

Prevalencia de lecherías con *Boophilus microplus* resistentes a piretroides y factores de riesgo asociados a su presencia en el Departamento de Santa Cruz, Bolivia

Prevalence and potential risk factors for pyrethroids resistance in *Boophilus microplus* ticks on milk farms in Santa Cruz Department, Bolivia

Marbel Villarroel-Alvarez^a, Roger Iván Rodríguez-Vivas^a, Fidel Villegas-Anze^b, Hugo Fragoso-Sánchez^c, Alejandrina Ortiz-Nájera^c, Salvador Neri-Orantes^c

RESUMEN

Se realizó un estudio de sección cruzada para determinar la prevalencia de ranchos con garrapatas *Boophilus microplus* resistentes a piretroides sintéticos (PS), así como posibles factores de riesgo en la Zona Integrada del Departamento de Santa Cruz, Bolivia. Se muestrearon 83 ranchos, donde se colectaron al menos 10 teoginas de *B. microplus* para evaluar en su progenie la respuesta a los PS. Se utilizó la prueba de paquete de larvas, con la dosis discriminante para diagnosticar resistencia a flumetrina (0.01%), deltametrina (0.09%) y cipermetrina (0.05%). Como referencias se evaluaron tres tipos de conductas reportadas en Australia y México: Marmor resistente a deltametrina y cipermetrina, Parkhurst resistente a flumetrina, deltametrina y cipermetrina, y una conducta encontrada por primera vez denominada Santa Cruz (resistente a deltametrina). Para explorar los potenciales factores de riesgo asociados a la presencia de garrapatas resistentes a PS se aplicó una encuesta en cada explotación. La prevalencia de lecherías resistentes a PS fue del 92.7 %. El 42.2 % fue resistente a flumetrina, 88.0 % a deltametrina y 75.9 % a cipermetrina. La prevalencia para cada una de las conductas fue: Marmor 32.5 %, Parkhurst 38.5 % y Santa Cruz 14.4 %. Se identificaron factores de riesgo para las conductas tipo Marmor (pastoreo en áreas comunales) y Parkhurst (pastoreo en terreno propio). Se concluye que la prevalencia de lecherías con *B. microplus* resistentes a PS es un problema actual en la zona, y el tipo de pastoreo es un factor de riesgo en el desarrollo de resistencia a los comportamientos tipo Parkhurst y Marmor.

PALABRAS CLAVE: Resistencia, Ixodicidas, *Boophilus microplus*, Piretroides, Flumetrina, Deltametrina, Cipermetrina.

ABSTRACT

A cross-sectional study was done of the association between risk factors and the prevalence of *Boophilus microplus* ticks resistant to synthetic pyrethroids (SP) in Santa Cruz Department, Bolivia. Eighty-three dairy farms were randomly selected and a sample of 10 to 50 engorged female *B. microplus* ticks collected at each. Tick progeny were produced to test for SP resistance. The Larval Packet Test with a discriminating dose was done to detect flumethrin (0.01%), deltamethrin (0.09%) and cypermethrin (0.05%) resistance in the ticks. Two reference strains with a specific response type (previously reported in Australia and Mexico) were used: Marmor (resistance to deltamethrin and cypermethrin) and Parkhurst (resistance to flumethrin, deltamethrin and cypermethrin). A third response type of resistance to deltamethrin was identified for the first time in this study and called the Santa Cruz type. Overall prevalence of pyrethroids-resistant ticks among the sampled farms was 92.7%. Flumethrin resistance was observed at 42 % of the farms, deltamethrin resistance at 88.0 % and cypermethrin resistance at 75.9 %. Response type prevalence was: Marmor 32.5 %; Parkhurst 38.5 %; and Santa Cruz 14.4 %. The risk factor significantly associated with occurrence of the Marmor-type response was grazing in public areas, and that significantly associated with occurrence of the Parkhurst-type response was grazing on producer property. The high prevalence of SP-resistant *B. microplus* tick populations on dairy farms in Santa Cruz Department poses a problem for production, and grazing practices is a risk factor for the presence of the Marmor- and Parkhurst-type responses.

