

**Universidad de la República  
Facultad de Veterinaria**

**Test de inmersión de larvas modificado en el perfil de sensibilidad de  
*Rhipicephalus microplus* a base de Amitraz**

**por**

**Br. Christian WEBER GIORDANO**

**TESIS DE GRADO** presentado como  
uno de los requisitos para obtener el  
título de Doctor en Ciencias  
Veterinarias  
Orientación: Producción Animal

**MODALIDAD: trabajo experimental**

**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2021**

2021

PÁGINA DE APROBACIÓN

Presidente de mesa:



Dr. Oscar Correa

Segundo miembro:



Dr. Diego Robaina

Tercer miembro:



Dra. Tatiana Saporiti

Cuarto miembro:



Dr. Gonzalo Suárez

Fecha:

25 de Junio de 2021

Autor:



Br. Christian Weber

## **AGRADECIMIENTO**

**A la Universidad de la República.**

**A mi tutor, Dr. Diego Robaina, y co-tutor, Dr. Gonzalo Suarez por su contribución en mi formación profesional, por acompañarme, guiarme y motivarme durante este proceso, haciendo posible la conclusión de esta etapa.**

**A mi familia por los valores transmitidos y el apoyo durante tantos años de carrera.**

**A Giorgina Damico, compañera de vida, por siempre estar.**

**A mis amigos, que siempre estuvieron presentes.**

**A los compañeros del Área Farmacología.**

**A los integrantes del Laboratorio de Farmacología de la Unidad de Farmacología y Terapéutica del Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria (UdelaR).**

**Al personal de Biblioteca, Hemeroteca y Referencias.**

## ÍNDICE

<b>PÁGINA DE APROBACIÓN</b>	1
<b>AGRADECIMIENTO</b>	1
<b>LISTA DE CUADROS Y FIGURAS</b>	4
<b>RESUMEN</b>	5
<b>SUMMARY</b>	5
<b>INTRODUCCIÓN</b>	6
Importancia global de la Garrapata	6
Rhipicephalus (Boophilus) microplus en la región	7
Rhipicephalus (Boophilus) microplus en Uruguay	8
Ciclo de vida de Rhipicephalus (Boophilus) microplus	9
Mecanismo para el control de Rhipicephalus (Boophilus) microplus	9
Amitraz como herramienta para control de R. microplus	10
Métodos para determinar la eficacia de compuestos químicos sobre Rhipicephalus (Boophilus) microplus	11
<b>HIPÓTESIS</b>	14
<b>OBJETIVO GENERAL</b>	14
<b>OBJETIVO ESPECÍFICO</b>	14
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	14
1. Actividades específicas	14
2. Reactivo Biológico	14
2.1 Larvas de garrapatas del género Rhipicephalus (Boophilus) Microplus	14
3. Ensayos in-vitro	14
3.1 Descripción de la Técnica de inmersión de jeringas propiamente dicha	14
3.2 Formulación de soluciones de amitraz a emplear	15
3.3 Jeringas para inmersión de larvas	15
3.3.1 “Preparación” de jeringas	15
3.3.2 “Cargado” de las jeringas con larvas de garrapatas	15
3.3.3 “Inmersión” de larvas	16

4. Estudio de las variables “Formulación”, “Tiempo de exposición” y “Concentración”	16
Ensayo 1: Inmersión en amitraz puro.	16
Ensayo 2: Inmersión en amitraz comercial I	16
Ensayo 3: Inmersión en amitraz comercial II	17
Ensayo 4: Inmersión en amitraz comercial III	17
Ensayo 5: Inmersión de larvas resistentes a amitraz	17
5. Lectura de resultado	17
6. Interpretación de los resultados	17
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	18
Ensayo 1.	18
Ensayo 2.	19
Ensayo 3.	20
Ensayo 4.	22
Ensayo 5.	23
<b>CONCLUSIONES</b>	24
Comentarios y reflexiones a futuro	25
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	26

## LISTA DE CUADROS Y FIGURAS

Figura 1. (Neri, 1985). Comportamiento conceptual epidemiológico de *Rhipicephalus microplus* en Uruguay.

Figura 2. Jeringas, cortadas por el extremo donde se fija la aguja, con malla filtro sujeta mediante un trozo de manguera de gas.

Figura 3. Gradilla con jeringas cargadas prontas para incubar.

Tabla 1. Mortalidad de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente a prueba de inmersión en jeringas para Amitraz puro (97 % pureza).

Tabla 2. Mortalidad de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente a prueba de inmersión en jeringas para Amitraz comercial (12,5%).

Tabla 3. Mortalidad de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente a prueba de inmersión en jeringas para Amitraz comercial (12,5%). Concentraciones de 400 a 0,2 ppm.

Tabla 4. Mortalidad de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* frente a prueba de inmersión en jeringas para Amitraz comercial (12,5%). Concentraciones de 0,1 a 0,00002 ppm.

Tabla 5. Mortalidad de larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* cepa resistente ( DILAVE) frente a prueba de inmersión en jeringas para Amitraz comercial (12,5%).

## RESUMEN

En la presente tesis se llevó a cabo la validación del test de inmersión de larvas modificado en jeringa en el perfil de sensibilidad de *Rhipicephalus microplus* a base de amitraz. La validación se realizó utilizando como matriz larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (cepa Mozo, susceptible) de 14 a 21 días de vida. El ensayo se realizó empleando concentraciones de amitraz en el rango de 1000 a 0.00002 ppm, por triplicado (n = 50). La inmersión se realizó durante 20 segundos y la incubación fue de 48 horas a 27°C / 90% humedad. Se contabilizaron larvas vivas y muertas, dando por muertas aquellas que no manifestaban movimiento, calculando el porcentaje de mortalidad. Los porcentajes de mortalidad de los grupos control se mantuvieron por debajo del 10 %; en todas las concentraciones de amitraz incluidas en la tesis, el porcentaje de mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* se mantuvo por encima de 81.3%. Se repitió la técnica con larvas de garrapatas resistentes a amitraz cedidas por DILAVE. Los porcentajes de mortalidad se mantuvieron por encima del 95.8%. Se concluye que se lograron establecer los parámetros para la realización de la técnica de inmersión de larvas de *Rhipicephalus microplus* en jeringas para amitraz comercial y, la técnica de inmersión en jeringas para amitraz presenta un alto grado de sensibilidad lo que impide construir curvas de dosis-respuestas.

## SUMMARY

In the present thesis, the validation of the modified larval syringe immersion test on the sensitivity profile of *Rhipicephalus microplus* based on amitraz was carried out. The validation was performed using as matrix *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae (Mozo strain) of 14 to 21 days old. The test was performed using amitraz concentrations in the range of 1000 to 0.00002 ppm, by triplicate (n = 50). Immersion was performed for 20 seconds and incubation was of 48 hours at 27°C / 90% humidity. Live and dead larvae were counted, considering as dead those that did not show movement and calculating the mortality percentage. The base line mortality percentages remained below 10%; at all amitraz concentrations included in the thesis, the mortality percentage of *Rhipicephalus microplus* larvae remained above 81.3%. The technique was repeated with an amitraz-resistant tick larvae provided by DILAVE. Mortality percentages remained above 95.8%. It is concluded that the parameters for the immersion technique of *Rhipicephalus microplus* larvae in syringes for commercial amitraz were established and, the immersion technique in syringes for amitraz presents a high degree of sensitivity, which prevents the construction of dose-response curves.

## INTRODUCCIÓN

### Importancia global de la Garrapata

La ganadería bovina constituye una de las principales fuentes proteicas de origen animal de la alimentación en el mundo. Según el Departamento de Agricultura de EEUU, en el 2017, el 23,5% de la producción fue de origen bovino, superado por la producción porcina y aviar (IDB, 2017). Según Bustillos (2014) el 80% del ganado bovino del mundo se encuentra localizado en países tropicales y subtropicales en los que la garrapata es activa durante todo el año. El impacto económico por causa de este ectoparásito es difícil de cuantificar debido a las múltiples pérdidas ya sean directa e indirectamente ocasionadas por la gestión de control. Estimaciones en la industria ganadera de los EE.UU. revelan un ahorro de al menos 3000 millones de dólares anuales, luego que fuera declarado libre de garrapatas transmisora de babesia bovina. Por otro lado, las estimaciones globales muestran pérdidas de entre U\$S 13,9 y U\$S 18,7 billones anuales causadas por las garrapatas y enfermedades transmitidas (Ortiz, Prada y Villamil, 2016). Por esta misma razón, hay áreas donde la industria ganadera no se ha podido establecer debido a problemas ocasionados por las garrapatas y enfermedades asociadas (FAO, 1984). Estas garrapatas ocasionan pérdidas físicas directas, por ejemplo: menor tasa de ganancia de peso, aumento de mortalidad, menor producción láctea, deterioro de los cueros, costos por control (acaricidas, personal necesario para las labores, infraestructura de instalaciones). Dichos perjuicios impactan de manera directa e indirecta a la industria ganadera con resultados catastróficos; por ejemplo, estos parásitos son vectores de muchas patologías causadas por rickettsias, protozoarios, virus y bacterias (Bustillos, 2014).

