

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

Noé Soberanes Céspedes^a, Minerva Santamaría Vargas^a, Hugo Fragoso Sánchez^a, Zeferino García Vázquez^b

RESUMEN

El objetivo de este estudio fue documentar el primer caso de la resistencia de la garrapata *B. microplus* al Amitraz, en México. Se obtuvo una muestra de garrapatas *B. microplus* del municipio de Emiliano Zapata, Tabasco, con reportes de fallas de control con este acaricida. La cepa de garrapatas fue denominada "San Alfonso" y se utilizaron larvas (F1) provenientes de la generación parental de hembras repletas, éstas se probaron con dosis discriminadas de Amitraz 0.0002 %, (Taktic®) en formulación de concentrado emulsificable, mediante la prueba de inmersión larval modificada, con un tiempo de exposición de 72 h. Larvas de la generación F1 se infestaron artificialmente en bovinos Aberdeen Angus para la reproducción de garrapatas hembras adultas, que fueron sometidas a la prueba de inmersión de adultas con formulaciones comerciales utilizadas en México, como el Taktic®, Bovithion®, Dursban®, Esteladon®, Asuntol®, Bayticol®, Permetrina, Batestan®, Ectogan® y Garraban®, a la concentración comercial recomendada durante un tiempo de exposición de un minuto. Los resultados mostraron que en larvas el porcentaje de mortalidad con Amitraz fue de 25.3 %, y el factor de resistencia fue de 41.9. Además la cepa "San Alfonso" mostró resistencia a los organofosforados y piretroides. El porcentaje de control obtenido del Amitraz en la fase adulta fue de 22.8 %. De acuerdo a los resultados obtenidos se determinó que la cepa denominada "San Alfonso" es el primer caso de resistencia al Amitraz en la garrapata del ganado *B. microplus* detectado en México.

PALABRAS CLAVE: Ixodicida, Amitraz, Garrapata, *Boophilus microplus*, Resistencia.

ABSTRACT

The objective of this study was to document the first case in Mexico of Amitraz resistance in *B. microplus* ticks. A sample of *B. microplus* ticks was obtained in the municipality of Emiliano Zapata, Tabasco, where there had been reports of lack of control with this ixodicide. The tick strain was named "San Alfonso" and (F₁) larvae were used from the parental generation of adult engorged females. These were tested with a discriminate dose of Amitraz 0.0002%, (Taktic®) in a emulsifiable concentrated formulation. Modified larval immersion test were used, with a 72 hr exposition time. Aberdeen Angus bovines were infested with the F1 larvae generation in order to obtain adult female ticks, that were then tested by adult immersion test with commercial formulas used in Mexico such as: Taktic®, Bovithion®, Dursban®, Esteladon®, Asuntol®, Bayticol®, Permetrin, Batestan®, Ectogan® and Garraban®, using the commercially recommended concentration during a 1 min exposition. The results showed that in the larvae mortality percentage with Amitraz was 25.3% and the resistance index was 41.9. The "San Alfonso" *B. microplus* strain also showed resistance to organophosphates and pyrethroids. The percentage of control obtained by Amitraz in the adult phase was 22.8%. According to these findings it was determined that the "San Alfonso" strain is the first case in Mexico of Amitraz resistance in the *B. microplus* cattle tick.

KEY WORDS: Ixodicide, Amitraz, Tick, *Boophilus microplus*, Resistance.

Las infestaciones de garrapatas *Boophilus microplus* en el ganado bovino se encuentran ampliamente

The infestation of cattle with *Boophilus microplus* ticks is widely distributed in the tropical and

Recibido el 2 de Julio de 2001 y aceptado para su publicación el 6 de septiembre de 2001.

^a Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. CONASAG-SAGARPA.

^b CENID-Parasitología Veterinaria. INIFAP. Apartado Postal 206. CIVAC. Carretera Federal Cuernavaca-Cuatla Km. 11.5 Col. Progreso 62500 Jiutepec, Morelos, México. Correspondencia y solicitud de separatas.

distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales de varias partes del mundo, incluyendo México. Una de las estrategias más utilizadas para controlar la infestación con garrapatas *B. microplus* en bovinos, es la aplicación de ixodicidas sobre el cuerpo de estos a intervalos específicos, los cuales están determinados por la región ecológica, la especie a combatir y la eficacia residual del ixodicida a utilizar⁽¹⁾. Los diferentes tipos de productos que se han utilizado para el control de garrapatas incluyen los arsenicales, organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas cíclicas, piretroides e ivermectinas^(1,2).

La presencia de la resistencia de la garrapata *B. microplus* hacia los ixodicidas organofosforados y organoclorados en México se documentó por primera vez en el año de 1981, siete años después de que comenzaron a utilizarse en forma intensiva y periódica; se demostró que la distribución de la resistencia era amplia en la región este y noreste de México (en el área de las Huastecas), por lo cual las autoridades federales de la Dirección General de Sanidad Animal autorizaron el registro en 1986 de los piretroides y amidinas como una alternativa de control de la resistencia a los organofosforados, iniciándose así el uso de estos ixodicidas⁽³⁾. Siete años después, en 1993 se detectaron los primeros casos de resistencia a ixodicidas piretroides mediante el ensayo de paquete de larvas con dosis discriminantes⁽⁴⁾; identificándose cepas doble resistentes a piretroides y organofosforados, con una distribución geográfica en regiones ganaderas en la zona del golfo de México, noreste y sur de Tamaulipas, este de San Luis Potosí, sureste de Tabasco, noreste de Chiapas, norte y sur del estado de Veracruz^(5,6).