KEY WORDS: Resistance, Acaricides, *Boophilus microplus*, Pyrethroids resistance, Flumethrin, Deltamethrin, Cypermethrin.

Recibido el 2 de marzo de 2005 y aceptado para su publicación el 7 de septiembre de 2005.

^a Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. Km 15.5 carretera Mérida-Xmatkui 97100. Mérida, Yucatán, México. Tel: +52-999-9423200. rvivas@tunku.uady.mx. Correspondencia al segundo autor.

^b Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Veterinario (LIDIVET), Santa Cruz, Bolivia.

^c Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. SAGARPA.

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas y enfermedades que transmiten, son una de las principales limitantes de la explotación de bovinos en el mundo. El problema depende de la región, especies de garrapata presentes, agente transmisor, así como de la situación socioeconómica y el avance tecnológico en la aplicación de las medidas de control⁽¹⁾. Dentro de las garrapatas más problemáticas encontramos al género *Boophilus*, y de las cinco especies que integran a este género a nivel mundial, dos de ellas, *B. microplus* y *B. annulatus* se encuentran en Bolivia⁽²⁾.

El impacto económico negativo de *B. microplus* a la ganadería se debe a efectos directos e indirectos⁽¹⁾. Su efecto directo sobre la producción, es resultado del daño a las pieles por acción de las picaduras, pérdida de sangre y efectos tóxicos. Además existe un efecto directo sobre la ganancia de peso de los animales y en la producción de leche⁽³⁾. Las garrapatas también producen bajas en la fertilidad del ganado, mayor tiempo de la engorda y dificultad en la importación de razas mejoradas para incrementar la calidad genética en áreas infestadas por garrapatas⁽⁴⁾. El efecto indirecto está dado por los agentes que transmiten como *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* y *Anaplasma marginale*⁽⁵⁾.

La estrategia más utilizada para el control de garrapatas, consiste en la aplicación de ixodicidas sobre el cuerpo de los animales infestados a intervalos específicos determinados por la región ecológica, especies a las que va a combatir y eficacia residual del ixodicida. Los productos que se han utilizado para el control de las garrapatas incluyen los arsenicales (AS), organoclorados (OC), organofosforados (OF), carbamatos (CA), piretroides sintéticos (PS), amidinas (AM) y lactonas macrocíclicas (LM) (FAO, 1987). Los ixodicidas han sido utilizados con éxito en el control de las garrapatas; sin embargo, su uso irracional ha ocasionado la generación de cepas de garrapatas resistentes a la acción de estos productos químicos⁽⁶⁾.

En Bolivia, los ixodicidas que se encuentran en el mercado nacional y que se utilizan para el control de las garrapatas son en su mayoría PS y en menor

INTRODUCTION

Ticks and tick-borne diseases are one of the most significant threats to animal health in the cattle industry worldwide. The extent of the problem depends on the region, tick species, agents, social and economic variables and the type of technology employed in tick control⁽¹⁾.

The five tick species in the *Boophilus* genus are among the most frequent affecting cattle worldwide, and of these *B. microplus* and *B. annulatus* are known to exist in Bolivia⁽²⁾. The negative impact of *B. microplus* in the cattle industry is a combination of direct and indirect effects⁽¹⁾. Direct effects on production include skin damage from tick bites, blood loss, toxicity from the bites, reduced animal weight gain and milk production⁽³⁾, low fertility, increased feeding time, and difficulties for introducing improved cattle breeds into tick-infested areas⁽⁴⁾. Indirect effects are related to tick-borne agents such as *Babesia bovis*, *Babesia bigemina* and *Anaplasma marginale*⁽⁵⁾.

