B.* 7(11):912-921.
32. Rivero A., Vézilier J., Weill M., Read A. F. and Gandon S. 2010. Insecticide control of vector-borne diseases: When is insecticide resistance a problem? *Plos Pathogens* 6 (8).
33. Rubaihayo J., Tukesiga E. and Abaasa A. 2008 Reduced susceptibility to pyrethroid insecticide treated nets by the malaria vector *Anopheles gambiae s.l.* in western Uganda. *Malaria Journal.* 7:92
34. Sei Kim C., Tae Kim W., Saeng Boo K. and Kim S. 2003. Cloning, Mutagenesis, and Expression of the Acetylcholinesterase gene from a strain of *Musca domestica*; the change from a drug-resistant to a sensitive enzyme. *Molecules and Cells.* 15 (2)
35. da Silva N.M. and A.M.L. de Azeredo-Espin. 2009. Investigation of mutations associated with pyrethroid resistance in populations of the New World Screwworm fly, *Cochliomyia hominivorax* (Diptera: Calliphoridae). *Genet. Mol. Res.* 8 (3): 1067-1078.
36. Singh O. P, Bali P., Hemingway J., Subbarao S. K, Dash A. P and Adak T. 2009. PCR-based methods for the detection of L1014 *kdr* mutation in *Anopheles culicifacies sensu lato*. *Malaria Journal.* 8:154

37. Soberanes C. N., Santamaría V. M., Fragoso S. H. y García V. Z. 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Técnica Pecuaria México*. 40(1):81-92
38. Sogorb Sánchez Ma. 2003. Papel de las Esterasas en la detoxificación de insecticidas organofosforados, carbamatos y piretroides. *Revista de Toxicología*. 20 (2), 85-86.
39. Stone, B.F., Haydock , K.P. 1962. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.) *Bull. Ent. Res.* 53:563-578.
40. Tan J., Liu Z., Wang R., Huang Z. Y., Chen A. C., Gurevitz M. and Dong K. 2005. Identification of amino acid residues in the insect sodium channel critical for pyrethroid binding. *Mol. Pharmacology*. 67(2): 513-522.
41. Villarino Gutiérrez, Mario Alberto, Wagner G., Gale, SuryakantD., Waghela. 2001. Detección de las enzimas detoxificantes B esterasas en *Culex quinquefasciatus* (Say), *Boophilus microplus* (Canestrini) *Amblyomma cajennense* (Fabricius). *Veterinaria México* 31 (abril junio). 10-111.
42. Walsh S. B., Dolden T. A., Moores G. D., Kristensen M., Lewis T., Devonshire L. and Williamson M. S. 2001. Identification and characterization of mutations in housefly (*Musca domestica*) acetylcholinesterase involved in insecticide resistance. *Biochem J*. 359, 175-181.
43. Yang X., Margolies D. C., Zhu K. Y. and Buschman L. L. 2001. Host plant-induced changes in detoxification enzymes and susceptibility to pesticides in the twospotted spider mite. *Journal of Economic Entomology*. 94(2).

10. LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Resistencia de *Boophilus microplus* a los ixodicidas en Queensland, Australia.

Cuadro 2. Dosis Discriminantes para el diagnóstico de susceptibilidad en muestras de garrapatas *Boophilus microplus* cepa "Susceptible".

Cuadro 3. Porenajes de mortalidades en garrapatas *R. microplus*, obtenidos mediante la Técnica de Paquete de larvas"Stone & Haydock y Shaw modificada en el 2006.

Cuadro 4. Porenajes de mortalidades en garrapatas *R. microplus*, obtenidos mediante la Técnica de Paquete de larvas"Stone & Haydock y Shaw modificada en el 2009.

11. LISTA DE FIGURAS

- Grafica 1. Porcentaje de muestras susceptibles y resistentes a uno, dos y tres ixodicidas piretroides.
- Grafica 2. Comparación de medias y desviaciones estándar en ixodicidas pertenecientes a la familia de piretroides sintéticos
- Grafica 3. Porcentaje de muestras resistentes y susceptibles al ixodicida Flumetrina.
- Grafica 4. Porcentaje de muestras resistentes y susceptibles al ixodicida Deltametrina.
- Grafica 5. Porcentaje de muestras resistentes y susceptibles al ixodicida Cipermetrina.
- Grafica 6. Porcentaje de muestras susceptibles y resistentes a uno, dos y tres ixodicidas Organofosforados
- Grafica 7. Comparación de medias y desviaciones estándar en ixodicidas pertenecientes a la familia organofosforados.
- Grafica 8. Porcentaje de muestras resistentes y susceptibles al ixodicida Coumafos.
- Grafica 9. Porcentaje de muestras resistentes y susceptibles al ixodicida Clorpirifos.
- Grafica 10. Porcentaje de muestras resistentes y susceptibles al ixodicida Diazinon.
- Grafica 11. Porcentaje de muestras susceptibles y resistentes al amitraz.
- Grafica 12. Comparación de medias y desviaciones estándar en el ixodicida perteneciente a la familia de amidinas
- Grafica 13. Porcentaje de muestras resistentes y susceptibles al ixodicida Amitraz.
- Grafica 14. Porcentaje de muestras susceptibles o resistentes a una, dos y tres familias de ixodicidas en los años 2006 y 2009
- Figura1. Topología transmembranal del canal de sodio.