La emergencia de cepas de garrapatas *B. microplus* doble resistentes a organofosforados y piretroides a partir de 1993, hizo que las autoridades de Sanidad Animal recomendaran el uso del Amitraz para el control de estas cepas resistentes, por lo que después de siete años de su uso, la posibilidad de que en regiones de Tabasco y Tamaulipas, (donde se presentó por primera vez la doble resistencia) se haya desarrollado la resistencia al Amitraz, la cual según antecedentes de otros países donde se ha

subtropical regions of several parts of the world including Mexico. One of the most employed strategies used to control the infestation of cattle with *B. microplus* ticks is the application of ixodicides on the body of the animals at specific intervals, that are determined by the ecological region, the species to be controlled and the residual efficacy of the ixodicide used⁽¹⁾. The different compounds that have been used for tick control include: arsenical, chlorinated hydrocarbon, organophosphates, carbamates, cyclic amidines, pyrethroids compounds and ivermectines^(1,2).

In Mexico, *B. microplus* resistance ticks against organophosphate and chlorinated hydrocarbon ixodicides was documented for the first time in the year 1981, seven years after they were used periodically and intensively; it was demonstrated that the distribution of the resistance was wide in the eastern and north-eastern region of Mexico (the area known as the Huastecas), and therefore the federal authorities of the Animal Health Division in 1986 authorized the used of pyrethroids and amidines as alternative to control the organophosphate resistance, and then the use of these ixodicides was begun⁽³⁾. Seven years later, in 1993, the first cases of pyrethroid resistance were detected by assaying larval packet test with discriminating doses⁽⁴⁾; and *B. microplus* resistant strains were identified as co-resistant to pyrethroids and organophosphates, with a wide geographical distribution in the livestock regions of the Gulf of Mexico area, north-east and south of Tamaulipas, east of San Luis Potosi, south-east of Tabasco, north-east of Chiapas, north and south of the State of Veracruz^(5,6).

Because of the emergence of co-resistance *B. microplus* ticks to organophosphates and pyrethroids since 1993, the Animal Health Authorities recommended the use of Amitraz for the control of these resistant strains, and therefore, seven years after its use, there is the possibility that in regions of Tabasco and Tamaulipas (where the co-resistance first developed) resistance to Amitraz has developed, as it has occurred in other countries where the same history of intensive use of ixodicides has been followed by resistance in a short period^(7,8).

seguido el mismo historial de uso de ixodicidas en forma intensiva, la resistencia se presentó en un periodo corto^(7,8). El objetivo del presente estudio es documentar el primer caso de resistencia al Amitraz en la garrapata *B. microplus* en México.

El estudio se realizó en un rancho ubicado en el municipio de Emiliano Zapata del estado de Tabasco, durante el mes de enero del 2001. El tipo de ganado bovino predominante en la explotación fue Cebú puro y cruza con razas europeas. El programa de control de garrapata *B. microplus* en el rancho se realiza desde hace más de 20 años; inicialmente se utilizaban ixodicidas organofosforados hasta que se detectaron fallas en su eficacia, y posteriormente por un periodo de 12 años piretroides, y debido a su ineficacia en el control de la garrapata se utilizó el Amitraz por un periodo de siete años, hasta que se observaron fallas en el control.

De diferentes animales infestados se colectaron 20 garrapatas adultas de *B. microplus* y se transportaron al Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal de la CONASAG-SAGARPA en Jiutepec, Morelos, México. Las hembras adultas se mantuvieron en incubación a 29° C y 80 a 90 % de humedad relativa para permitir la oviposición y eclosión de larvas, las cuales fueron utilizadas en los bioensayos. La muestra de campo fue denominada "San Alfonso" correspondiente a la generación F1; así mismo, se utilizó la cepa de referencia "Susceptible" mantenida en el laboratorio, realizándose los bioensayos con la generación F7.

Para determinar la susceptibilidad al Amitraz se utilizó el Taktic® 12.5 %, ingrediente activo (IA) en formulación de concentrado emulsificable. Para las pruebas de dosis discriminantes de organofosforados (OF) y piretroides (PS) se utilizaron compuestos en grado técnico, Coumafós (97 % pureza), Clorfenvinfos (93.9 % pureza), Diazinon (95.4 % pureza), Flumetrina (58.78 % pureza), Deltametrina (99.5 % pureza) y Cipermetrina (92 % pureza), formulados en aceite de oliva y tricloroetileno en grado reactivo, en una proporción de 1:2. Los ixodicidas formulados (presentación comercial en México) utilizados para las pruebas de inmersión de adultas fueron el Taktic® 12.5 %

The objective of this study was to document the first case in Mexico of Amitraz resistance in *B. microplus* ticks.

The study was carried out in a ranch located in the municipality of Emiliano Zapata in the State of Tabasco, during January 2001. The cattle breed that predominates is pure Zebu and Zebu crosses with European breeds. The control program of *B. microplus* tick in the ranch has been applied for over 20 years; initially with organophosphates ixodicides until efficacy failure was detected; after that for a period of 12 years, pyrethroids were used and due to their inefficacy for tick control, Amitraz was used during seven years, until control failure was observed.

From different infested animals, 20 adult engorged *B. microplus* ticks were collected and transported to the National Centre for Animal Health Certification of CONASAG – SAGARPA in Jiutepec, Morelos, Mexico. The adult females were maintained in incubation at 29°C and between 80 to 90 % relative humidity in order to promote oviposition and larvae eclosion to use them in the bioassays. The field sample was named "San Alfonso" and the F₁ generation was used; also, the F₇ generation of a "Susceptible" *B. microplus* reference strain kept in the laboratory conditions was used in the bioassays.

