

**RESISTENCIA *in vitro* DE LA GARRAPATA *Rhipicephalus microplus* A ORGANOFOSFORADOS, PIRETROIDES Y AMITRAZ EN EL DEPARTAMENTO DE BOYACÁ, COLOMBIA**

***In vitro* Resistance of *Rhipicephalus microplus* ticks to Organophosphates, Pyrethroids and Amitraz in Boyacá Department, Colombia**

Javier E. Rodríguez-Pacheco<sup>\*,1</sup>, Martín O. Pulido-Medellín<sup>\*,\*\*</sup> y Diego J. García-Corredor<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup> Grupo de Investigación en Medicina Veterinaria y Zootecnia (GIDIMEVETZ), <sup>\*\*</sup> Programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, Boyacá, Colombia

**Correo-E:mopm1@hotmail.com**

Recibido: 22/11/16 - Aprobado: 17/07/17

**RESUMEN**

El presente estudio evaluó la resistencia *in vitro* de la garrapata *Rhipicephalus microplus* a organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS) y amitraz (AM). Las garrapatas adultas fueron recolectadas en Boyacá, Colombia y sometidas a la prueba de inmersión para evaluar la eficacia de los fármacos, el efecto sobre la ovoposición y el porcentaje de eclosión larvaria. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cinco grupos y tres repeticiones por tratamiento, con 10 garrapatas por repetición. Los resultados demostraron tasas de mortalidad a las moléculas evaluadas, encontrando 43, 56, 60 y 96% de mortalidad para el grupo control, PS, AM y OF, respectivamente, al día 21 del experimento. La inhibición de la ovoposición fue de 13,4% para el grupo control, 44,6% para AM, 45,5% para PS y 96% para OF. El porcentaje de eclosión de huevos fue de 88% para el grupo control, 16% para AM, 14% para PS y 4% para OF. El presente estudio *in vitro* representa el primer diagnóstico en el departamento de Boyacá, Colombia.

**(Palabras clave:** *Rhipicephalus microplus*; resistencia; ixodicidas; *in vitro*)

**ABSTRACT**

The present investigation evaluated the *in vitro* resistance of the *Rhipicephalus microplus* tick, to organophosphates (OP), synthetic pyrethroids (SP), and amitraz. Adult ticks were collected in the Department of Boyacá, Colombia, and subjected to the immersion test, to assess the efficacy of drugs, their effect on oviposition, and the percentage of larvae eclosion. A completely randomized experimental design was used, with 5 groups and 3 replicates per group, with 10 ticks per replicate. The results showed that the mortality rates in terms of percentage (%) of the assessed molecules were: 43 for the control group; 56 for SP; 60 for AM, and 96 for OP, respectively, at day 21 of the study. The inhibition of oviposition was: 13.4% for the control group; 44.6% for AM; 45.5% for SP; and 96% for OP. The present *in vitro* study represents the first diagnostic of resistance in the Department of Boyacá, Colombia.

**(Key words:** *Rhipicephalus microplus*; resistance; acaricides; *in vitro*)

<sup>1</sup> A quien debe dirigirse la correspondencia (To whom correspondence should be addressed)

## INTRODUCCIÓN

Colombia reporta 23 millones de cabezas de ganado bovino [1]. El departamento de Boyacá refiere una población bovina de 746,553 con una participación del 3,30% del total de la ganadería nacional. Boyacá se encuentra entre los 15 departamentos con mayor número de bovinos pero pese a esta considerable población, los estudios acerca de resistencia en garrapatas *R. microplus* son escasos [2]. Una garrapata adulta es capaz de reducir la ganancia de peso en 0,6 g/d, de la cual el 65% es atribuido al estrés causado por la irritación y el 35% por la pérdida de sangre [3]. El uso extensivo de productos químicos para el control de la garrapata bovina ha favorecido el desarrollo de resistencia a estos compuestos, siendo una grave amenaza para la sostenibilidad de los sistemas productivos [3].

La resistencia de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS) y amitraz (AM) ha sido ampliamente descrita, principalmente en Australia y Latinoamérica [3]. La definición de los criterios para considerar una población resistente de acuerdo a la FAO (2004) se basan en que "...la resistencia está definida como la detección, por medio de pruebas sensibles, de un aumento significativo del número de individuos de una única población de una especie determinada que toleran drogas en dosis comprobadamente letales para la mayoría de los individuos de la misma especie..." [4].