En Europa, puntualmente en España, los géneros y especies de garrapatas predominantes según datos elaborados por el Centro de Coordinación de Alertas y Emergencias Sanitarias (CCAES), la Dirección General de Salud Pública, Calidad e Innovación y el Ministerio de Sanidad, Servicios Sociales e Igualdad; son *Hyalomma (H) marginatum*, encontrándose en aves, vacas, burros, zorros, jabalíes y liebres. Otra especie es la *H.lusitanicum*, dicha garrapata se restringe a regiones con una fuerte presencia de conejos de la cuenca mediterránea; sur de Portugal, sur de Italia, norte de Marruecos, Menorca y Sicilia. En el centro y suroeste de España, y más abundante aún en Extremadura y en la zona occidental de Andalucía. El destaque radica en que dichas garrapatas comparten sus hábitat y hospedadores, esta última, *H. lusitanicum*, ha sido detectada como portadora del virus causante de la Fiebre Hemorrágica Crimea-Congo (VFHCC). Dicha enfermedad es endémica en muchos países en todo el mundo. En materia de salud pública y sanidad animal sus efectos han generado múltiples perjuicios cada vez mayores. En la sexta Conferencia de la Comisión Regional de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE) para oriente medio, realizada en Jounieh (Líbano) en septiembre del 2001, se crea una red regional de vigilancia para las enfermedades transmitidas por las garrapatas y la investigación de estas enfermedades. Aproximadamente 10.000 personas anualmente contraen la enfermedad, con 2% de mortalidad y hasta un 58% de pacientes con secuelas neurológicas según datos relevados por la ONU (Suárez, et al., 2016).

Por otra parte, en América del Norte toma mayor relevancia la garrapata de patas negras o garrapata del venado (*Ixodes scapularis*). Este es uno de los vectores de la enfermedad de Lyme, infección causada por la bacteria *Borrelia burgdorferi*, la cual se manifiesta como una enfermedad similar a la influenza con eritema migratorio, provocando daño vascular y neurotropismo, lesionando la piel, nervios, corazón y articulaciones. El área de riesgo documentada ha aumentado desde su ubicación en el sur de Ontario a principio de la década de los 90 y con un constante aumento de casos, en parte favorecido por el avance de las garrapatas en el territorio a causa entre otras cosas del cambio climático. Hay dos especies de garrapatas involucradas las cuales parasitan al hombre y animales, ingresando al territorio mediante roedores, ciervos y aves migratorias desde el norte de Estados Unidos. Según algunos modelos

predictivos, los expertos demostraron que la garrapata aumenta su área hacia el norte en el orden de los 46 km por año estableciéndose en Manitoba al sur, Ontario, Nueva Brunswick y Nueva Escocia. (Schillberg, et al., 2018).

En la frontera entre Estados Unidos y México se efectúa un proyecto de franja fronteriza debido a que existe una fuerte presión del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos para el control del ganado en pie procedente de México, el cual debe ingresar al país libre de garrapatas del género *Rhipicephalus microplus*; para tal fin se creó un plan sanitario para los estados mexicanos limítrofes con el estado de Texas. La exportación representa a México una generación de divisas del orden de los 700 millones de dólares anuales (González y Hernández, 2012).

En la zona subtropical y tropical de América, la situación es bien diferente siendo que la garrapata es endémica. La especie *Rhipicephalus microplus* es el principal vector de patógenos como *Babesia bigemina*, *Babesia bovis*, *Anaplasma marginale*, entre otros (Bustillos, 2014). En el caso de México se han registrado en animales domésticos y silvestres 82 especies de garrapatas, siendo *Rhipicephalus microplus* la de mayor impacto en la ganadería por su amplia distribución, mayor impacto económico, problemas de resistencia y enfermedades transmitidas (Rodríguez-Vivas, Quiñones y Fagoso, 2005; Rodríguez-Vivas, et al., 2006 a/b). El género *Rhipicephalus* presenta 84 especies a nivel mundial, de las cuales 63 se encuentran distribuidas en áreas tropicales de África (Guglielmo, et al., 2014).

El problema para la salud pública y los sistemas productivos depende de su contexto en lo que refiere a las garrapatas y las enfermedades que estas transmiten. Según las regiones, las especies, los agentes transmisores, el número de la población de hospederos, la situación socioeconómica del área y avances tecnológicos sobre las medidas de control, hacen que la gravedad del problema tome diferente magnitud (Solís, 1991). En mayor medida, las principales pérdidas económicas generadas por estas garrapatas, son a causa de acciones para el control de las infestaciones de los bovinos, las cuales, predomina el uso de diferentes compuestos químicos, con grados de toxicidad diversos y con un alto costo económico. (Bustillos, 2014).

#### *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en la región

Los mecanismos empleados para el control y la prevención de las enfermedades parasitarias se basan tradicionalmente en su mayoría, en el uso de acaricidas o en sustitutos biológicos (hongos entomopatógenos, bacterias, nematodos entomopatógenos y hormigas reguladoras) para disminuir el problema. De todos modos, el uso indiscriminado por parte de los productores, vendedores de insumos y en cumplimiento de normas sanitarias, dejan ver un panorama preocupante en los indicadores de salud ambiental, en parte debido a que se están tomando acciones incorrectas (Rodríguez-Vivas, et al., 2014). Es en esta realidad, donde el concepto de “una sola salud”, descrito por Gibbs (2014), tiene un enfoque interdisciplinario, relacionando la salud, la ecología en el uso de la tierra y el agua, enfermedades infecciosas, parásitos, contaminantes ambientales, mantenimiento de la biodiversidad y las funciones que sostienen la vida de plantas, animales y seres humanos. Es que en este sin fin de variantes, las garrapatas y los agentes que estas transmiten, forman parte de un escenario complejo donde la mirada debería ser tratada desde el concepto de “una sola salud”.

En Bolivia, la ganadería bovina nacional, se concentra en los Departamentos de Beni y Santa Cruz. Los bovinos son la especie doméstica más importante para los habitantes del Departamento de Beni, proporcionando el sustento para más del 60% de las familias de esa región (Aguilera, 2004). Las principales patologías que afectan a estos bovinos son *Babesia* y *Anaplasma*, siendo uno de los vectores la garrapata del género *Rhipicephalus* (Romero, 2009). En un estudio anterior realizado sobre 45

predios lecheros en Cercado, (Beni) el 86,7% tenía infestación de garrapatas, las cuales el 97,6% eran de la especie *Rhipicephalus microplus* (Tapias y Vacas, 2013). La medida de control más empleada en rodeos pequeños es la extracción manual, mientras que las llevadas a cabo en grupos numerosos es usando compuestos química (Tapias, 2014).

*R. microplus*, en Argentina, genera un fuerte impacto sobre las explotaciones ganaderas y lecheras, particularmente en las zonas tropicales y subtropicales que se encuentran al norte de los paralelos 30º-31º S. En determinadas regiones de Argentina, particularmente donde las temperaturas mínimas menores a 15 grados solo ocurren una vez en el año y predomina un ambiente húmedo, son particularmente propicias para el desarrollo de las garrapatas. En estas regiones, donde los fenómenos ambientales propician el ciclo biológico de la garrapata, la actividad ganadera no puede ser realizada y menos ser rentable sin un estricto control sanitario (Nava, Mastropaola, Mangold, 2011).

La industria ganadera en Brasil es una de las más importantes, generando ingresos anuales de U\$S 4.5 mil millones por exportaciones de carne. Las enfermedades parasitarias pueden generar en la producción pecuaria importantes pérdidas. La especie *Rhipicephalus microplus* es una de las que generan mayores costos, desde el 2008 al 2012 se vio un crecimiento del 59,8% en ventas de productos parasiticidas. Por otra parte, este aumento del uso de parasiticidas determinó la presencia de poblaciones resistentes a todos las clases disponibles para su control. (Klafke, Teixeira, Reck y Martins, 2013).

#### *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay

En Uruguay, el género *R. microplus*, se estableció junto con la ganadería vacuna desde hace largo tiempo. Lahille (1905) la menciona para Fray Bentos, departamento de Río Negro. Wolffhügel (1916), la registra sobre bovinos, ovinos y equinos en 10 de los 19 departamentos. En 1910, esta especie es incluida en la ley 3606, Ley de Policía Sanitaria Animal, como un problema zoonosológico. Cassamagnaghi (1923) menciona al perro como hospedador de *B. microplus*, pero otros autores lo denominan al perro como hospedador ocasional. Vogelsang (1928) señala a *B. microplus* como la garrapata más común de nuestro país y agrega al venado (*Cervus campestris*)(*Ozoteceros bezoarticus uruguayensis*) como un nuevo hospedador a partir de un hallazgo en el departamento de Artigas. Miguel C. Rubino, entre 1920 y 1940 ejecutó diferentes pruebas con garrapatas en distintas especies domésticas y también con diferentes agentes transmisores. La primera ley sobre erradicación de la garrapata (ley 9965) fue aprobada en 1940 y su decreto reglamentario en 1941; el punto de partida al combate contra la garrapata (Venzal, Castro, Cabrera, de Souza y Guglielmone, 2003), llegando hasta nuestros días, Ley N 18268 de fecha 17/04/2008 Declaración de interés nacional lucha contra la garrapata común del bovino.

El género de garrapatas *R. microplus* está implicada en numerosas pérdidas económicas en la ganadería uruguaya, por lo que es causa de estudios constantes, así como los patógenos que transmiten a los bovinos. Son numerosos los estudios realizados en Uruguay en este tema (Nari (1979); Cardozo, Ari, Franchi, Lopez y Donatti, (1984) y Nari (1989)). Dichos trabajos son la base para un modelo epidemiológico creado para el control de *R. microplus*.