In order to determine the susceptibility to Amitraz, the active ingredient (AI) Taktic® 12.5 %, was used in an emulsifiable concentrate formulation. For the discriminative dose tests of organophosphates (OP) and pyrethroids (SP), technical grade compounds were used: Coumaphos (97 % purity), Chlorfenvinphos (93.9 % purity), Diazinon (95.4 % purity), Flumethrin (58.78 % purity), Deltamethrin (99.5 % purity) and Cypermethrin (92 % purity), formulated with olive oil and reactive grade trichloroethylene in a 1:2 proportion. The formulated ixodicides (commercial formulation in Mexico) were used for the adult immersion tests : Taktic® 12.5 % active ingredient (AI), Bovithion® (68 % AI), Dursban® (24 % AI), Esteladon® (30 % AI), Asuntol® (20 % AI), Bayticol® (3 % AI), Permethrin (5 % AI), Batestan® (20 % AI), Ectogan®

(IA), Bovithion® (68 % IA), Dursban® (24 % IA), Esteladon® (30 % IA), Asuntol® (20 % IA), Bayticol® (3 % IA), Permetrina (5 % IA), Batestan® (20 % IA), Ectogan® (Cyamizol 17.5 % + Cipermetrina high-cis 2.5 %) y Garraban® (Permetrina 5 % + Clorpirifos 29 %) en formulación concentrado emulsificable (CE) a la concentración comercial recomendada.

Para determinar la dosis discriminante del Amitraz (Taktic 12.5 % IA) se utilizó la prueba de "inmersión de larvas modificada" (9,10) en CE, y para los organofosforados y piretroides la prueba de "paquete de larvas" recomendada por FAO (4). El cálculo del porcentaje de control de los ixodíctidos formulados de uso común en México se realizó mediante la prueba de "inmersión de hembras repletas" (11).

La prueba de inmersión de larvas modificada consistió en colocar aproximadamente 300 larvas de la cepa "San Alfonso" en una caja Petri de vidrio de 15 cm de diámetro, entre dos papeles filtro Whatman No. 1 de 12.5 cm de diámetro, a la cual se le adicionaron 10 ml de la dosis discriminante del Amitraz (0.0002 %), y para los controles 10 ml de agua utilizando tres repeticiones por grupo con un tiempo de inmersión de 10 min. Posteriormente se formaron paquetes con papel Whatman No.1 de 7.5 x 8.5 cm, cerrándolos con broches de presión de 55 mm, a los que se introdujo con un pincel aproximadamente 100 larvas de 10 días de edad por repetición; posteriormente se selló el paquete con otro broche de presión. Estos paquetes de larvas se incubaron a 29° C y 80 a 90 de humedad relativa por 72 h. Posteriormente se realizó el conteo de larvas vivas y muertas para determinar el porcentaje de mortalidad larval; se consideraron larvas vivas las que presentaron movimientos, y muertas las inactivas.

Para la prueba de dosis discriminantes de OF y PS, se utilizaron larvas de *Boophilus microplus* de las cepas "Susceptible" generación F7 y "San Alfonso" con la generación F1 de diez días de edad (4). Los principios técnicos de los organofosforados fueron Coumafos 0.2 %, Diazinon 0.08 %, Clorfenvinfos 0.2 %; piretroides Flumetrina 0.01 %, Deltametrina 0.09 % y Cipermetrina 0.5 % (5). Se preparó una

(Cyamizole 17.5 % + Cypermethrin high-cis 2.5 %) and Garraban® (Permethrin 5 % + Chlorpyrifos 29 %) in emulsifiable concentrate formulation (EC) at the commercial recommended concentration.

In order to determine the discriminating dose of Amitraz (Taktic 12.5 % AI) a "modified larval immersion" test was used (9,10) in EC and for organophosphates and pyrethroids the "Larval Packet Test" recommended by FAO (4) was used. The estimate of the control percentage of the formulated ixodíctides commonly used in Mexico was performed by the "Adult immersion Test" (11).

The modified larval immersion test consisted in placing approximately 300 larvae of the "San Alfonso" strain in a 15 cm in diameter Petri dish, between two Whatman No. 1 filter papers of 12.5 cm in diameter to which 10 ml of the discriminating dose of Amitraz (0.0002%) was added and for the controls 10 ml of water was used, three repetitions per group were used and the immersion time of 10 min was used. After that, Whatman No. 1 papers were used to form 7.5 x 8.5 cm packets by closing them with 55 mm pressure clips, there was 100 larvae ten days-old per repetition and they were placed with a thin hair brush; after that the packet was sealed with another pressure clip. These larval packets were incubated at 29° C and 80 to 90 percent relative humidity during 72 hours. After that the alive and dead larvae were counted in order to determine the larvae mortality; larvae that moved were counted as alive, while the ones that did not move were counted as dead.

The determination of the discriminating doses of OP and SP, *Boophilus microplus* of the generation F7 "Susceptible" and generation F1 "San Alfonso" strains were performed (4). The technical compounds of the organophosphates were: Coumaphos 0.2 %, Diazinon 0.08 %, Chlorfenvinphos 0.2 %; pyrethroids Flumethrin 0.01 %, Deltamethrin 0.09 % and Cypermethrin 0.5 % (5). A stock solution was prepared to dissolve the ixodíctide in the mixture of olive oil (primary solvent) and trichloroethylene (volatile solvent) in a 1:2 proportion. Two repetitions were performed for each discriminative dose with a control group that only had the olive oil and

solución madre para disolver el acaricida en la mezcla de aceite de olivo (solvente primario) y tricloroetileno (solvente volátil) en una proporción de 1:2. Se realizaron dos repeticiones para cada dosis discriminante con un grupo control, conteniendo sólo la mezcla de aceite de olivo y tricloroetileno. Los papeles Whatman No.1 de 7.5 x 8.5 cm fueron impregnados con 0.67 ml con cada una de las dosis discriminantes y sus respectivos controles. Una vez que los papeles se secaron y se doblaron en forma de paquete cerrándolos con broches de presión de 55 mm, se introdujeron con un pincel aproximadamente 100 larvas de 10 días de edad; posteriormente se selló el paquete con otro broche de presión. Estos paquetes de larvas se incubaron a 29° C y 80 a 90 % de humedad relativa por 24 h. Al finalizar el tiempo de incubación se contaron las larvas vivas y muertas para determinar el porcentaje de mortalidad.