El desarrollo de la resistencia a los productos químicos depende de las presiones evolutivas y de constantes ajustes [5], que involucran factores de variabilidad genética, causada por mutaciones al azar o rearrreglos genéticos que son generados por el uso constante de los pesticidas; permitiendo la reproducción de individuos con el rasgo de resistencia [6].

En Brasil, *R. microplus* presenta resistencia a todos los grupos químicos con excepción de fipronil y fluazurón, aunque hay sospechas de resistencia a fipronil [7]. En Uruguay, la resistencia a fipronil fue diagnosticada a través de pruebas de establo [8] y por ensayos *in vitro* en Cuba [9], Hagen y colaboradores en 1999 [10] reportaron que en Guatemala, Costa Rica, Honduras, República Dominicana, El Salvador y Panamá existían cepas de garrapatas *R. microplus* resistentes a piretroides.

En Colombia, la presencia de la garrapata *R. microplus* ha sido registrada en altitudes que oscilan entre 0 y 2900 msnm [11]. Existen trabajos de orden nacional que sustentan el problema de resistencia, encontrando presencia en diversas regiones y bajo el uso de diferentes acaricidas [12]. Autores como Betancourt [13] o Benavides *et al.* [14] reportaron poblaciones de garrapatas colombianas resistentes a moléculas como OF y PS, en diferentes departamentos del país.

A pesar de existir en el mercado una amplia gama de productos químicos para contrarrestar la acción de las garrapatas, las poblaciones parasitarias han ido en aumento, debido en ocasiones a la ineficacia de los programas de control, la mala utilización de los productos, la tolerancia desarrollada por insectos y garrapatas, y la deficiencia en la aplicación de los productos recomendados.

La resistencia a ixodicidas ha conducido a elevados costos de control de garrapatas, no solo debido al valor de nuevos productos químicos, sino por la resurgencia de brotes de enfermedades hemoparasitarias. El objetivo del presente estudio fue evaluar la eficacia de moléculas ixodicidas de uso común, en condiciones *in vitro*, para el control de la fase adulta de *R. microplus*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las garrapatas fueron recolectadas de fincas ganaderas del municipio de Moniquira, departamento de Boyacá, Colombia. El estudio se realizó en el Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia (UPTC), Tunja, Boyacá, Colombia. La temperatura promedio anual de la zona es de 13°C, presenta una precipitación pluvial anual de 645 mm y se encuentra a una altitud de 2690 msnm [15]. Para la evaluación *in vitro* se recolectaron garrapatas *R. microplus*, hembras adultas pletóricas que fueron depositadas en tubos de cristal con tapón de algodón húmedo y fueron trasladadas al Laboratorio de Parasitología Veterinaria de la UPTC.

Las garrapatas fueron desinfectadas, con cloro 0,3% [16,17] y pesadas. Además, fueron sometidas a tratamientos ixodicidas mediante la técnica de inmersión de adultas [18]. Los tratamientos fueron: grupo I (control), agua destilada con Tween 80 al 1%; grupo II, OP (metrifonato 97%); Grupo III,

PS (cipermetrina 15%); grupo IV, AM 20,8%. Cada producto fue probado mediante tres réplicas incluyendo el grupo control.

Las garrapatas hembras de los tratamientos tuvieron un rango de peso de 0,20 a 0,25 g. Las garrapatas se colocaron en placas de cultivo de 24 pozos y sumergidas por 60 seg en 1,5 mL del producto comercial preparado de acuerdo a las recomendaciones del inserto de cada producto. Luego, las garrapatas fueron removidas secadas e incubadas durante 20 d en cámara húmeda (85-90% humedad relativa; HR) a 27°C. Se realizaron observaciones diarias con micro-estereoscopio para comprobar el efecto del fármaco.