Los animales domésticos hospederos de *R. microplus* en Uruguay son: bovinos, equinos, ovinos, caninos y animales silvestres (venado de campo (*O. bezoarticus*)). El microclima incide sobre la supervivencia y reproducción de la garrapata, y esto influye en el género de garrapatas en la región. Otros factores como la altitud, existencia y cantidad de hospederos y los recursos y energía empleados por el hombre para lograr el control y/o erradicación sobre las poblaciones de garrapatas, participan en la localización. Distribuidos en todo el territorio nacional, exceptuando los departamentos ubicados al suroeste del territorio, que son considerados como zona libre; dentro de esta zona existen al menos 16 predios interdictos por presencia de garrapatas ( Miraballes, Riet-Correa, 2018); gracias a la prevención y estado

de lucha activa frente a las garrapatas, siendo así una especie residente en el país. Su impacto sanitario supone una cuantiosa pérdida económica, por causas directas, tratamientos y enfermedades asociadas (agentes transmisores: babesia bovis, babesia bigemina, anaplasma marginale; genera condiciones para la ocurrencia de miasis y puede ser puerta de entrada de microorganismos patógenos) (Venzal, et al., 2003).

### Ciclo de vida de Rhipicephalus (Boophilus) microplus

El ciclo de la garrapata común de los bovinos comprende a un solo hospedador y en el mismo transcurren todos los estadios de vida. Trabajos realizados por la División de Parasitología de la DILAVE- Miguel C. Rubino, han creado un modelo conceptual de la epidemiología de este parásito la cual puede ser dividida en tres generaciones: 1er generación (agosto a noviembre), 2da generación (noviembre a enero) y 3er generación (enero a junio), con variantes que dependen de las condiciones climáticas y ambientales de cada establecimiento (Figura 1). Es en la tercera generación cuando se presentan las poblaciones de garrapatas más numerosas, existiendo asociación entre los altos niveles de infestación por *R. microplus* y la ocurrencia de miasis por *Cochliomya hominivorax* (Reck, et al., 2014), lo que incrementa el nivel la afectación de los animales.

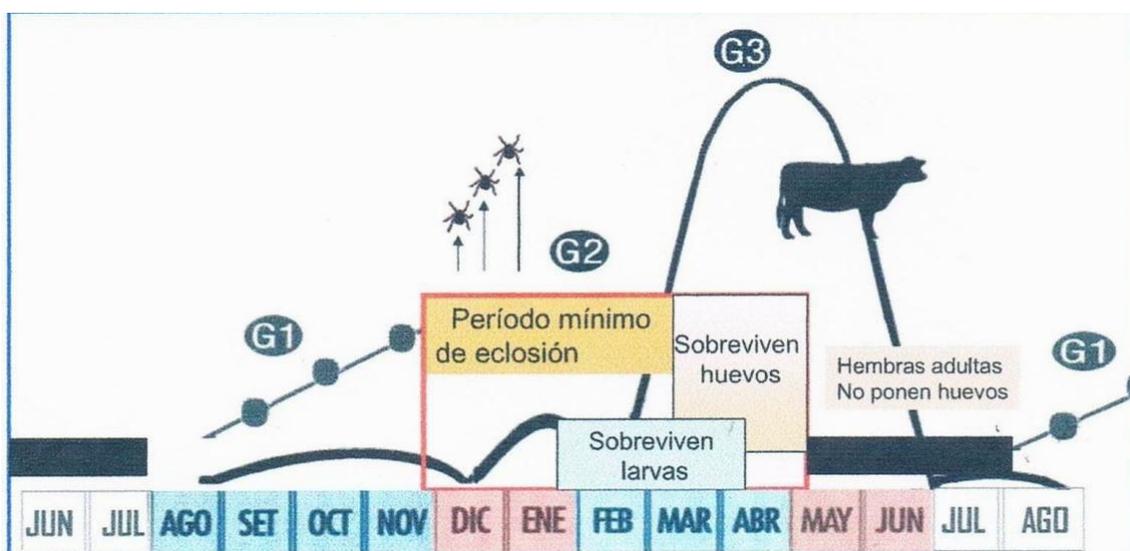


Figura 1, (Nari, 1985). Comportamiento conceptual epidemiológico de *Rhipicephalus microplus* en Uruguay.

Una hembra de *R. microplus* puede depositar cerca de 4400 huevos en su vida, con un periodo de preoviposición de 2 a 39 días, un periodo de oviposición de 4 a 44 días y un tiempo de eclosión de las larvas de entre 14 a 146 días. La supervivencia de las mismas sin alimentarse puede ser más de veinte semanas. El periodo que parasita al hospedador es de entre 14 a 52 días completando su ciclo (INIA, 2019). En Uruguay, según Cuore (2019) "dependiendo de la variabilidad biológica dada por las condiciones climáticas del factor año", "la duración del ciclo no parasitario alcanza un periodo superior al año".

### Mecanismo para el control de Rhipicephalus (Boophilus) microplus

Con un ciclo no parasitario extenso, la erradicación del parásito se torna una meta difícil de lograr y la selección para la resistencia que se ha generado por el uso reiterado de los fármacos ha contribuido a la creciente dificultad en el control y erradicación. Hay diferentes medios para llevar a cabo el control de la

garrapata común del bovino. Los ectoparasiticidas son los productos químicos más empleados por parte de los productores. La susceptibilidad por parte de estos parásitos a dichos fármacos cada vez es menor, generando un problema de resistencia a nivel mundial (Cuore, et al., 2012). La resistencia es la capacidad por parte de poblaciones de parásitos de soportar dosis de compuestos químicos que para la mayoría de la población normal de la misma especie serían letales (Cuore, 2006).

“El tratamiento Generacional de la Garrapata”, haciendo base en su comportamiento epidemiológico, implica el uso alterno y rotacional de las diferentes familias de acaricidas para cada generación de garrapatas. Conceptualmente el Tratamiento Generacional se basa en que dentro de una misma generación, las garrapatas que se encuentran sobre los bovinos, difieren temporalmente con su descendencia, la cual es responsable de formar la siguiente generación. Por lo tanto, la selección de genes resistentes que se ejerce con el uso de un mismo principio activo no debería aumentar si su uso se restringe exclusivamente al tiempo que transcurre para la evolución de una generación en condiciones de campo (Cuore, et al., 2009 a ; Cuore, Cicero, Trelles, Nari y Solari, 2009 b).

Existen seis familias distintas de acaricidas, integrados por: organofosforados, piretroides, fenilpirazoles, formamidinas, lactonas macrocíclicas y benzofenilureas. Así también existen combinaciones de dichos productos disponibles en el mercado. Desde 1978 el DILAVE ha diagnosticado resistencia a los acaricidas por las garrapatas comenzando por los organofosforados, luego los piretroides sintéticos y sus mezclas (Cuore y Solari, 2013). En el 2006 se diagnosticó resistencia frente a fipronil, en el 2009 frente a amitraz y en el 2010 sobre lactonas macrocíclicas. El primer diagnóstico de “poblaciones multirresistentes” fue en el 2009 (Cuore, et al., 2012). A partir del 2014 se empezaron a relevar con mayor frecuencia campos con garrapatas resistentes y para el 2015, en su primer semestre, se detectaron 4 diagnósticos en el Departamento de Artigas, de campos con “garrapatas multirresistentes” sobre todos los principios activos, exceptuando al fluazuron (Cuore y Solari, 2014). Por esta nueva realidad que afecta a la ganadería, es que de manera urgente, se reafirma la necesidad de establecer métodos para determinar la eficacia de estos productos acaricidas.

#### Amitraz como herramienta para control de *R. microplus*

El amitraz es una sustancia química de la familia de las formamidinas, agonista de la octopamina (octopaminérgico), principal neurotransmisor excitatorio de los invertebrados con actividad neuromuscular y posee una gran afinidad por su receptor. Indicado para ovino, bovinos y caninos. De uso tópico, con efecto garrapaticida, sarnicida y piojicida. Ocasiona hiperexcitación, parálisis espástica, desprendimiento y muerte, alterando el comportamiento del parásito. En mamíferos estimula receptores alfa2 adrenérgicos presinápticos, ocasionando una disminución de liberación de neurotransmisores. En general el amitraz cuenta con un margen de seguridad amplio, no existiendo un antídoto específico; en casos de intoxicación, el uso de yohimbina desplazaría el amitraz de los receptores alfa2 adrenergicos presinapticos, aunque hasta la fecha no hay datos concretos de su valor clínico (Botana, Landoni, Martín-Jiménez, 2002). Por tener una toxicidad mínima para humanos y animales, ser degradado rápidamente en el medio ambiente y no necesitar tiempo de espera para el sacrificio de los animales de producción, es que el amitraz es de elección en muchos casos (Jonsson y Hope, 2007). Por otra parte, en poblaciones de garrapatas resistentes a organofosforados y piretroides, ha sido usado como alternativa (Pereira y Labruna, 2008).

En lo que respecta a eficacia con el uso de amitraz, muchos trabajos han demostrado que se ha venido ejerciendo presión para la resistencia en cuanto a la existencia de poblaciones resistentes a distintas familias de compuestos químicos, las causas son diversas pero de continuar con las prácticas habituales esta problemática se seguirá agudizando. Bravo, Coronado y Henríquez (2008) en un estudio de eficacia in vitro de amitraz sobre poblaciones de *Rhipicephalus microplus* documentó que se redujo la eficiencia reproductiva de las poblaciones de *R. microplus*, las poblaciones seleccionadas manifestaron resistencia

al fármaco y el aumento de las concentraciones del amitraz sobre la dosis terapéutica no mejora significativamente los resultados de eficacia.

### Métodos para determinar la eficacia de compuestos químicos sobre Rhipicephalus (Boophilus) microplus

El responsable en Uruguay de validar la acción de un producto veterinario es el Laboratorio Oficial (Departamento de Parasitología, DILAVE “Miguel C. Rubino”, Montevideo). Para el diagnóstico de sensibilidad de las garrapatas a los acaricidas tenemos métodos *in vitro* y métodos *in vivo*.