12. ABREVIATURAS Y SIGLAS USADAS

ACh	Acetilcolina
AchE	Acetilcolinesterasa
BCH	Bexacloruro de Benceno
BSA	Albumina Sérica Bovina
CDNB	1-Chloro-2,4-dinitrobenzene
D.D.	Dosis Discriminantes
DDT	Diclorodifeniltricloroetano
GSH	Glutathione (γ -L-Glutamyl-L-cysteinylglycine)
GST	glutación-S-transferasas
Kdr	Knockdown
nm	Nanometro
Of	Organofosforados
PBS	Phosphate buffered saline
PS	Piretroides Sintéticos
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
TMB	Tetramethyl-Benzidine
UI/L	Unidades internacionales/Litro

13. ANEXOS

Cuadro 3. Porcentajes de mortalidades en garrapatas *R. microplus*, obtenidos mediante la Técnica de Paquete de larvas”Stone & Haydock y Shaw modificada en el 2006.

Muestra	Clorpirifos	Coumafos	Diazinon	Flumetrina	Deltametrina	Cipermetrina	Amitraz
1	100	100	97.29	100	100	100	69.91
2	100	100	100	100	100	100	74.49
3	99.01	99.5	93.91	2.07	1	2.67	100
4	100	100	100	100	87	87.37	100
5	100	100	100	100	100	100	100
6	84.21	94.73	86.11	16.43	37.31	33.33	N/A
7	97.46	100	100	81.39	76.21	81.32	100
8	91,66	100	92,70	49,12	44,12	49,50	23,42
9	0	0	60	60	25.17	21.52	6.17
10	73.48	100	64.12	0	0	0	12.25
11	88,26	100	77,25	78,09	85,98	82,19	97,01
12	98,59	100	96,72	94,49	94,66	94,33	74,72
13	20,76	100	34,68	93,23	93,12	95,23	83,73
14	100	100	100	100	100	100	100
15	100	100	100	100		100	67.38
16	95.87	100	95.36	87.79	95.41	90.11	65.04
17	97.35	100	100	47.08	54.94	52.98	75.62
18	92.42	100	97.19	92.1	100	100	77.5
19	69.85	96.18	76.19	93.63	86.32	91.39	21.85
20	18.06	100	26.47	8.64	5.82	8.51	59.49
21	25	10	73.49	0	0	0	1.05
22	47.16	95.83	18.18	58.13	34.88	53.77	16.35
23	93.75	88.11	94.69	100	100	100	100
24	100	100	79.28	100	100	100	100
25	72.02	98.9	61.71	79.28	78.78	83.33	99.02
26	78.65	98.63	56.96	64.51	73.84	69.62	100
27	41.56	100	77.62	8.51	10.54	6.73	99.06
28	78.15	100	79.91	82.29	85.71	86.47	100
29	79.67	100	66	66.94	80.76	80.1	100
30	97.57	100	93.63	59.74	95.65	100	46.58
31	20.79	99.05	18.4	21.22	25	28.23	13.71
32	88.59	100	68.53	92.95	97.29	96.77	81.39
33	68.39	100	67.69	38.59	52.84	42	15.69
34	100	100	82.38	100	100	100	27.27
35	98.81	100	90.7	83.42	76.44	87.7	45.72
36	85.45	100	74.07	74.46	76.4	67.96	0
37	73.15	100	93.14	95.04	88.88	89.32	51.33
38	100	100	94.28	90.22	98.23	97.29	20.46
39	92.89	100	78.26	43.31	47.08	56.17	10.07
40	43.93	100	18.12	37.79	45.94	52.06	42.56
41	82.69	100	56.71	8.77	19.7	21.67	73.68
42	97	100	82.29	86.51	84.57	82.45	45.85
43	100	100	96.75	100	100	100	46.15
44	100	100	97.85	68.62	64.84	62.62	42.05
45	80	100	83.03	70.54	65.59	69.04	30.35
46	100	100	100	93.61	100	100	69.74
47	100	100	100	69.36	100	100	66.57
48	63.37	98.46	74.55	89.2	100	100	57.89