Se registró la mortalidad de las garrapatas a través de observaciones durante 21 d. Las garrapatas fueron consideradas muertas cuando no mostraron movimiento alguno al ser estimuladas. Para estimar el porcentaje de mortalidad se usó la fórmula descrita por Abbott [19].

$$\% \text{ de Mortalidad} = \frac{\% \text{ Mort. Tratadas} - \% \text{ Mort. Control}}{100 - \% \text{ Mort. Control}} \times 100$$

Para determinar el efecto del producto comercial sobre la eficiencia reproductiva de *R. microplus*, se retiró la postura de cada una de ellas a los 14 d de incubación. Los huevos fueron pesados e incubados bajo condiciones controladas de humedad y temperatura (28°C y 85% HR). Para establecer el efecto del fármaco evaluado sobre la ovoposición, se obtuvo la relación del peso de huevos depositados / peso de las hembras por grupo mediante la siguiente fórmula [18]:

$$\text{Relación de pesos} = \frac{\text{Peso de huevos (g)}}{\text{Peso de hembras (g)}} \times 100$$

Con este resultado para cada grupo experimental se calculó el porcentaje de inhibición de la ovoposición (IO) mediante la siguiente fórmula [18]:

$$\% \text{ IO} = \frac{\text{Peso de huevos control} - \text{Peso huevos TTO}}{\text{Peso de huevos control}} \times 100$$

Para calcular la eclosión de larvas se tomaron cinco alícuotas, realizando el conteo de cascarones (C) rotos y no rotos hasta completar 100 huevos (H) procedentes de una muestra de 1 g de huevos

incubada a 28°C y 85% HR y previamente homogenizada. Con los resultados de los conteos se calculó el promedio de eclosión para los diferentes tratamientos.

El porcentaje de eclosión se estableció por medio de la siguiente fórmula:

$$\%E = C/H + C \times 100$$

Se calculó la eficiencia reproductiva (ER), según cada acaricida y el control. La ER es un valor necesario para calcular la eficacia del acaricida [18]:

$$ER = \frac{\text{Peso de los huevos}}{\text{Peso de las Garrapatas}} \times \% \text{ de Eclosión} \times 20.000$$

Se calculó la eficacia del producto (EP), según cada acaricida [19]:

$$EP = \frac{ER \text{ control} - ER \text{ del grupo tratado}}{ER \text{ control}} \times \% \text{ de Eclosión} \times 20.000$$

El factor de resistencia se calculó dividiendo la eficacia esperada, 100%, entre la eficacia obtenida en cada producto.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se utilizó un diseño experimental completamente al azar con cuatro tratamientos y tres repeticiones, donde cada repetición incluyó 10 garrapatas por tratamiento. Para conocer la significancia estadística de las mortalidades se calculó el *Chi* cuadrado de bondad de ajuste para los promedios de días a la primera muerte, y al 50 y 100% de mortalidad, así como el porcentaje de inhibición de la ovoposición entre tratamientos. Se utilizó el análisis de varianza (*One-Way ANOVA*). Los datos fueron analizados en el programa estadístico Epidat 4.0.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los días promedio a la primera muerte y al 50% de mortalidad se presentan en el Cuadro 1. El grupo tratado con OF llega al 96% de mortalidad el día 21, mientras que los grupos tratados con AM y PS solo llegan al 60 y 56% de mortalidad en el día 21, respectivamente (Cuadro 2).

Respecto al porcentaje de mortalidad, se encontró menor eficiencia para PS (30,02%), seguido de AM

**Cuadro 1.** Días de ocurrencia de mortalidad de garrapatas *Rhipicephalus microplus* según tratamiento

| Tratamientos <sup>1</sup> | Primera muerte | 50% mortalidad |
|---------------------------|----------------|----------------|
| Control                   | 16,7           | 20,0           |
| AM                        | 3,0            | 12,3           |
| PS                        | 4,3            | 18,7           |
| OF                        | 6,0            | 8,0            |

<sup>1</sup> AM: Amitraz; PS: Piretroides sintético; OF: Organofosforado

(38,5%), mientras que el OF presentó la mayor eficiencia alcanzando el 100% de mortalidad.

Los resultados mostraron una inhibición de la ovoposición (%IO) del 13,4% para el grupo control, 44,6% para AM, 45,5% para PS y 96% para OF (Figura 1). Asimismo, el porcentaje de eclosión de huevos de garrapatas *R. microplus* fue de 88% para el grupo control, 16% para AM, 14% para PS y 4% para OF (Figura 1).