Se realizó la prueba de inmersión de hembras repletas⁽¹¹⁾ para calcular los porcentajes de control de los ixodicidas formulados de uso más común en México. Se utilizaron larvas de la generación F1 de la cepa "San Alfonso" y la generación F7 de la cepa "Susceptible". Previamente, se infestaron con larvas de diez días de edad dos bovinos Aberdeen Angus para obtener hembras adultas repletas de ambas cepas a los 21 días postinfestación. Se depositaron en cajas Petri de 9 cm de diámetro 10 garrapatas adultas repletas de *B. microplus* con un peso aproximado de 250 ± 20 mg, formándose dos grupos: uno tratado, y uno testigo, con cuatro repeticiones cada uno. Los lotes de garrapatas del grupo tratado se sumergieron por un minuto en el ixodicida formulado y los lotes testigo se sumergieron en agua. Posteriormente se incubaron a las condiciones de temperatura y humedad descritas por un periodo de 14 días. Se pesó la masa de huevos de cada lote y se colocó 1 g de huevos (aproximadamente 20,000 larvas) en viales de vidrio de 25 x 95 mm, los cuales se incubaron por 25 días y se determinó el porcentaje de eclosión larval para ambos grupos. Con los datos del peso de la masa de huevos y el porcentaje de eclosión larval se calculó el índice de reproducción⁽¹¹⁾, que se utilizó para determinar el porcentaje de control⁽¹²⁾

trichloroethylene mixture. The 7.5 x 8.5 cm Whatman No.1 paper were impregnated with 0.67 ml of each of the discriminative doses and their respective controls. Once the papers were dry and folded in packet form and closed with the 55 mm pressure clips, 100 larvae 10 day-old were introduced with a thin brush; after that the packet was sealed with another pressure clip. These larval packets were incubated at 29° C and 80 to 90 % relative humidity during 24 hours. At the end of the incubation time the alive and dead larvae were counted in order to determine the larvae mortality.

The adult immersion test⁽¹¹⁾ was performed in order to estimate the control percentages of the ixodicide formulas most commonly used in Mexico. Larvae of the F₁ generation of the "San Alfonso" and the F₇ generation of the "Susceptible" strains were used. Previously, two Aberdeen Angus steers were infested with 10-day-old larvae in order to obtain adult engorged females from both strains 21 days after infestation. Ten adult engorged females of *B. microplus* weighing approximately 250 ± 20 mg were deposited in 9 cm Petri dishes. Two groups were made, one treated and one control with four repetitions each. The tick lots of the treated group were immersed during one minute in the ixodicide formula and the control lots were immersed in water. After they were incubated at the conditions of temperature and humidity described above, for a period of 14 days. The egg masses of each lot was weighed and 1 g of eggs (approximately 20,000 larvae) were placed in 25 x 95 mm glass vials and incubated during 25 days. The egg hatching percentage was determined for both groups. The index of reproduction⁽¹¹⁾ was estimated with the data of the egg weight and egg hatching percentage and it was used to determine the control percentage⁽¹²⁾ with Amitraz, organophosphates, pyrethroids and mixtures.

Five concentrations were prepared from the organophosphates and pyrethroid technical compounds for the larval packet test. For Amitraz in EC 12 concentrations were employed with three repetitions, the mortality percentage was estimated and the 50% lethal concentration determined (LC₅₀).

con Amitraz, organofosforados, piretroides y mezclas.

Para la prueba de paquete de larvas se prepararon cinco concentraciones con principios técnicos de organofosforados y piretroides con dos repeticiones por concentración. Para Amitraz en CE se utilizaron 12 concentraciones con tres repeticiones y se calculó el porcentaje de mortalidad y se determinó la concentración letal 50 % (CL50).

Los resultados de la prueba de paquete de larvas se analizaron utilizando la metodología Probit mediante el programa Polo-PC⁽¹³⁾. Los índices de resistencia (IR) fueron calculados considerando la varianza y covarianza de la pendiente y la intercepción de cada regresión lineal con la CL50⁽¹⁴⁾.

La cepa "San Alfonso" presentó una mortalidad de larvas de 25.2 % con la dosis discriminante de Amitraz, observándose un mayor porcentaje de mortalidad con los ixodicidas organofosforados, que fueron el Clorfenvinfos y el Coumafos con 99.7 y 98.6 % respectivamente y para el Diazinon de 58.6 %. Para los piretroides Cipermetrina, Deltametrina y Flumetrina los porcentajes de mortalidad fueron de 37.5, 30.8 y 14.5 % respectivamente, existiendo una mayor resistencia a esta familia de ixodicidas (Cuadro 1).

Con respecto a las pruebas de inmersión de hembra repletas con la cepa "San Alfonso", el Amitraz mostró 22.8 % de control; para los organofosforados Dursban y Esteladon alcanzaron un control de 92.8 y 88.3 % para cada compuesto, el Asuntol y el Bovithion un 24.1 y 1.6 % respectivamente. Los piretroides Batestan, Bayticol y Permetrina presentaron un 29.0, 26.6 y 8.4 % de control para cada producto. Con las mezclas de ixodicidas el Ectogan obtuvo un 55.6 % y el Garraban® 35.0 % de control (Cuadro 2).

Para el organofosforado Coumafos se obtuvo con la cepa "Susceptible" una CL50 de 0.0276 y para "San Alfonso" 0.057, con un IR calculado de 2.07. El Clorfenvinfos presentó una CL50 de 0.035 en la cepa "Susceptible" y en la "San Alfonso" de 0.053 con un IR de 1.52; para el Diazinon la cepa "Susceptible" presentó una CL50 de 0.012 y la

The results of the larval packet test were subjected to Probit analysis using the software Polo-PC program⁽¹³⁾. The resistance indexes (RI) were estimated taking into account the variance and covariance of the slope and the interception of each linear regression with the LC₅₀⁽¹⁴⁾.