El método *in vivo*; la prueba de establo (Wharton, Roulston, Utech y Kerr, 1970) se la considera una metodología definitiva y no de carácter orientativo. En nuestro país se utiliza la cepa de referencia Mozo, la cual presenta sensibilidad a todos los principios activos disponibles. No obstante, dentro de las principales dificultades que presenta se mencionan el hecho de que es una técnica muy costosa por las instalaciones requeridas y el mantenimiento de los animales como reactivo biológico. Las ventajas se mencionan por el potencial que tiene la evaluación para brindar información objetiva y comparable de la eficacia parasiticida y residualidad de los distintos ectoparasiticidas.

Las técnicas *in vitro* tienen algunas ventajas en cuanto a la celeridad de un resultado para la toma de decisiones. La realización de bioensayos en parásitos adultos como en larvas, nos lleva al diagnóstico presuntivo del perfil de resistencia desarrollado a campo (Cuore, 2013). La FAO recomienda diferentes técnicas *in vitro* como el Test de Inmersión de Adultos (AIT), Test de Paquete Larvario (LPT) y Test de Inmersión de Larvas (LIT). La razón de que existan diferentes técnicas radica en que ninguna es precisa para todas las circunstancias. Al seleccionar una técnica para diagnosticar resistencia frente a un acaricida concreto, se deberían satisfacer determinados requisitos: ser suficientemente sensible para detectar resistencia a pequeños cambios de concentración, ser simple y económica, brindar un resultado rápido y confiable, lograr una estandarización para ser practicado en cualquier laboratorio en diferentes países. Ninguna de las técnicas mencionadas previamente cumple con todos estos requisitos y la mejora en los protocolos es una tarea continua (FAO, 2004). El TIA, es una prueba de *screening*, por ser una técnica rápida, aunque sin una determinación de su especificidad y sensibilidad con relación a la resistencia frente a los diferentes acaricidas. Existen diferentes protocolos para estandarizar la técnica sugerida por diferentes autores. Su principal desventaja es el menor número de individuos que se someten a diferentes concentraciones. Por otra parte las técnicas que utilizan larvas aumentan el número de parásitos expuestos a cada concentración evaluada. Otro aspecto a resaltar, es que mediante una baja oferta parasitaria de campo, la técnica AIT no podría emplearse y las técnicas que utilizan larvas (LPT, LIT) si podrían ser llevadas a cabo.

La FAO destaca a la técnica de paquete de larvas (LPT) como prueba diagnóstica de resistencia para *R. microplus*, obteniendo resultados 6 semanas más tarde de extraída la muestra. Esta es una técnica con un grado de sensibilidad importante, aunque tiene desventajas en lo que refiere a la demora, tiempo de espera en tener los resultados y a errores que se puedan cometer en el momento de preparar los materiales falseando el resultado final. El protocolo estándar necesita de modificaciones al emplearlo sobre amitraz, lactonas macrocíclicas y no puede usarse con reguladores del crecimiento de ácaros como el fluazurón. Se utilizan larvas de garrapatas de 14 a 21 días de edad. El criterio de mortalidad de la técnica, es la incapacidad de las larvas para caminar. Si la mortalidad del grupo control es superior a 10% se considera defectuosa la técnica, su uso muestra que la mortalidad es cercana a cero normalmente (FAO, 2004). Para documentar el primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Rhipicephalus (B.) microplus* en México se empleó, entre otras, la técnica de paquetes de larvas sobre cepas susceptibles y cepa “San Alfonso” (Soberanes, Santamaria, Fragosos y Garcia, 2002).

La segunda técnica empleando larvas es el test de inmersión de larvas (LIT), también recomendada por la FAO, fue expuesto por Shaw (1966), como técnica para detectar posible resistencia frente a organofosforados sobre *R. microplus*. El empleo de un mayor número de ejemplares inmaduros, frente al uso de técnicas que requieran adultos, hacen que estadísticamente los resultados sean más consistentes. Comparando las dos técnicas antes mencionadas que emplean larvas, LPT y LIT, Klafke, et al., (2006), creó una prueba mediante la cual detectar resistencia en *R. microplus*. Los resultados de sus estudios manifestaron una capacidad de discriminar cepas resistentes y susceptibles, además de diferenciar poblaciones que responden de diversa manera a ivermectina empleando LIT (test de inmersión de larvas). Algunas de las ventajas de esta técnica es la reducción del uso de acaricida, mayor seguridad para los operarios y menor producción de residuos químicos. Numerosos investigadores han empleado esta técnica en los últimos años para el diagnóstico de resistencia frente a acaricidas (Mendes, Mendes y Sato, 2013). El LIT ofrece un mayor rendimiento para la detección de resistencia al fipronil que la técnica de LPT (Castro-Janer, et al, 2009).

Sindhu, Jonsson y Iqbal, (2012), planteó una modificación de la técnica de LIT en donde emplea jeringas buscando reducir la labor necesaria para realizar la técnica original, dando lugar al surgimiento del Test de Inmersión de larvas en Jeringas (SIT por su sigla en inglés), frente a la actividad acaricida de extractos de plantas. Esta técnica fue comparada frente al LIT original por parte de Farias, et al., (2016), concluyendo que el SIT propuesto por Sindhu, et al., (2012), presentó ventajas del tipo: a) reducción del tiempo de preparación de las jeringas; b) reducción del espacio físico necesario para almacenar las larvas durante la prueba; c) disminuye el riesgo de contaminación ambiental y del operador con las soluciones empleadas (debido a menor volumen y mejora en el proceso de secado); y d) reducción del volumen de solución empleada.

Diferentes investigadores han empleado distintos métodos para determinar la susceptibilidad de *R. microplus* frente al amitraz. Soberanes, et al., (2002) por ejemplo utiliza una formulación de amitraz comercial al 12,5% y empleando agua destilada genera diferentes concentraciones de su interés. Agrupa de a 100 larvas de 14 días de eclosión las cuales fueron sumergidas durante 10 minutos en una solución problema. Dejándolas en estufa a 27°C / 85-90 % de humedad relativa, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Transcurridas 72 horas de incubación, contabiliza el número de larvas vivas y muertas diferenciándolas por presencia o ausencia de movimientos. Por otra parte, Miller, Davey y George, (2002) utilizan amitraz al 12,5% de un producto comercial con el agregado de tricloroetileno y aceite de oliva. Toma 0,7 mL de cada concentración problema para impregnar un papel de nylon, dejándolo durante 2 horas en campana extractora para que se evapore el tricloroetano. Con esto forma un sobre y le agrega 100 larvas de 14 días de edad dejándolo en estufa a 27°C / 85- 90% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. A las 24 horas hace la lectura de vivas y muertas diferenciándolas por capacidad de desplazamiento. El tercer bioensayo, de White, et al., (2004) toma amitraz en un 98% de pureza y toma 97 µL de agua destilada y triton X-100 0,2%. Al amitraz lo diluye en DMSO para lograr diferentes concentraciones. Toma 150 larvas y las sumerge durante 30 minutos. Las deja en estufa a 27° C / 85-90% de humedad relativa, con un fotoperiodo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. A las 24 horas se realiza la lectura de vivas y muertas. En cada uno de los tres bioensayos se realizan 12 diferentes concentraciones las cuales son repetidas por triplicado ( Miller, Davey, White y George, 2007).

En lo que refiere a los resultados de las técnicas, Soberanes y Miller logran una curva de dosis-respuesta de 0 a 100% de mortalidad para cepas susceptibles y resistentes; por el contrario la técnica de White solo logra dichos resultados con cepas susceptibles. Al aumentar las concentraciones utilizando la técnica de White el amitraz precipita y no puede ser empleada. Por otra parte, todos los componentes de la técnica de White son conocidos, sin embargo las otras dos técnicas al emplear productos comerciales no se conocen todos sus componentes (esto permite evaluar productos sinérgicos). Con

respecto a los resultados, los datos obtenidos por la técnica de Miller presentaron una menor variación que los obtenidos por la técnica de Soberanes.

Sumado a los aspectos metodológicos de las técnicas, surge la interrogante de adecuar los tiempos de exposición en las pruebas *in vitro* a las prácticas habituales de inmersión en bovinos a campo, durante la realización de un baño de inmersión se estima que el tiempo de 10 y 20 segundos de inmersión es el habitual (observaciones *in situ*), en el pasaje del ganado por el baño.

Visto que las técnicas mencionadas anteriormente cuentan con algunas desventajas, así como generan ciertas interrogantes, el presente ensayo plantea evaluar una técnica alternativa para diagnosticar perfiles de sensibilidad en garrapatas (*Rhipicephalus microplus*).

## HIPÓTESIS

El test de inmersión de larvas en jeringa permite detectar la sensibilidad de *Rhipicephalus microplus* para Amitraz.

## OBJETIVO GENERAL

Implementar el Test de inmersión de larvas en jeringa como herramienta diagnóstica del perfil de sensibilidad acaricida a Amidinas en garrapatas del género *Rhipicephalus microplus*.

## OBJETIVO ESPECÍFICO

Puesta a punto de la Técnica de Inmersión de Larvas (Test de Inmersión en Jeringas) de garrapatas del género *Rhipicephalus microplus* (cepa Mozo) en condiciones de laboratorio. Modelo *in-vitro*.

Determinar si la técnica de inmersión en jeringa para larvas de garrapatas en Amitraz es discriminante entre una cepas sensibles y una resistentes en condiciones *in vitro*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Actividades específicas

Los estudios *in vitro* y la implementación de la técnica de inmersión se llevaron a cabo en el Laboratorio de Farmacología de la Unidad de Farmacología y Terapéutica del Departamento de Clínicas y Hospital Veterinario de la Facultad de Veterinaria, UDELAR, Uruguay.