Los tratamientos a base de AM y PS para el control de *R. microplus* lograron una mortalidad bastante baja, mientras que el grupo tratado con OF obtuvo el 96% de mortalidad al día 21. Estudios anteriores, en Colombia, obtuvieron la eliminación total de la población de cepas de garrapatas a base de OF, AM y PS como acaricidas [20], lo que es un indicativo de un fenómeno de resistencia en proceso debido a la disminución de la efectividad. Benavides *et al.* [21] y Betancourt [13] reportaron poblaciones de garrapatas resistentes a moléculas de PS, específicamente Cipermetrina (60% de efectividad), situación que coincide con lo encontrado en las poblaciones de garrapatas analizadas en este estudio.

Los resultados del presente estudio se relacionan con el estudio de Frago *et al.* [22] quienes encontraron una mortalidad de 25,2% con la dosis discriminante de AM, y de 99,7 y 98,6% con los OF, Clorfenvinfos y Coumafós, respectivamente. Frago

*et al.* [23] evaluando 98 poblaciones de campo de *R. microplus* en Yucatán, México, encontraron que el 63, 61 y 59% de las garrapatas eran resistentes a Flumetrina, Deltametrina y Cipermetrina, respectivamente. Asimismo, Reyes-Domínguez *et al.* [24] indican 16% de eficacia para OF, 40% para PS y 47% para AM a los 7 d del tratamiento, valores mayores a la eficacia obtenida para ese día en el presente estudio.

Pulido-Medellín *et al.* [17] describen el uso del hongo *Metarhizium anisopliae* para el control de *R. microplus*, con una eficiencia del 100% al día 14 del tratamiento. Resultados similares fueron descritos por García-Corredor *et al.* [16] usando el hongo *Cordyceps bassiana in vitro* al día 15 del tratamiento.

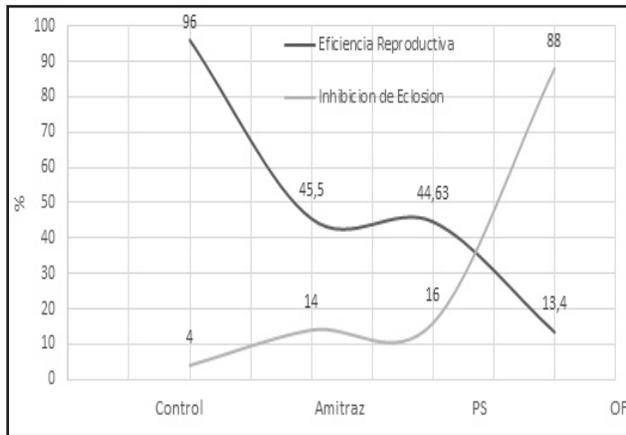
La inhibición de la reproducción de *R. microplus* fue de 44,63% para AM, 45,5% para PS y 96,0% para OF, en tanto que Pulido-Medellín [17] y García-Corredor *et al.* [16] encontraron una reducción que varió entre 68 a 91% y de 40,3%, respectivamente, lo que pone en evidencia la limitada utilidad de AM y PS para el control de la garrapata.

Para determinar la eficacia de los productos se calculó la eficiencia reproductiva (ER), valor que expresa la capacidad de una teleogina para transformar su peso corporal en larvas viables [25]. En cuanto a la eficacia de los productos PS y AM, mostraron valores inferiores a la eficacia mínima aceptada internacionalmente (Cuadro 3), la cual debe ser igual o mayor de 90% [4]. Estudios como los de Bravo *et al.* [25, 26] *in vitro* encontraron resistentes las poblaciones evaluadas tras el uso de amitraz. En un estudio similar evaluando larvas y adultos frente al OF coumafós, Bravo *et al.* [25] describen la presencia de resistencia en hembras ingurgitadas; estudios como el de Coronado y Mujica [27] sobre moléculas similares a las del presente