The "San Alfonso" strain had a larvae mortality of 25.2% with the discriminate dose of Amitraz, showing a higher mortality percentage with organophosphate ixodicides that were Chlorfenvinphos and Coumaphos with 99.7 y 98.6 % respectively and for Diazinon 58.6 %. For the pyrethroids Cypermethrin, Deltamethrin and Flumethrin the mortality percentages were 37.5, 30.8 and 14.5 % respectively, with a greater resistance to this family of ixodicides (Table 1).

In relation to the adult immersion test of the "San Alfonso" strain, Amitraz showed 22.8 % control; the organophosphates Dursban and Esteladon

Cuadro 1. Porcentajes de mortalidad obtenidos por la prueba de dosis discriminantes en larvas de la cepa "San Alfonso" de *Boophilus microplus* con diferentes familias de ixodicidas

Table 1. Mortality percentages obtained by the discriminative doses test in larvae of the "San Alfonso" strain of *Boophilus microplus* with different families of ixodicides

Ixodicide	Discriminative doses	Mortality
Control		0.0
AMIDINE ^a		
Amitraz	0.0002	25.2
ORGANOPHOSPHATES ^b		
Chlorfenvinphos	0.2	99.7
Coumaphos	0.2	98.6
Diazinon	0.08	58.6
PYRETHROIDS ^b		
Cipermetrin	0.5	37.5
Deltametrin	0.09	30.8
Flumetrin	0.01	14.5

^a Ixodicide formula

^b Ixodicide in technical compounds

“San Alfonso” una CL₅₀ de 0.080 con un IR de 6.96 (Cuadro 3). Con respecto a los piretroides Flumetrina, Deltametrina y Cipermetrina, no fue posible calcular los índices de resistencia debido al alto grado de homocigosis, lo que impidió obtener mortalidades a concentraciones superiores a las dosis discriminantes.

Con la prueba de inmersión larval modificada, utilizando el Amitraz en CE, el análisis probit indicó en la cepa “Susceptible” una CL₅₀ de 0.0001 y en la “San Alfonso” 0.00044, con un IR de 41.9 (Cuadro 3).

En México la presencia de resistencia a los ixodicidas ha tenido un periodo de aparición con las diferentes familias de ixodicidas utilizadas de aproximadamente siete años. El Amitraz en el país se empezó a utilizar en forma intensiva a principios de 1993, debido a la presencia y dispersión de la resistencia de *B. microplus* a los piretroides, por lo que el Amitraz se utilizó como una alternativa de control y posteriormente dentro de los programas

reached 92.8 and 88.3 % control for each compound, Asuntol and Bovithion reached 24.1 and 1.6 % control respectively. The pyrethroids Batestan, Bayticol and Permetrin had 29.0, 26.6 and 8.4 % control for each product. Ectogan with the ixodicides mixtures had 55.6 % and Garraban® 35.0 % control (Table 2).

For the Coumaphos organophosphate with the "Susceptible" strain a LC₅₀ of 0.0276 was obtained and for the "San Alfonso" strain 0.057, with an estimated RI of 2.07. The Chlorfenvinphos showed a LC₅₀ of 0.035 with the "Susceptible" strain and 0.053 with the "San Alfonso" strain with an RI of 1.52; for Diazinon the "Susceptible" strain showed a LC₅₀ of 0.012 and the "San Alfonso" strain a LC of 0.080 with a RI of 6.96 (Table 3). With respect to the pyrethroids Flumethrin, Deltamethrin and Cypermethrin the resistance indexes could not be estimated due to the high degree of homozygosis that did not allow the estimation of mortality at concentrations higher than the discriminating doses.

Cuadro 2. Porcentaje de control obtenido en garrapatas adultas de la cepa “San Alfonso” de *Boophilus microplus* con diferentes ixodicidas formulados en concentrado emulsificable

Table 2. Control percentage obtained in adult ticks from the strain “San Alfonso” *Boophilus microplus* with different ixodicides in emulsible concentrate formula

Ixodicide	Active component	RCC (%)	Control (%)
AMIDINE			
Tactic*	Amitraz	0.025	22.8
ORGANOPHOSPHATES			
Bovithion*	Ethion	0.068	1.6
Dursban*	Chlorpirophos	0.024	92.8
Esteladon*	Chlorfenvinphos	0.030	88.3
Asuntol*	Coumaphos	0.020	24.1
PYRETHROIDS			
Bayticol*	Flumetrin	0.030	26.61
Permetrina*	Permetrin	0.005	8.46
Batestan*	Cipermetrin	0.020	29.00
MIXES			
Ectogan*	Cyamizol+Cipermetrin high cis	0.030	55.6
Garraban*	Permetrin+Chlorfenvinphos	0.29	35.0

RCC= Recommended commercial concentration

* Commercial name in Mexico

intensivos de control en algunas explotaciones. El sistema de vigilancia implementado en México por las autoridades de Salud Animal para la detección temprana de la resistencia a los ixodicidas, permitió detectar el primer caso de resistencia al Amitraz en el país.

A nivel mundial se han presentado diversos patrones de resistencia al Amitraz como el caso en Australia en la cepa "Ulam" con resistencia cruzada al Cyamizol y Clorometiuron con una distribución en el área afectada de 14 casos en 1990 y que posteriormente se incrementó a 30 en 1998⁽⁷⁾. En 1992 en Australia se detectó la cepa denominada "Ultimo" que es resistente a todos los piretroides y al Amitraz de los que se mencionaron 40 casos⁽¹⁵⁾. El reporte de este estudio en México, presentó una similitud con la cepa "Ultimo", ya que la cepa "San Alfonso" presentó resistencia al Amitraz y a los piretroides evaluados. La frecuencia con la cual apareció la resistencia al Amitraz en Australia en la cepa "Ultimo" y que presentó características poligénicas, parece ser que son similares a la cepa mexicana⁽¹⁶⁾.