### 2. Reactivo Biológico

#### 2.1 Larvas de garrapatas del género *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *Microplus*

Para los ensayos biológicos descritos en la presente tesis, se utilizaron larvas de *Rhipicephalus microplus* de la cepa susceptible de referencia Mozo (colaboración del Laboratorio de Parasitología, DILAVE Montevideo). Para la obtención de larvas de garrapatas del género *Rhipicephalus microplus* se incubaban teoginas caídas de animales artificialmente infectados con la cepa Mozo y siguiendo las especificaciones indicadas por Drummond, Ernest, Trevino, Gladney y Graham, 1973; FAO, 2005. Las garrapatas obtenidas se acondicionaron en cajas de Petri, previo registro de cantidad (n) y peso (g). Posteriormente se incubaron en estufa con condiciones de temperatura y humedad controladas (27 °C y 90 % de humedad relativa). A los 14 días de iniciada la incubación se retiraron las xenoginas, se registró el peso de las masas de huevos depositados y se obtuvo una alícuota (aproximadamente 100 huevos) para determinar el porcentaje de eclosión de la masa de huevos. Posteriormente, se continuó con un nuevo período de 25 días de incubación para que eclosionen las larvas. Una vez ocurrida la eclosión se esperó de 14 a 21 días para iniciar las pruebas con las larvas. Todas las larvas utilizadas en los siguientes ensayos se obtuvieron en iguales condiciones, lo cual permitió comparar diferentes poblaciones de larvas sincronizadas a un mismo momento de desarrollo en términos de vitalidad y tiempo de sobrevida.

### 3. Ensayos *in-vitro*

#### 3.1 Descripción de la Técnica de inmersión en jeringas propiamente dicha

La técnica consiste en la inmersión (durante un tiempo determinado) de jeringas cargadas con 50 larvas de *R. microplus* en diferentes concentraciones de una solución de amitraz. Pasado un tiempo (minutos) de incubación se contabiliza la cantidad (n) de larvas vivas y muertas, determinando el porcentaje de sobrevida y un gráfico de curva dosis- respuesta.

### 3.2 Formulación de soluciones de amitraz a emplear

Para la implementación de los ensayos *in-vitro* se utilizaron dos preparaciones en base a amitraz puro (Preparado 1) y amitraz comercial (Preparado 2), con el agregado de, agua destilada, triton X-100 y DMSO. En ambas preparaciones se incluye la concentración de 200 ppm dentro del rango de concentraciones, en vista que es el límite establecido por el MGAP.

Preparado 1: siguiendo los criterios de la técnica de White (2004), se prepara un vehículo acuoso formado por agua destilada y 0,2% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich, nº de lote: K47973303 846) que será utilizado como diluyente; en el cual se le van agregando diferentes cantidades de amitraz puro 97,00% (Lote nº 00231801) y DMSO como disolvente orgánico (Carlo Erba Reagents, nº de lote: P8G073238GATOS) para obtener una concentraciones de 200 ppm.

Preparado 2: siguiendo la técnica de Soberanes, et al., (2002), se parte de producto comercial de amitraz (amitraz 12,5%, Amitek, Blokhemia, Uruguay) al que se diluye en un volumen de agua destilada a una concentración de 1000 ppm y a partir de esta preparación se continúa haciendo diluciones seriadas (1:2) para conseguir el rango de concentraciones de 1000, 800, 400, 200, 100, 50, 25, 12,5, 6,25, 0,10, 0,050, 0,025, 0,012, 0,006, 0,003, 0,0015, 0,0002 y 0,00002 ppm.

### 3.3 Jeringas para inmersión de larvas

#### *3.3.1 "Preparación" de jeringas*

Se utilizaron jeringas de 2,5 mL a las cuales se les corta el pivote, se ajusta una malla filtro de 120  $\mu$ m y se realizan orificios a las jeringas que permiten la entrada de aire al momento de la inmersión (adaptado de la técnica descrita por Souza, et al., 2008) (Figura 1).



Figura 2. Jeringas, cortadas por el extremo donde se fija la aguja, con malla filtro sujeta mediante un trozo de manguera de gas.

#### *3.3.2 Cargado de las jeringas con larvas de garrapatas*

Las jeringas están conectadas a la bomba de vacío y mediante el agregado de tips se capturan únicamente las larvas viables (aquellas que demuestran movimiento en su recipiente de contención). Una vez cargadas las jeringas, se realizan los orificios y se coloca el émbolo tapandolos para evitar que las larvas escapen.

### 3.3.3 Inmersión de larvas

Las jeringas cargadas con larvas se someten a inmersión, realizando tres replicas por dilución y tiempos evaluados de amitraz. Pasado el tiempo de inmersión (10, 20, 30 segundos y 10, 20, 30 minutos) se retirarán las jeringas, se secan en papel de secado y se colocan en campana de flujo durante 1 hora previamente a la incubación en estufa por 24-72 horas. Las condiciones de incubado son las mismas a las establecidas para garrapatas adultas (27-28°C / 85-90 % humedad relativa).



Figura 3. Gradilla con jeringas cargadas prontas para incubar.

## 4. Estudio de las variables “Formulación”, “Tiempo de exposición” y “Concentración”

### Ensayo 1: Inmersión en amitraz puro.

Empleando el “Preparado 1”, se preparó una solución de amitraz a 200 ppm. Se cargaron 20 larvas por jeringa; posteriormente se probaron diferentes tiempos de inmersión (10, 20, 30 segundos y 10, 20, 30 minutos) con 24 horas de incubación (27°C / 90 % humedad relativa). Los tiempos empleados surgen de las diferentes técnicas mencionadas (Miller, et al., 2007) y de los diferentes tiempos sugeridos en instructivos de usos de antiparasitarios en plaza. Al mismo tiempo se incluyó un grupo control de larvas que fueron sumergidas en diluyente.

### Ensayo 2: Inmersión en amitraz comercial I

En este caso se utilizó el “Preparado 2”, manteniendo la concentración de amitraz en 200 ppm (concentración discriminatoria definida como el doble de concentración dosis letal 99,9% (Cuore, 2013), concentración establecida por el DILAVE para lograr una letalidad del 100% de garrapatas de *R. microplus* cepa mozo). Además se sumó una segunda concentración a 1000 ppm (con la intención de asegurarnos una concentración tal que mate el 100% de larvas, dato necesario para elaborar una curva de dosis respuesta); al mismo tiempo se incluyó un grupo control de larvas que fueron sumergidas en agua destilada. Los tiempos de inmersión siguieron siendo de 10, 20, 30 segundos y 10, 20, 30 minutos. En este caso se cambiaron los tiempos de

incubación a 24, 48 y 72 horas en base a los criterios de las diferentes técnicas realizadas por Soberanes, et al., (2002) y White, et al., (2004).

#### Ensayo 3: Inmersión en amitraz comercial II

Se partió del “Preparado 2” y se realizaron diluciones 2:1 partiendo de 400 ppm de amitraz. Se prepararon soluciones de 200, 100, 50, 25, 12,5 y 6,25 ppm; al mismo tiempo se incluyó un grupo control de larvas que fueron sumergidas en agua destilada. Se plantearon las condiciones del ensayo como: 20 segundos de inmersión y 48 horas de incubación. Se repite el trabajo al día siguiente para curvas dosis-respuesta. La construcción de curvas dosis-respuesta requiere de fijar 3 parámetros: límite inferior de efecto (mortalidad adjudicada al diluyente de la técnica), dosis letal 50 (DL50, dosis o concentración en la cual se obtiene el 50 % del efecto máximo) y efecto máximo (E<sub>max</sub>, 100 % del efecto). Luego se realizó de igual modo pero con concentraciones de amitraz de 3,12, 1,56, 0,78, 0,39 y 0,20 ppm.

#### Ensayo 4: Inmersión en amitraz comercial III

Se partió del “Preparado 2” con un tiempo de inmersión de 20 segundos y un tiempo de lectura de 48 horas. Las concentraciones empleadas fueron de 0,1, 0,05, 0,025, 0,012, 0,006, 0,003, 0,0015 ppm y su correspondiente grupo control. Posteriormente se realizó de la misma manera (“Preparado 2”, 20 segundos de inmersión y 48 horas para lectura de resultados) pero con una concentración de amitraz de 0,0002 y 0,00002 ppm.

#### Ensayo 5: Inmersión de larvas resistentes a amitraz

Con el objetivo de convalidar los resultados, frente a una cepa resistente. El ensayo 5 se implementó con larvas de poblaciones resistentes a amitraz obtenidas en iguales condiciones que la cepa Mozo y que fueron cedidas por el Laboratorio de Parasitología de DILAVE. Utilizando el “Preparado 2” y las condiciones establecidas en 20 segundos de inmersión y 48 horas de incubación, las larvas fueron sometidas a concentraciones de amitraz de 800, 400, 200, 100 y 50 ppm. De la misma manera se sometieron larvas de cepa Moza a 200 ppm y un grupo control de cada cepa para contrarrestar los resultados.

### **5. Lectura de resultado**

El tiempo transcurrido para la lectura de los resultados fue de 24, 48 y 72 horas después de la inmersión de las jeringas. Transcurridos el tiempo de incubación, se retiran las jeringas con larvas de la estufa de cultivo y se realiza el recuento de larvas vivas y muertas individualmente para cada jeringa en particular. El criterio para dar por muerta a las larvas es la ausencia del movimiento.