**Cuadro 2.** Eficacia (%) de productos ixodicidas para el control de garrapatas adultas *Rhipicephalus microplus* según el día postratamiento

| Tratamientos <sup>1</sup> | 2 | 4   | 6   | 8   | 10  | 12  | 14  | 16  | 18  | 21  |
|---------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Control                   | 0 | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 0   | 1,6 | 4,3 | 4,3 |
| AM                        | 0 | 3,0 | 3,6 | 3,6 | 4,0 | 4,6 | 5,0 | 5,3 | 6,0 | 6,0 |
| PS                        | 0 | 1,3 | 2,6 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,0 | 3,6 | 5,6 | 5,6 |
| OF                        | 0 | 0   | 4,0 | 5,0 | 6,0 | 6,3 | 7,3 | 8,0 | 8,6 | 9,6 |

<sup>1</sup> PS: Piretroides sintético; OF: Organofosforado; AM: Amitraz



**Figura 1.** Porcentaje de eficiencia reproductiva (Negro) e Inhibición de la eclosión (Gris) de productos ixodíctidos para el control de garrapatas adultas *Rhipicephalus microplus*

estudio, revelan resultados similares a los reportados para el caso de PS y AM.

El fenómeno de resistencia ha afectado a productores, veterinarios y fabricantes de insecticidas, pero también ha proporcionado la oportunidad de conocer los aspectos más relevantes de la bioquímica y evolución de los artrópodos en poblaciones expuestas a una presión de selección química intensa por compuestos ixodíctidos.

Se han descrito diferentes mecanismos asociados a la presencia de resistencia a químicos en artrópodos. Estos incluyen los procesos de detoxificación metabólica o modificación del sitio blanco, como los principales responsables. Varios autores [28-32] evaluaron la funcionalidad de PS y determinaron un incremento significativo de la actividad general de esterasas así como de hidrólisis de la permetrina. El canal de sodio es el sitio blanco de los PS y por esta razón se le conoce a este mecanismo como modificación del sitio blanco o resistencia tipo *Kdr* por su denominación en inglés (*Knock down resistance*) [31] y es uno de los mecanismos mejor documentados en insectos [33].

Para el caso de los OF, Temeyer *et al.* [34] determinaron la modificación del sitio blanco en la acetilcolinesterasa a través de una sustitución de una glutamina por una arginina en el gen de la acetilcolinesterasa 3; para el caso de AM, existe una fuerte evidencia de que su destino es el receptor octopamina [35, 36]. Chen *et al.* [37] fueron los primeros en describir las mutaciones de un gen del receptor octopamina en *R. microplus* resistente al AM. El descubrimiento de estas mutaciones en

garrapatas resistentes al AM proporciona la primera evidencia de la posibilidad de un sitio de destino del garrapaticida alterado como un mecanismo de resistencia al AM en *R. microplus*.

La presencia de resistencia a los PS encontrada en el presente estudio, puede conllevar a la presencia de resistencia cruzada con OF. Se ha demostrado que algunos mecanismos de resistencia a el OF son comunes con los de PS, como es el caso del incremento de la frecuencia del mecanismo de glutatión-S-transferasa [9, 25], por lo que se podría estar frente a un proceso de resistencia en proceso para el caso de los OF, único producto que cumplió los estándares de eficacia evaluados en el presente manuscrito.

La demanda para combatir este problema dentro de las explotaciones bovinas lleva a considerar la utilización de acaricidas de origen biológico, solos o en combinación [38-40].

## CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio muestran deficiencias por parte de los PS y AM en el control de garrapatas *R. microplus*. El OF muestra efectividad, pero se presume de un proceso de resistencia a la molécula debido a su relación con los PS. La pérdida de efectividad del control químico contra la garrapata puede deberse a la aplicación ineficaz, condiciones estacionales desfavorables para la aparición de un mecanismo de resistencia.

## CONFLICTOS DE INTERESES

Los autores mencionan no tener conflictos de intereses.

## APORTE DE LOS AUTORES AL TRABAJO

## REFERENCIAS

1. Federación Colombiana de Ganaderos - FEDEGAN. Análisis del Inventario Ganadero Colombiano. [en línea]. Disponible en: <http://www.fedegan.org.co/estadisticas/publicaciones-estadisticas>. 2014.
2. Instituto Colombiano Agropecuario, [ICA]. Censo pecuario Nacional. [en línea]. 2015. Disponible en: <http://www.ica.gov.co/getdoc/8232c0e5-be97-42bd-b07b-9cdbfb07fcac/Censos-2008.aspx>.
3. Rodríguez-Vivas RI, Hodgkinson JE, Trees AJ.