En Sudáfrica de 1996 a 1999 se han realizado estudios mediante pruebas de inmersión larval que indican el establecimiento de pocos casos de

With the modified larval immersion test, using Amitraz in EC, the Probit analysis indicated that the "Susceptible" strain had a LC₅₀ of 0.0001 and the "San Alfonso" strain 0.00044 with a RI of 41.9 (Table 3).

In Mexico, the presence of resistance to ixodicides has had a period of approximately seven years for the different families of ixodicides. At the beginning of 1993, Amitraz started to be used intensively in the country due to the presence and dissemination of *B. microplus* resistance to pyrethroids, and therefore Amitraz was used as an alternative to control and after that within the intensive control programs of certain farms. The surveillance system implemented in Mexico by the Animal Health Authorities for the early detection of resistance allowed the detection of the first Amitraz resistance case in the country.

World wide, Amitraz resistance patterns have been found such as the "Ulam" strain in Australia with a co-resistance with Cyamizole and Chloromethiuron with a distribution in the affected area of 14 cases in 1990 and after 30 cases were reported in 1998⁽⁷⁾. In 1992, in Australia a strain named "Ultimo" was found that is resistant to all the pyrethroids and to Amitraz of which 40 cases were reported⁽¹⁵⁾. The

Cuadro 3. Determinación de las concentraciones letales 50 e índices de resistencia de la cepa "San Alfonso" de *Boophilus microplus* con ixodicidas órganofosforados y Amitraz

Table 3. Determination of the lethal concentrations 50 and resistance indexes of the "San Alfonso" strain of *Boophilus microplus* with organophosphates and Amitraz ixodicides

	Ixodicide*	Slope (standard error)	LC ₅₀	CL ₉₅	Resistance index
"Susceptible"	Coumaphos	7.86 (0.58)	0.027	(0.022-0.034)	
"San Alfonso"		4.32 (0.25)	0.057	(0.048-0.068)	2.0
"Susceptible"	Chlorfenvinphos	7.29 (0.55)	0.035	(0.030-0.039)	
"San Alfonso"		4.33 (0.23)	0.053	(0.048-0.060)	1.5
"Susceptible"	Diazinon	9.01 (0.87)	0.012	(0.010-0.014)	
"San Alfonso"		2.50 (0.19)	0.080	(0.059-0.148)	6.9
"Susceptible"	Amitraz**	2.24 (0.08)	0.0001	(0.00001-0.00002)	
"San Alfonso"		1.46 (0.054)	0.00044	(0.00032-0.00061)	41.9

* Technical grade

** Emulsible concentrate

LC₅₀= Lethal concentration 50; CL₉₅= Confidence Level at 95 %

resistencia al amitraz, baja incidencia de resistencia a organofosforados y alta a piretroides⁽¹⁷⁾. En este estudio con el Amitraz se obtuvo un 25.2 % de mortalidad en larvas, lo que indica que se ha estado ejerciendo en esa población una alta presión de selección durante un tiempo considerable, sin haber sido detectada como falla de control a nivel de campo, pasando desapercibido en la explotación de la resistencia al Amitraz, considerando que los principales efectos de Amitraz son la inducción de la hiperactividad, derribe de la garrapata *B. microplus* del hospedero⁽¹⁸⁾ y la mortalidad de larvas.

Estudios con la cepa brasileña "Cavalcanti" resistente al Amitraz y piretroides, colectada en Río Grande del Sur, presentó un 93.4 % de control con Amitraz y un promedio de control de 1.5 % con los piretroides Deltametrina, Cipermetrina, Alfametrina y Flumetrina⁽¹⁹⁾; estudios posteriores con una cepa de *B. microplus* de la misma región de Brasil, se obtuvo un 47.5 % de control con el Amitraz. En el caso de la cepa mexicana "San Alfonso" presentó un porcentaje de control de 22.8 % con el Amitraz, que indica una mayor resistencia en comparación con las cepas brasileñas. Con respecto a los organofosforados, el Asuntol® con la cepa "San Alfonso" logró un 24.1 % de control en pruebas de hembras repletas mientras que con la cepa "Cavalcanti" un 50.4 %, para la mezcla Ectogan se obtuvo un 55.6 % de control con la cepa "San Alfonso" y con la cepa brasileña fue de 79.4 %⁽²⁰⁾.

El porcentaje de control obtenido con el Amitraz a la concentración recomendada fue de 22.8 % en la cepa "San Alfonso", lo que implica que en ranchos con ganado infestado con este tipo de cepa, duplicar la concentración para obtener un control adecuado no sería recomendable. Según estudios realizados, el incremento de la concentración del Amitraz no tiene ningún efecto para elevar significativamente el porcentaje de control; si esa medida es aplicada, por la presencia de heterocigotos resistentes a este ixodida, se seleccionarán individuos resistentes, incrementando la probabilidad de generar altos niveles de resistencia homocigótica⁽¹⁶⁾. Bioensayos realizados en la región de Río Grande del Sur en Brasil con garrapatas adultas de *B. microplus*,

report of this study in Mexico shows certain similarity with the "Ultimo" strain since the "San Alfonso" strain was co-resistant to Amitraz and to pyrethroids. The frequency with which the Amitraz resistance presented itself in the "Ultimo" strain in Australia, and the polygenetic characteristics seems to be similar to the Mexican strain⁽¹⁶⁾.