### **6. Interpretación de los resultados**

El producto del procesamiento de datos será presentado mediante estadística descriptiva y el cálculo del porcentaje de mortalidad. La fórmula que se aplica para el cálculo de mortalidad considera el número de larvas dadas por muertas sobre el total de larvas por cien.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Ensayo 1.

Los resultados se muestran en la Tabla 1. Se comenzó empleando esta técnica (amitraz 97% pureza) ya que es la única en que todos sus componentes son conocidos, es la técnica más adecuada para el estudio sobre resistencia frente al amitraz y posibles sinergistas (Miller, et al., 2007). Comparando diferentes tiempos de inmersión a una concentración de amitraz constante (200 ppm) se obtuvieron rangos de mortalidad entre 45,3 y 72,1 %.

Sindhu, et al.,(2012) indica que para pruebas in-vitro de eficacia acaricida, la mortalidad en el control (diluyente) no debe superar el 5%, (en su trabajo osciló entre un 0 y 1 % de mortalidad). En nuestro ensayo la mortalidad generada por el diluyente se ubicó entre un 14,3% y 28,3% muy por encima de lo aceptado (en los trabajos realizados por White, et al.,(2004) los solventes orgánicos empleados alcanzaron menos del 2% de mortalidad y el estudio de alternativas de estos solventes llegó al 100% de mortalidad), por lo que decidimos descartar esta técnica.

**Tabla 1. Mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* frente a prueba de inmersión en jeringas para Amitraz puro (97 % pureza)**

Tiempo de inmersión	Diluyente		Amitraz (200 ppm)	
	n	Mortalidad (%)	n	Mortalidad (%)
10 seg	2	28,2	2	63,4
20 seg	2	14,3	2	64,8
30 seg	2	19,9	2	72,1
10 min	3	15,2	3	55,5
20 min	3	28,3	3	45,3
30 min	3	21,5	3	58,9

Mortalidad (%): (número de larvas muertas / número de larvas totales) x 100  
n: número de repeticiones

## Ensayo 2.

Los resultados se muestran en la Tabla 2. En el siguiente ensayo quedó manifiesto que a una concentración de 1000 ppm, independientemente del tiempo de inmersión se lograron porcentajes de mortalidad cercanos al 100 % (con un tiempo de incubación de 48 horas se alcanzó entre un 98,6 y 100% de mortalidad, independientemente del tiempo de inmersión). En concentraciones de 200 ppm se obtuvieron diferentes resultados dependiendo del tiempo de incubación.

En relación al tiempo de inmersión no se vieron cambios, siempre que se mantenga el tiempo de incubación. Según White, et al.,(2004); no difiere entre 10 a 60 minutos de inmersión, pero si aumenta la mortalidad de larvas en diluyente con tiempos cercanos a los 60 minutos. Basándonos en las recomendaciones del producto comercial utilizado, la cual sugiere 20 segundos de inmersión y de SENASA (Servicio nacional de sanidad y calidad agroalimentaria, Argentina)(2014) que recomienda un tiempo de contacto con la solución de 10 segundos el cual es fundamental para la eficacia del baño, se obtienen porcentajes de mortalidad similares en comparación con los diferentes tiempos de inmersión incluidos en el ensayo (White y Miller hacen lectura a las 24 horas y Soberanes a las 72 horas (Miller, et al., 2007).

Tomando como criterio la ausencia de movimiento de larvas para dar por muerta las mismas, según los resultados obtenidos y viendo que no hay diferencias sustanciales entre las lecturas con un tiempo de incubación de 48 y de 72 horas en todas las concentraciones, se procede a definir las 48 horas como tiempo de incubación. De esta manera se cumplen las recomendaciones de algunos autores, FAO (2004), se mantienen los mismos resultados y se optimiza el tiempo de trabajo.

**Tabla 2. Mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* frente a prueba de inmersión en jeringas para Amitraz comercial (12,5%) para 200 y 1000 ppm**

Tiempo incubación (h)	Tiempo inmersión	Diluyente		Amitraz (200 ppm)		Amitraz (1000 ppm)	
		n	Mortalidad (%)	n	Mortalidad (%)	n	Mortalidad (%)
24	20 seg	3	1,3	3	24,3	3	52,9
	10 min	3	0,6	3	29,8	3	77,6
	20 min	3	0	3	38,5	3	72,5
48	20 seg	3	2,6	3	97,3	3	98,6
	10 min	3	8	3	91,3	3	99,3
	20 min	3	6,6	3	100	3	100
72	20 seg	3	16	3	100		

10 min	3	4,6	3	100
20 min	3	14,6	3	100

---

**Mortalidad (%): (número de larvas muertas / número de larvas totales) x 100**  
**n: número de repeticiones**

### Ensayo 3.

Los resultados se muestran en la Tabla 3. Se prepararon diferentes concentraciones, tomando como base las concentraciones utilizadas por DILAVE antes mencionadas y en busca de obtener puntos críticos de dosis respuestas para generar una gráfica sigmoidea para amitraz sobre larvas de *R. microplus*. Se realizó la técnica por duplicado. Los resultados obtenidos fueron diferentes a los expuestos por White, et al.,(2004), con una LC50 (concentración letal 50) de 0,5 ppm para la cepa Muñoz (cepa susceptible), a los de Miller, et al.,(2002), con una LC50 de 32 ppm para la cepa Gonzalez (cepa susceptible) y a los de Soberanes, et al.,(2002), con una LC50 de 1 ppm para la cepa Muñoz (cepa susceptible). Las diferencias en los porcentajes de mortalidad obtenidos por los autores antes mencionados dejan en claro que las larvas de *R. microplus* presentan diferentes grados de sensibilidad cuando se realizan cambios en la metodología de trabajo.

Al realizar la inmersión de larvas en jeringas, partiendo de 400 ppm y llegando hasta 0,20 ppm, obtuvimos mortalidades entre 84 y 100 %; mientras que las larvas que fueron expuestas a diluyente mostraron mortalidades de entre 7,3 y 8,6 %. Si bien la mortalidad para el grupo control se ubicó por encima del 5 % planteado como límite por Sindhu, et al.,(2012) para pruebas in-vitro con acaricidas, fue tomado como aceptable, siendo que no superó el 10 % en ninguna de las réplicas (criterio aceptado por la FAO, 2004). Sin embargo, los elevados porcentajes de mortalidad obtenidos para los diferentes niveles de concentración de amitraz indican una elevada sensibilidad por parte de las larvas de *R. microplus*, por lo que se planteó la necesidad de continuar bajando las concentraciones, buscando construir la curva de dosis-respuesta.

**Tabla 3. Mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* frente a prueba de inmersión en jeringas para Amitraz comercial (12,5%). Concentraciones de 400 a 0,2 ppm.**

Día	Concentración (ppm)	n	Mortalidad (%)
1	400	3	100
	200	3	98,1
	100	3	94,6

	50	3	92
	25	3	92,6
	12,5	3	90,6
	6,25	3	89,9
	0	3	8,6
<hr/>			
2	400	3	98,6
	200	3	94
	100	3	94
	50	3	94,6
	25	3	91,3
	12,5	3	84
	6,25	3	92
	0	3	7,3
<hr/>			
3	3,12	3	95
	1,56	3	93
	0,78	3	94
	0,39	3	96
	0,20	3	95
	0	3	7,3

Mortalidad (%): (número de larvas muertas / número de larvas totales) x 100

n: número de repeticiones  
Tiempo de inmersión y tiempo de incubación fijos

#### Ensayo 4.

Los resultados se muestran en la Tabla 4. Se continuó con la construcción de curvas dosis-respuesta para amitraz con larvas de *R. microplus*. Se prepararon concentraciones de 0,1, 0,05, 0,025, 0,012, 0,006, 0,003, 0,0015, 0,0002 y 0,00002 ppm, muy inferiores a las empleadas en el ensayo anterior y en los trabajos comparados. Se obtuvieron mortalidades entre un 81,3 y 98,6 %, independientemente del nivel de concentración analizado. El nivel más bajo de concentración de amitraz utilizado en este ensayo (0,00002 ppm) logró una mortalidad del 89,8 %. Estos resultados de mortalidad para amitraz siguen siendo muy elevados, impidiendo la construcción de curvas dosis-respuesta.

**Tabla 4. Mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* frente a prueba de inmersión en jeringas para Amitraz comercial (12,5%). Concentraciones de 0,1 a 0,00002 ppm.**

Concentración (ppm)	n	Mortalidad (%)
0,1	3	96
0,05	3	97,3
0,025	3	97,3
0,012	3	98,6
0,006	3	96,1
0,003	3	81,3
0,0015	3	84,6
0	3	12,6
<hr/>		
Concentración	n	Mortalidad (%)
0,0002	3	94
0,00002	3	89,8

Mortalidad (%): (número de larvas muertas / número de larvas totales) x 100  
n: número de repeticiones

#### Tiempo de inmersión y tiempo de incubación fijos

Por obtener porcentajes de mortalidad superiores al 80% independientemente de las continuas diluciones de amitraz, surgió la necesidad de diferenciar si dichos resultados fueron a causa de que la cepa Mozo empleada fue muy sensible a dicho compuesto, o es la técnica la causante de los datos encontrados.

#### Ensayo 5.

En este último ensayo, partimos de larvas obtenidas de garrapatas comprobadas como resistente a amitraz por la DILAVE (comunicación personal del Dr. Cuore). Se sometieron a diferentes concentraciones de un producto comercial en base a amitraz. En el mismo ensayo se sumó un grupo control, con larvas que se sumergieron en diluyente (agua destilada) y un segundo grupo, utilizando larvas de cepa Mozo, para comparar resultados. Los resultados de mortalidad para este ensayo se muestran en la Tabla 5.