- Resistencia a los acaricidas en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: situación actual y mecanismos de resistencia. *Rev Mex Cienc Pecu.* 2012; 3(1):9-24.
4. Food and Agriculture Organization of the United Nations, [FAO]. *Guidelines for Resistance Management and Integrated Parasite Control in Ruminants.* 2004.
  5. Wheat CW, Vogel H, Wittstock U, Braby MF, Underwood D, Mitchell-Olds T. The genetic basis of a plant-insect coevolutionary key innovation. *P Natl Acad Sci USA.* 2007; 104(51):20427-20431.
  6. Miller RJ, Davey RB, White WH, George JE. A comparison of three bioassay techniques to determine AM susceptibility in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol.* 2007; 44:283-294.
  7. Castro J, Rifran G, Piaggio G, Schumaker T. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to Fipronil in Uruguay evaluated by *in vitro* bioassays. *Vet Parasitol.* 2010; 7:169-172.
  8. Cuore U, Altuna M, Cicero L, Fernández F, Luengo L, Mendoza R, *et al.* Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Uruguay. *Rev Vet Montevideo.* 2012; 48(187):5-13.
  9. Rodríguez VM, Mellor ML, Guerra A, Barrios PH, Salazar RI, Rodríguez LA. Situación de la resistencia de las garrapatas a los acaricidas en Cuba. Uso de la lucha integrada como estrategia. *Memorias de IV Seminario Internacional de Parasitología Animal.* Puerto Vallarta, Jalisco, México. 1999; p. 57-63
  10. Hagen S, Kopp JA, Liebisch A. Estudios de resistencia a acaricidas en la garrapata bovina *Boophilus microplus* en América Central. *Memorias de IV Seminario Internacional de Parasitología Animal.* Puerto Vallarta, Jalisco. México. 1999; 33 p.
  11. Cortés VJA, Betancourt EJ A, Argüelles CJ, Pulido HLA. Distribution of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks on cattle and farms from altiplano Cundiboyacense (Colombia). *Corpoica Cienc Tecnol Agropecu.* 2010; 11(1):73-84.
  12. Díaz E. Mecanismos moleculares y bioquímicos de resistencia a acaricidas en la garrapata común de los bovinos *Rhipicephalus microplus*. *Rev Col Cienc Animal.* 2012; 5(1):72-81.
  13. Betancourt A. Susceptibilidad de varias cepas de la garrapata *Boophilus microplus* a diferentes acaricidas. *Rev Cebú.* 1993; 22:53-55.
  14. Benavides E, Romero N, Rodríguez J. Situación actual de resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a acaricidas en Colombia. Segunda entrega Carta Fedegan. 2000; 60:13-18.
  15. Rojas E, Arce B, Peña A, Boshell F, Ayarza M. Cuantificación e interpolación de tendencias locales de temperatura y precipitación en zonas altas andinas de Cundinamarca y Boyacá (Colombia). *Corpoica Cienc Tecnol Agropec.* 2010; 11(2):173-182.
  16. García-Corredor DJ, Rodríguez-Vivas RI, Pulido-Medellín MO, Díaz-Anaya AM, Andrade-Becerra RJ. Evaluación *in vitro* de *Cordyceps bassiana* (Ascomycota: Sordariomycetes) en el Control Biológico de *Rhipicephalus microplus*. *Rev Inv Vet Perú* 2016; 27(1):130-136.
  17. Pulido-Medellín MO, Rodríguez-Vivas RI, García-Corredor DJ, Díaz-Anaya AM, Andrade-Becerra, RJ. Evaluación de la eficacia de la CEPA MAF1309® de *Metarhizium anisopliae* en el control biológico de garrapatas adultas de *Rhipicephalus microplus* en Tunja, Colombia. *Rev Fac Cs Vets.* 2015; 56(2):80-86.
  18. Drummond RO, Whetstone TM. Oviposition of the gulf coast tick. *J Econ Entomol.* 1970; 63(5):1547-1551.
  19. Abbott, W. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J Econ Entomol.* 1925; 18:256-257.
  20. López G, Jiménez C, Vásquez, W. Distribución de garrapatas en 61 municipios de Antioquia y efectividad de los ixodidas comerciales sobre *Boophilus microplus*. Resultados Fase III. Secretaría de Agricultura de Antioquia-Instituto Colombiano Agropecuario ICA. Medellín. 1989; 37 p.
  21. Benavides OE, Romero NA, Rodríguez BJ. Situación actual de la resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a acaricidas en Colombia. El diagnóstico de resistencia. Carta Fedegan. 1989; 61:13-18.
  22. Fragoso-Sánchez H, García-Vázquez Z, Soberanes-Céspedes N, Santamaría-Vargas M. Primer caso de resistencia al AM en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México. *Tec Pecu Mex.* 2002; 81-92.
  23. Fragoso-Sánchez H, Alonso-Díaz MA, Rosario-Cruz R, Rodríguez-Vivas RI. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodidas. *Arch Med Vet,* 2006; 105-113.
  24. Reyes-Domínguez I, Arieta-Román R, Fernández-Figueroa J, Romero-Figueroa M, Peniche-Cardena A. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in cattle farms in the municipality of San Juan Evangelista, Veracruz, México. *Rev Electrón Vet* 2013; 14(7).
  25. Bravo M, Coronado A, Henríquez H. Susceptibilidad de larvas y adultos de *Boophilus microplus* al ixodida coumafos en sistemas de producción de leche del estado Lara, Venezuela. *Zoot Trop.* 2008a; 26(1):41-46.
  26. Bravo M, Coronado A, Henríquez H. Eficacia *in vitro* del amitraz sobre poblaciones de *Boophilus microplus* provenientes de sistemas de producción de leche del estado Lara, Venezuela. *Zoot Trop.* 2008b. 26(1):35-40.
  27. Coronado A, Mujica F. Resistencia a acaricidas en