49	85.2	98.61	20.52	1.53	13.46	18.84	100
50	37.6	56.08	4.14	0	0	0.86	0
51	28.94	26.87	1.14	0	0	0	0
52	97.38	97.84	33	31.65	22.13	37.6	4.29
53	92.18	95.93	70.14	55.91	74.03	75.14	4.08
54	93.92	100	70.49	53.09	73.55	72.04	6.6
55	92.07	93.28	55.82	0	0	0	46.3
56	100	99.44	66.83	96.12	89.5	91.27	82.19
57	96.67	76.72	42.85	6.32	17.31	10.9	1.9
58	86.45	73.84	25	100	100	100	98.17
59	65.18	100	44.44	57.52	53.95	63.24	10.58
60	54.21	100	0	53.78	63.23	56.06	38.53
61	64.4	98.7	7.52	0	12	15.17	9.3
62	93.91	100	21.31	89.93	88.41	91.57	40.31
63	100	100	98.45	100	100	100	66.36
64	100	100	63.72	85.03	87.93	82.87	94.52
65	53.95	100	12.5	0	0	0	64.11
66	100	100	79.39	93.63	85.79	86.89	74.75

Cuadro 4. Porcentajes de mortalidades en garrapatas *R. microplus*, obtenidos mediante la Técnica de Paquete de larvas”Stone & Haydock y Shaw modificada en el 2009.

Muestra	Municipio	Clorpirifos	Coumafos	Diazinon	Flumetrina	Deltametrina	Cipermetrina	Amitraz
1	Aldama	70.95	55.36	3.81	48.15	50.53	37.35	14.86
2	Aldama	40.99	32.18	0	15.38	15.92	15.94	11.73
3	Aldama	9.62	88.35	0	0	0	0	19.3
4	Aldama	0.00	96.42	0	13.17	11.61	14.04	6.16
5	Aldama	41.26	78.07	47.05	90.47	92.47	93.26	0
6	Aldama	45.68	79.67	0	54.01	63.79	48.91	30.43
7	Aldama	28.07	58.89	13.57	63.04	66.23	67.24	0
8	Aldama	19.58	30.15	19.73	36.08	38.3	44.13	0
9	Aldama	72.41	33.33	85.48	81.01	83.48	78.82	0
10	Aldama	51.53	60.67	0	47.07	58.36	50.6	0
11	Aldama	55.03	78.37	0	0	0	0	38.95
12	Aldama	100.00	97.95	59.66	42.61	31.25	26.53	37.96
13	Aldama	18.13	89.07	4.3	10.7	14.33	8.54	0.78
14	Aldama	34.91	82.21	7.98	0.5	2.58	1.31	25.06
15	Aldama	51.05	76.49	14.36	53.94	60	51.12	0.37
16	Aldama	41.86	27.22	12.71	54.91	64.03	64.18	48.76
17	Aldama	50.51	80.26	0	15.38	10.37	7.5	5.44
18	Aldama	17.62	46	7.88	13.8	17.79	18.06	21.36
19	Aldama	0.00	35.56	0	0	0	0	14.37
20	Aldama	91.05	46.85	35.49	81.58	83.65	81.37	6.88
21	SLM	19.58	35.42	9.39	6.59	23.05	22.15	0
22	SLM	4.81	68.52	0	0	0	0	11.05
23	SLM	95.16	93.56	50.58	97.41	96.75	98.38	73.51
24	SLM	24.36	33.33	7.77	17.39	16.05	15.38	83.54
25	SLM	4.35	87.06	4.02	0	5.24	4.29	100
26	SLM	19.20	26.93	9.09	73.02	75.68	79.58	0
27	SLM	22.62	19.45	4.14	30.26	42.34	37.17	3.37
28	SLM	35.11	12.58	0	42.04	37.88	40.38	2.2
29	SLM	17.24	24.39	4.67	0	0	0	60.25
30	SLM	33.33	25.36	11.58	0	0	0	2.09
31	SLM	87.11	32.52	27.83	51.98	51.71	51.34	62.92
32	SLM	39.02	5.64	6.58	0	5.73	2.03	0
33	SLM	83.92	82.55	12.21	15.47	15.72	19.69	18.09
34	SLM	66.43	68.86	11.79	0	24.86	16.47	16.91
35	SLM	42.33	67	0	54.31	51.15	56.28	54.04
36	SLM	71.27	77.72	25.74	27.57	24.16	27.07	12.26
37	SLM	96.73	97.17	54.04	99.2	100	100	100
38	SLM	28.11	22.65	12.68	5.82	6.95	7.96	0
39	SLM	100.00	38.51	30.15	86.77	91.27	92.47	54.83
40	SLM	54.79	15.88	3.72	47.47	48.2	47.02	8.09
41	SLM	22.83	35.31	14.74	52.79	71.85	72.96	65.72
42	SLM	97.37	10.92	33.06	51.65	51.87	48.76	3.64
43	SLM	98.06	15.94	32.7	61.08	54.57	56.93	12.38
44	SLM	93.08	22.61	21.62	45.12	51.63	46.19	11.07
45	SLM	89.88	17.02	32.35	45.25	45.77	48.73	1.92