In South Africa from 1996 to 1999 studies have been done with larval immersion tests that indicate the establishment of few Amitraz resistance cases, low incidence of organophosphate resistance and high to pyrethroid resistance⁽¹⁷⁾. In this study, with Amitraz, 25.2% of mortality in larvae was obtained and it indicates that there has been a high selection pressure on the population during a considerable time, without having detected control failures in the field, and therefore the Amitraz resistance was not observed in the ranch taking into consideration the fact that the main effects of Amitraz are the induction of hyperactivity, drop off of the *B. microplus* tick from the host⁽¹⁸⁾ and larvae mortality.

Studies made with the Brazilian "Cavalcanti" strain co-resistant to Amitraz and pyrethroids, taken from Rio Grande do Sul showed 93.4 % control with Amitraz and a 1.5 % control average with the pyrethroids Deltamethrine, Cypermethrine, Alfamethrine y Flumethrine⁽¹⁹⁾; later studies with a *B. microplus* strain of the same region of Brazil had a 47.5 % control with Amitraz. In the case of the Mexican strain "San Alfonso" it had a control percentage of 22.8 % with Amitraz, fact that indicates a greater resistance as compared to the Brazilian strains. In relation to the organophosphates, Asuntol® with the "San Alfonso" strain achieved a 24.1 % control in adult immersion test while the strain "Cavalcanti" a 50.4 %, for the mixture Ectogan a 55.6% control was obtained with the strain "San Alfonso" and for the Brazilian strain it was 79.4 %⁽²⁰⁾.

The control percentage obtained with Amitraz at the recommended concentration was 22.8 % in the strain "San Alfonso" which implies that for the ranches with infested cattle with this type of

indicaron una susceptibilidad al Amitraz y resistencia a organofosforados, piretroides y mezclas⁽²¹⁾, por lo que la resistencia al Amitraz en Brasil presentó también una dispersión limitada similar a lo que ocurrió en Australia y en México.

Los reportes de casos de resistencia al Amitraz en Australia, Sudáfrica, y algunos países de Sudamérica⁽¹⁶⁾ se han hecho utilizando los bioensayos disponibles en los estadios de larvas y adultas; sin embargo, con los resultados obtenidos en las pruebas de inmersión larval no se han podido calcular los índices de resistencia hacia las cepas estudiadas, debido a las características de este tipo de resistencia, las pruebas de paquetes de larvas no han mostrado resultados repetibles, ni se obtienen mortalidades del 100 %, ya que relaciones dosis-mortalidad muestran pendientes horizontales. Con la técnica de inmersión larval modificada^(9,10) fue posible estimar la $CL_{99,9}$ para determinar la dosis discriminante y estimar la CL_{50} de la cepa susceptible y resistente, con lo que se calculó el factor de resistencia en la cepa "San Alfonso". Lo anterior hace necesario establecer diagnósticos de resistencia a nivel larval para el Amitraz, cuyos resultados puedan ser comprobados en bioensayos con garrapatas adultas. Actualmente otros investigadores han realizado pruebas mediante la técnica modificada de paquete de larvas, para calcular la dosis discriminante del Amitraz, utilizando como sustrato papel nylon y el ixodicida formulado disuelto en aceite de olivo y tricloroetileno, lo que ha permitido obtener resultados repetibles, alcanzándose el 100 % de mortalidad para calcular la dosis discriminante del Amitraz⁽²²⁾.

Se concluye que se ha podido documentar el primer caso de resistencia al Amitraz en garrapatas *B. microplus* y que es necesario establecer programas preventivos para evitar la dispersión de este problema en México.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece el apoyo recibido por el Director General de Salud Animal MVZ Juan Garza Ramos

strain, a two fold of the doses is not to be recommended. According to the studies that were performed, the increase in the concentration of Amitraz does not have any affect in increasing significantly the control percentage; if this measure is applied, due to the presence of heterozygotes resistant to this ixodicide, resistant individuals shall be selected, increasing the probability of generating high levels of homozygosis resistance⁽¹⁶⁾. Bioassays performed in the region of Rio Grande do Sul in Brazil with *B. microplus* adult ticks indicated Amitraz susceptibility and resistance to organophosphates, pyrethroids and mixtures⁽²¹⁾, and therefore the Amitraz resistance in Brazil also showed a limited dispersion, similar to what occurred in Australia and in Mexico.

The cases of Amitraz resistance reported in Australia, South Africa and certain South America countries⁽¹⁶⁾ have been identified using the available bioassays in the larval and adult stages; nevertheless, with the results obtained in the larval immersion test it has not been possible to estimate the resistance index, on the strains studied due to the characteristics of this type of resistance, the larval packet test have not shown repeatable results nor are mortalities of 100 % obtained since the relationship doses-mortality shows horizontal slopes. With the modified larval immersion techniques^(9,10) it was possible to estimate the LC_{50} of the susceptible and the resistant strains, and therefore the resistance index of the "San Alfonso" strain was estimated. The facts stated above make it necessary to establish the resistance diagnosis at the larval stage for Amitraz, whose results may be proven in bioassays with adult ticks. At the present time other researchers have performed tests by the modified larval packet technique, in order to estimate the discriminating doses for Amitraz, using nylon paper as a substrate and the ixodicide formulated dissolved in olive oil and trichloroethylene, and this has allowed repeatable results, reaching a 100 % mortality to estimate the discriminating doses of Amitraz⁽²²⁾.

The conclusion is that it has been possible to document the first case of Amitraz resistance in *B. microplus* ticks and that it is necessary to establish preventive programs to avoid the spread of this problem in Mexico.

y el Director del Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal (CNSCSA) MVZ Igor Romero Sosa, así como la colaboración del personal técnico del Departamento de Ectoparásitos y Dípteros del CNSCSA. Se agradece la amable revisión al manuscrito por parte del Dr. Rodrigo Rosario Cruz del CENID-PAVET, INIFAP, y al MVZ Martín Ortiz Estrada del laboratorio LAPISA S.A. de C.V. la aportación de la muestra de campo de *B. microplus* utilizada en este trabajo.