- Boophilus microplus* en Venezuela. Gaceta de Ciencias Veterinarias. 1997; 3(1):5-14.
28. Pruetz JH, Guerrero FD, Hernández R. Isolation and identification of an esterase from a Mexican strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Econ Entomol. 2002; 95:1001-1007.
  29. Baffi MA, de Souza GR, de Sousa CS, Ceron CR, Bonetti AM. Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae). Mol Biochemical Parasitol. 2008; 160:70-73.
  30. Miller RJ, Li AY, Tijerina M, Davey RB, George JE. Differential response to diazinon and coumaphos in a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected in México. J Med Entomol. 2008; 45:905-911.
  31. Rosario-Cruz R, Almazan C, Miller RJ, Domínguez-García DI, Hernández-Ortiz R, de la Fuente J. Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. Front in Biosci. 2009; 14:2657-2665.
  32. Ortiz EM, Santamaría VM, Ortiz NA, Soberanes CN, Osório MJ, Franco, BR, *et al.* Characterization of *Boophilus microplus* resistance to ixodicides in México. In: Seminario Internacional de Parasitología Animal Acapulco, Gro. México. 1995; pp 58-66.33.
  33. He H, Chen AC, Davey RD, Ivie GW, George JE. Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. Biochem Biophys Res Commun. 1999; 261:558-561.
  34. Temeyer KB, Pruetz JH, Chen AC. R86Q a mutation in BmAChE3 yielding a *Rhipicephalus microplus* organophosphate-insensitive acetylcholinesterase. J Med Entomol. 2007; 1013-1018.
  35. Baxter GD, Barker S. Isolation of a cDNA for an octopamine-like, G-protein coupled receptor from the cattle tick, *Boophilus microplus*. Insect Biochem Mol Biol 1999; 29:461-467.
  36. Jonsson NN, Hope M. Progress in the epidemiology and diagnosis of AM resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. Vet Parasitol. 2007; 146:193-198.
  37. Chen AC, He H, Davey RB. Mutations in a putative octopamine receptor gene in amitraz-resistant cattle ticks. Vet Parasitol. 2007; 148:379-383.
  38. Fernández-Salas A, Rodríguez-Vivas R, Alonso-Díaz M. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. Vet Parasitol. 2012; 183:338-342.
  39. Okamoto K, Amarasekare P. The biological control of disease vectors. J Theor Biol. 2012; 309:47-57.
  40. Perinotto WMS, Angelo IC, Golo PS, Quinelato S, Camargo MG, Sá FA, Bittencourt VREP. Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. Exp Parasitol. 2012; 130:257-260.