**Tabla 5. Mortalidad de larvas de *Rhipicephalus microplus* cepa resistente ( DILAVE) frente a prueba de inmersión en jeringas para Amitraz comercial (12,5%).**

	Concentración (ppm)	n	Mortalidad (%)
Cepa resis.	800	3	100
	400	3	100
	200	9	100
	100	3	96,6
	50	3	95,8
	0	3	10
Cepa Mozo	200	3	100
	0	3	10

Mortalidad (%): (número de larvas muertas / número de larvas totales) x 100

n: número de repeticiones

Cepa resis. = Cepa resistente a Amitraz (DILAVE)

Tiempo de inmersión y tiempo de incubación fijos

El porcentaje de mortalidad obtenido con la técnica de inmersión en jeringas para larvas de *R. microplus* de la población resistente fue de 95,8% a la menor concentración de amitraz incluida (50 ppm), con grados de mortalidad similares a los resultados obtenidos en los ensayos anteriores (ensayo 3) para la cepa Mozo. Esto indica que, independientemente de la resistencia de la cepa frente a la molécula, la técnica de inmersión en jeringas presenta una sensibilidad menor para larvas de *R. microplus*, impidiendo discriminar la presencia de cepas resistentes a las concentraciones estudiadas en la presente tesis.

Comparando las LC50 de los trabajos antes mencionados entre sus cepas susceptibles y resistentes, partiendo de Soberanes, et al.,(2002) con una LC50 de 1 ppm en cepa Muñoz y una LC50 de 4,4 ppm en cepa San Alfonso (cepa resistente), marcando un índice de resistencia de 41,9; por otra parte Miller, et al.,(2002) con una LC50 de 32 ppm en cepa Gonzalez y una LC50 de 930 ppm en cepa Santa Luiza (cepa resistente). Deja en claro que hay un aumento de la concentración del garrapaticida sobre la cepa resistente para alcanzar una misma letalidad.

La FAO (2004) no ha promovido los bioensayos de LIT, los estudios comparativos dan cuenta que los resultados son similares con LPT, estos recomiendan que para algunos compuestos, como amitraz, el tiempo de incubación debe extenderse a 48 horas. Otros autores como White, et al.,(2004) establecen el tiempo de lectura a las 24 horas de incubación y por otra parte Soberanes, et al.,(2002) lo establece a las 72 horas.

Con el criterio empleado para dar por muertas las larvas pasa lo mismo, dependiendo de los autores hay diferentes recomendaciones. FAO (2004) recomienda que las larvas con incapacidad para desplazarse se consideran muertas y solo las que sí se desplazan se dan por vivas, para esto recomienda el uso de lupa y lámparas, y se pueden estimular respirando suavemente sobre ellas. Con el mismo criterio Miller, et al.,(2002), Sindhu, et al.,(2012) y Mendes, et al.,(2013) dan por muertas o vivas las larvas. Por otra parte Soberanes, et al.,(2002) y Farias, et al.,(2016) dan por muertas aquellas larvas que no presentan ningún movimiento. Dependiendo del principio activo que se emplee, Miller, et al.,(2002) discrimina que usando piretroides y organofosforados muchas de las larvas se ven desecadas pero con el amitraz no pasa lo mismo siendo más difícil de determinar. Por todas estas razones es que el criterio empleado es la ausencia de movimiento para dar por muerta.

Algunos autores modifican la disponibilidad del amitraz (uso de tela de nylon) y mejoran los resultados. También es de destacar que las CL50 son menores en el empleo de LIT que de LPT probablemente debido a la misma causa de disponibilidad del amitraz. La LIT en micropipeta y en jeringa si bien no está aprobada por la FAO funciona para otros compuestos acaricidas.

En vista a los resultados obtenidos, no es factible la construcción de un Modelo dosis-respuesta. Con ninguna de las concentraciones empleadas se alcanzó lograr porcentajes de mortalidad que permitan la construcción de un modelo teórico que represente la respuesta farmacológica al principio activo, ni siquiera con el empleo de larvas que fueron diagnosticadas previamente como resistentes, den pie para realizar dicho modelo, así como el empleo de diferentes cepas no diferencian tales resultados de mortalidad.

## CONCLUSIONES

Como parte de la técnica propiamente, el empleo de amitraz comercial, al utilizar agua destilada, logra una estabilidad y una mortalidad del grupo control que permitió realizar dicha prueba. Viendo los distintos resultados obtenidos, se puede especificar que para el uso de amitraz se podrían emplear varios tiempos de inmersión, siempre recomendado el menor

tiempo y la lectura debe realizarse a las 48 horas. Dando por muertas a las que manifiestan ausencia de movimiento.

### **Comentarios y reflexiones a futuro**

La presente tesis fundamenta los inicios en el estudio de técnicas in-vitro alternativas para la determinación de resistencia en larvas de garrapatas. Otras variables en la técnica podrían ser exploradas tales como el incremento en el número de larvas empleadas en cada prueba o la modificación en el volumen de inmersión.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aguilera, R. (2004). *La ganadería beniana en cifras*. Trinidad: FEGABENI.
- Banco Interamericano de Desarrollo.(2017). *La producción mundial de carnes: la transición nutricional y el protagonismo de los emergentes*. Recuperado de <https://conexionintal.iadb.org/2017/06/02/la-produccion-mundial-carnes-la-transicion-nutricional-protagonismo-los-emergentes/>
- Botana, L.M., Landoni, M.F., y Martín-Jiménez, T. (2002). Antiparasitarios externos. En *Farmacología y Terapéutica Veterinaria* (pp. 512-513). Madrid: McGRAW-HILL. INTERAMERICANA.
- 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), 35-40
- Bustillos RC (2014). *Ecología parasitaria de la garrapata (acarí: ixodidae) en bovinos en dos áreas geográficas del Ecuador*. Quito: UCE.
- Cardozo, H., Ari, A., Franchi, M., Lopez, A., y Donatti, N. (1984). Estudios sobre la ecología del *Boophilus microplus* en tres áreas enzoótica del Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 20(86-87), 4-10.
- Cassamagnaghi, A. (1923). El perro como vector del *Boophilus microplus*. *Revista de la Asociación Rural Uruguay*, 52: 59-61.
- Castro-Janer, E., Rifran, L., Piaggio, J., Gil, A., Miller, R.J., y Schumaker, T.T.S. (2009). In vitro tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari:Ixodidae) and their standardization. *Veterinary Parasitology*, 162, 120–128.
- Cuore, U., Solari, M.A., Cicero, L., Trelles, A., Gayo, V., Nari, A. (2009 a). Evaluación de los garrapaticidas actualmente disponibles en Uruguay para su utilización en los despachos de tropa. *Veterinaria (Montevideo)*, 45 (173-176), 23-30.
- Cuore, U., Cicero, L., Trelles, A., Nari, A., y Solari, M.A. (2009 b). *Tratamiento generacional de la garrapata*. Recuperado de <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Dilave.htm>
- Cuore, U., Altuna, M., Cicero, L., Fernández, F., Luengo, L., Mendoza, R., Trelles, A. (2012). Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 48(187), 5-13.

- Cuore, U. (2006). Resistencia a los acaricidas, manejo y perspectivas. En Centro Médico Veterinario de Paysandú (Ed.), *Jornadas Uruguayas de Buiatría*. 34 (pp. 30-35). Paysandú, Centro Médico Veterinario de Paysandú.
- Cuore, U. (2013). *Determinación de eficacia de productos garrapaticidas. Prueba de Establo*. Recuperado de <http://www.mgap.gub.uy/gxpfiles/mgap/content/audio/source000000014/AUD0000070000002747.pdf>
- Cuore, U., Solari, M.A. (2013). Poblaciones multirresistentes de garrapatas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. *Veterinaria (Uruguay)*, 50(193), 4-13.
- Cuore, U., y Solari, M.A. (2014). Poblaciones multirresistentes de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 50 (193), 4-14.
- Cuore, U., et al. (2019). CONTROL SUSTENTABLE DE PARÁSITOS EN CONDICIONES DE SILVOPASTOREO CON ÉNFASIS EN GARRAPATA RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS Y HEMOPARÁSITOS. Serie FPTA-INIA 80.
- Drummond, R., Ernest, S., Trevino, J., Gladney, W., y Graham, O. (1973). *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory test of insecticides. *Journal of Economic Entomology*, 66, 130-133.
- FAO. (1984). *Ticks and tick-borne diseases*. Roma, FAO.
- FAO. (2003). *Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina*. Recuperado de <http://www.fao.org/3/a-y4813s.pdf>
- FAO. (2004). *Module 1. ticks: acaricide resistance: diagnosis, management and prevention*. Recuperado de <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/010/ag014e/ag014e05.pdf>
- Farias, J.A., Gulias Gomes, C.C., Minho, A.P., Domingues, R., Macke Franck, B., Leitzke Granada R., y Pereira de Souza, A. (2016). Comparison of three Larval Immersion Tests in Syringe to evaluate acaricidal activity of chemical solutions. *Ciências Agrárias*, 37(5), 3205-3208.
- GIBBS, E.P.J. (2014). The evolution of One Health: a decade of progress and challenges for the future. *Veterinary Record*, 174, 85-91.
- González, J.R., y Hernández R (2012). *Boophilus microplus*: estado actual de la resistencia a los acaricidas en la frontera México Estados Unidos y su impacto en la relación comercial. *Revista Mexicana de Ciencia Pecuarias*, 3(supl. 1), 1-8.
- Guglielmone, A.A., Robbins, R.G., Apanaskevich, D.A., Petney, T.N., Estrada-Peña, A., y Horak, I.G. (2014). *The Hard Ticks of the World (Acari: Ixodida: Ixodidae)*. Dordrecht: Springer.