LITERATURA CITADA

1. FAO. Control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten. Manual práctico de campo. FAO. 1987.
2. Ortiz EM. Uso de ixodicidas en México. II Seminario Internacional de Parasitología Animal. "Garrapatas y enfermedades que transmiten". SARH UNAM-UAEM-IICA-INIFAP. Oaxtepec, Mor. Méx. 1991:57-65.
3. Aguirre EJ, Santamaría VM. Purificación y caracterización toxicológica de garrapatas *B. microplus* resistentes a ixodicidas organofosforados y organoclorados [resumen]. VII Reunión Anual. Asoc. Méx. de Parasitología Veterinaria, A.C. Cd. Victoria, Tamps. México. 1986.
4. Stone BF, Haydock KP. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *B. microplus* (Can.). Bull Entomol Res 1968;(53):563-578.
5. Santamaría VM. Determinación de las dosis discriminantes a tres piretroides sintéticos en la cepa *Boophilus microplus* susceptible Cenapa. II Congreso nacional de parasitología veterinaria. Veracruz, México. 1992.
6. Ortiz EM, Santamaría VM, Ortiz NA, Soberanes CN, Osorio MJ, Franco BR, Martínez IF, Quezada DR, Fragoso SH. Caracterización de la resistencia de *B. microplus* a ixodicidas en México. III Seminario internacional de parasitología animal. "Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria". SAGAR-CANIFARMA-FAO-IICA-INIFAP. Acapulco, Gro. Méx. 1995:58-66.
7. Kemp HD, Gale RK, Nari A, Sabatini AG. Acaricide resistance in the cattle ticks *Boophilus microplus* and *B. decoloratus*: Review of resistance data; standardization of resistance tests and recommendations for the integrated parasite control to delay resistance. Report to Animal Health Services AGAH, FAO. CSIRO Tropical Agriculture, Long Pocket Laboratories, Queensland, Australia. 1998.
8. Kunz ES, Kemp HD. Insecticides and acaricides: Resistance and environmental impact. Rev Sci Tech Off Int Epiz 1994;(13):1249-1286.
9. Shaw RD. Culture of an organophosphorus resistant strain of *B. microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. Bull Entomol Res 1966;56:389-405.
10. Santamaría VM, Soberanes CN. Modificación a la prueba de inmersión larval para determinar la susceptibilidad al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* [en prensa]. J Econ Entomol 2001.

ACKNOWLEDGEMENTS

We wish to thank MVZ Juan Garza Ramos, head of the General Animal Health Division and MVZ Igor Romero Sosa, head of the National Centre for Animal Health Certification Services, as well as the cooperation of the technical personnel of the Ectoparasites Department of CNSCSA. We would like to acknowledge the kind revision of the manuscript performed by Dr. Rodrigo Rosario Cruz from CENID-PAVET, INIFAP, and MVZ Martín Ortiz Estrada from LAPISA S.A. de C.V. laboratory for provided the field sample of *B. microplus* used in this study.

End of english version

11. Drummond OR, Ernst ES, Treviño LJ, Gladney JW, Graham HO. Tests of acaricides for control of *Boophilus annulatus* and *B. microplus*. J Econ Entomol 1976;(69):37-40.
12. Abbott WJ. A method for computing effectiveness of and insecticide. J Econ Entomol 1925;(18):265-267.
13. Le Ora Software. A user's guide to probit for logit analysis. Le Ora Software, Berkeley, CA. 1987.
14. Robertson LJ, Preisler KH. Pesticide bioassays with arthropods. Boca Raton, FL. USA: CRC Press; 1992.
15. Nolan J. Current developments in resistance to amidine and pyrethroid tickicides. In: Whitehead GB, Gibson JD editors. Australia tick biology and control. Tick Research Unit. Rhodes University Grahamstown. 1981:109-114.
16. Kemp HD, McKenna VR, Thullner R, Willandsen, T. Strategies for tick control in a world of acaricides resistance. IV Seminario internacional de parasitología animal. "Control de la resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten". CONASAG-INIFAP-INFARVET-IICA-AMPAVE-FILASA. Puerto Vallarta, Jal. México. 1999:1-10.
17. Strydom T, Peter R. Acaricides and *Boophilus spp* resistance in South Africa. IV Seminario internacional de parasitología animal. "Control de la resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten". CONASAG-INIFAP-INFARVET-IICA-AMPAVE-FILASA. Puerto Vallarta, Jal. México. 1999:35-40.
18. Stone BF, Atkinson PW, Knowles CO. Formamidine structure and detachment of the cattle tick *Boophilus microplus*. Pest Biochem Physiol 1974;(4):407-416.
19. Martins RJ, Correa LV, Cereser HV, Arteche PCC. A situation report on resistance to acaricides by the cattle tick *Boophilus microplus* in the State of Rio Grande Do Sul Southern Brazil. III Seminario internacional de parasitología animal. "Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria". SAGAR-CANIFARMA-FAO-IICA-INIFAP. Acapulco, Gro. Méx. 1995:1-8.
20. Furlong J. Diagnosis of the susceptibility of the cattle tick, *Boophilus spp* to acaricides in Minas Gerais State, Brazil. IV

Seminario internacional de parasitología animal. "Control de la resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten". CONASAG-INIFAP-INFARVET-IICA-AMPAVE-FILASA. Puerto Vallarta, Jal. México. 1999:41-46.

21. Farias RN. The situation of acaricide resistance in the cattle tick *Boophilus microplus* in the State of Rio Grande Do Sul, Southern Brazil. IV Seminario internacional de parasitología animal.
22. Miller RJ, George JE, Guerrero F, Carpenter L, Welch JB. Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (laetrile) (Acari: Ixodidae) collected from Corazol Army Veterinary. J Med Entomol 2001;38(2):298-302.