- INIA (2019). Proyecto FPTA 338. Control sustentable de parásitos en condiciones de silvopastoreo con énfasis en garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y hemoparásitos. Disponible en: <https://www.gub.uy/ministerio-ganaderia-agricultura-pesca/comunicacion/publicaciones/control-sustentable-parasitos-condiciones-silvopastoreo-enfasis>
- Jonsson, N.N., y Hope, M. (2007). Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 146, 193–198.
- Klafke, G.M., Sabatini, G.A., de Albuquerque, T.A., Martins, J.R., Kemp, D.H., Miller, R.J., y Schumaker, T.T. (2006). Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Veterinary Parasitology*, 142(3-4), 386–390.
- Klafke, G.M., Teixeira, T., Reck, J., y Martins, J.R. (2013). La multiresistencia a los acaricidas y el control integral de garrapatas en Brasil. En *III Simposio Internacional de Resistencia a los pesticidas en artrópodos*, Ixtapa, México. Recuperado de [https://www.researchgate.net/publication/328583371\\_La\\_multiresistencia\\_a\\_los\\_acaricidas\\_y\\_el\\_control\\_integral\\_de\\_garrapatas\\_en\\_Brasil\\_Multiresistance\\_to\\_acaricides\\_and\\_the\\_integrated\\_control\\_of\\_cattle\\_ticks\\_in\\_Brazil/link/5bd766c592851c6b27972cc0/download](https://www.researchgate.net/publication/328583371_La_multiresistencia_a_los_acaricidas_y_el_control_integral_de_garrapatas_en_Brasil_Multiresistance_to_acaricides_and_the_integrated_control_of_cattle_ticks_in_Brazil/link/5bd766c592851c6b27972cc0/download)
- Lahille, F. (1905). Contribution a l' tude de Ixodides de la publique Argentine. *Anales del Ministerio y Agricultura*, 2, 7-166.
- Mendes, E.C., Mendes, M.C., y Sato, M.E. (2013). Diagnosis of amitraz resistance in Brazilian populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) with larval immersion test. *Experimental and Applied Acarology*, 61, 357–369.
- Miller, R.J., Davey, R.B., y George, J.E. (2002). Modification of the food and agriculture organization larval packet test to measure amitraz-susceptibility against Ixodidae. *Journal of Medical Entomology*, 39, 645-651.
- Miller, R.J., Davey, R.B., White, W.H., y George, J.E. (2007). A Comparison of Three Bioassay Techniques to Determine Amitraz Susceptibility in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) *Journal of Medical Entomology*, 44(2), 283-294.
- Miraballes C, Riet-Correa F. (2018). A review of the history of research and control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, babesiosis and anaplasmosis in Uruguay.
- Nari, A, (1989). Ecología y control de garrapatas en Uruguay. The Eradication of Ticks. *Proceeding of th Expert Consulation on the Eradication of Ticks with Special Reference to Latin America*, 75: 265-276.

- Nari, J. (1979). Estudio preliminar sobre ecología de del *Boophilus microplus* en Uruguay. Ciclo no parasitario en un área considerada poco apta para su desarrollo. *Veterinaria* (Montevideo), 15, 25-31.
- Nava, S., Mastropaola, M., y Mangold, A.J. (2011). Guía para el control de los parásitos externos en bovinos de carne del área central de la Argentina. Recuperado de [https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-ficha-5\\_16-03.pdf](https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-ficha-5_16-03.pdf)
- Ortiz, E.B., Prada, J.R., y Villamil, L.C. (2016). *Las garrapatas de ganado bovino y los agentes de enfermedad que transmiten en escenarios epidemiológicos de cambio climático*. San José: IICA.
- Pereira, M.C., y Labruna, M.B. (2008). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. En M.C. Pereira, M.B. Labruna, M.P.J. Szabo, G.M. Klafke (Eds). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus: biología, controle e resistência* (pp 15–53). São Paulo: MedVet.
- Reck J, Klafke GM, Webster A Dall’Agnol B, Scheffer R, Souza UA, Corassini VB, Vargas R, Santos JS, Martins JR (2014). First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Veterinary Parasitology*, 201, 128-136.
- RStudio Team (2020). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Rosado-Aguilar, J.A., Ojeda-Chi, M.M., Pérez-Cogollo, L.C., Trinidad-Martínez, I., y Bolio-González, M.E. (2014). Control integrado de garrapatas en la ganadería bovina. *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 1(3), 295-308.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Quiñones, A.F., y Frago, S.H. (2005). Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En *Enfermedades de importancia económica en producción animal* (pp. 571-592). México, McGraw-Hill.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Alonso-Díaz, M.A., Rodríguez-Arévalo, F., Frago-Sánchez, H., Santamaría, V.M., y Rosario-Cruz, R. (2006a). Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Veterinary Parasitology*, 136, 335-342.
- Rodríguez-Vivas, R.I., Rodríguez-Arevalo, F., y Alonso-Díaz, M.A., Frago-Sánchez, H., Santamaría, V.M., y Rosario-Cruz, R. (2006b). Amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms from the state of Yucatan, Mexico: Potential risk factors. *Preventive Veterinary Medicine*, 75, 280-286.
- Romero, J.R. (2009). *Parasitología y Enfermedades Parasitarias*. La Plata, Universidad Nacional de La Plata.
- Schillberg, E., Lunny, D., Lindsey, L.R., Nelder, M.P., Mackie, M., Coats, D., ... Young Hoon, K.N. (2018). Distribución de *Ixodes scapularis* en el noroeste de Ontario: resultados de

- las actividades de vigilancia activas y pasivas en el área de captación de la unidad de salud del noroeste. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15:22-25.
- SENASA. (2014). *Estructura y gestión integral de bañaderos*. Recuperado de [http://nuevaweb.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL\\_SENASA/ANIMAL/BOVINOS\\_BUBALINOS/PROD\\_PRIMARIA/SANIDAD/ENF\\_Y ESTRAT/GARRAPATA/file7789-9-manejo\\_integral\\_baniaderos\\_garrapaticidas\\_23oct2014.pdf](http://nuevaweb.senasa.gob.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/ANIMAL/BOVINOS_BUBALINOS/PROD_PRIMARIA/SANIDAD/ENF_Y ESTRAT/GARRAPATA/file7789-9-manejo_integral_baniaderos_garrapaticidas_23oct2014.pdf)
- Shaw, R. D. (1966). Culture of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. *Bulletin of Entomological Research*, 56, 389-405.
- Sindhu, Z.U., Jonsson, N.N., y Iqbal, Z. (2012). Syringe test (modified larval immersion test): a new bioassay for testing acaricidal activity of plant extracts against *Rhipicephalus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 188(3-4), 362-7.
- Soberanes, N., Santamaria, M., Fragoso, H., y Garcia, Z. (2002). Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México (First case reported of Amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus* in Mexico). *Técnica pecuaria en México*, 40, 81-92.
- Solís, S.S. (1991). Ecología de las Garrapatas *Boophilus*. Perspectivas de un Panorama. En *Memorias del II Seminario Internacional de Parasitología Animal. Garrapatas y enfermedades que transmiten* (pp:19-30). Oaxtepec, México.
- Suárez, B., Sierra, M.J., García, L., Palmera, R., Reques, L., Montero, L., ...Estrada-Peña, A. (2016). Informe de situación y evaluación del riesgo de transmisión de fiebre hemorrágica de crimea-congo (FHCC) en España. Recuperado de [https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/ER\\_FHCC.pdf](https://www.mscbs.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/ER_FHCC.pdf)
- Souza, A.P., Veiga, L.P.H.N., Bellato, V., Sartor, A.A., Cardoso, C.P., y Nunes, A.P.O. (2008). Proposta para teste carrapaticida por imersão de larvas de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*: avaliação em cipermetrina e amitraz. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*, 17(4), 242-245.
- Tapias, V.M.C. (2014). Resistencia de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Canestrini, 1888) a garrapaticidas en bovinos de predios lecheros, provincia cercado, Beni, Bolivia 2011. *Revista Científica Agrociencias Amazonía*, 3, 36-43.

- Tapias, V.M.C., Vaca, R.J.L. (2013). Carga de ixodidos en bovinos de predios lecheros, Provincia Cercado, Beni, Bolivia, 2009. *Revista Científica Agrociencias Amazonia*, 1(2), 25-34.
- Venzal, J.M.I., Castro, O.I., Cabrera, P.A., de Souza, C.G., y Guglielmo, A.A. (2003). Las garrapatas de Uruguay: especies, hospedadores, distribución e importancia sanitaria. *Veterinaria (Montevideo)*, 38 (150-151), 17-28.
- Vogelsang, E. (1928). Garrapata (Ixodidae) del Uruguay. *Boletín del Instituto de Clínica Quirúrgica de la Universidad de Buenos Aires*, 4, 668-670.
- Warthon, R., Roulston, W., Utech, K., y Kerr, J. (1970). Assessment of the efficiency of acaricides and their mode of application against the cattle tick *Boophilus microplus*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 21, 985-1006.
- White, W.H., Plummer, P.R, Kemper, C.J, Miller, R.J., Davey, R.B., Kemp, D.H.,... Gutierrez, J.A. (2004). An in vitro larval immersion micro-assay for identifying and characterizing candidate acaricides. *Journal of Medical Entomology*, 41, 1034-1042.
- Wolffbugel, K. (1916). Garrapata (Ixodidae) del Uruguay. *Revista de Medicina Veterinaria de Uruguay*, 2, 106- 107.