Acaricides are the most common tick control method. They are applied to infested animals at specific intervals determined by ecological region, tick species and residual acaricide effect. Chemicals that have been used in tick control include arsenicals (AS), organochlorines (OC), organophosphates (OP), carbamates (CA), synthetic pyrethroids (SP), amidines (AM) and macrocyclic lactones (ML). Acaricides have been used efficiently for tick control but extensive application of them has generated tick populations resistant to some of the chemicals used as acaricides⁽⁶⁾.

Both SP and AM are commercially available in Bolivia, and are therefore the two predominant acaricides used for tick control in the country. No formal data on tick acaricide resistance in Bolivia is currently available, but producers and veterinarians have reported treatment inefficacy in field conditions. Some level of tick acaricide resistance clearly exists in the region, but research is needed in high cattle and milk production areas, like Santa Cruz Department, to generate basic data for implementation of future tick control measures. The present study objective was to determine the

cantidad AM. Hasta el momento no se cuenta con información relacionada con la resistencia de las garrapatas a los ixodídeos, a pesar de que en el campo los médicos veterinarios y ganaderos observan que los tratamientos no son efectivos. Todo esto pone de manifiesto la importancia del problema de resistencia de las garrapatas a los ixodídeos, y la necesidad de estudios en áreas donde la actividad ganadera se desarrolla en gran escala, como es el caso de la Zona Integrada del Departamento de Santa Cruz, lo que permitirá generar información básica para implementar futuras estrategias de control. El objetivo del presente estudio fue determinar la prevalencia de ranchos bovinos especializados en la producción de leche (lecherías) con garrapatas *B. microplus* resistentes a PS y factores de riesgo asociados a su presentación, en la Zona Integrada del Departamento de Santa Cruz, Bolivia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio

El presente estudio se llevó cabo en la Zona Integrada del Departamento de Santa Cruz, Bolivia, situado entre los 13° 30' y 20° 30' Sur y 51° 20' y 64° 50' Oeste. La zona limita geográficamente al norte con el paralelo 17° 00' 00", al este con el límite natural del Río Grande, al oeste con el Río Yapacani y al sur con el paralelo 17° 56' 36". Esta área comprende cinco provincias: Andrés Ibañez, Obispo Santistevan, Sara, Ichilo y Warnes⁽⁷⁾.

La altura varía entre los 300 a los 500 msnm, con una vegetación natural de bosque alto, excepto algunas áreas de pastizales. El clima es tropical húmedo, con precipitaciones pluviales máximas de 4,000 mm anuales y mínimas de 939.9 mm, con una media anual de 1,305 mm. La época de lluvias abarca los meses de octubre a marzo, siendo enero y febrero los meses más lluviosos. Existe una época de marcada sequía que abarca los meses de agosto a septiembre. La temperatura media anual es de 22 °C, con variaciones que van de 0.5 °C como mínima a 41 °C como máxima⁽⁷⁾.

En la zona la ganadería bovina especializada en producción de leche tiene un gran impacto. Las

prevalence and risk factors of *B. microplus* resistance to SP at dairy farms in the Zona Integrada of Santa Cruz Department, Bolivia.

MATERIALS AND METHODS

Study area

The study area was the Zona Integrada of Santa Cruz Department, Bolivia, (13°30', 20°30' S; 51°20', 64°50' E). The Zona is geographically delimited on the north by parallel 17°00'00"; to the east by the Grande River; to the west by the Yapacani River; and to the south by parallel 17°56'36". It is divided into the five provinces of Andrés Ibañez, Obispo Santistevan, Sara, Ichilo and Warnes⁽⁷⁾.

Altitude in the study area varies from 300 m to 500 m asl, and vegetation is natural forest vegetation, save for some areas converted to pasture. Climate in the area is predominantly tropical subhumid, with maximum annual rainfall of 4,000 mm, minimum of 939.9 mm, and an annual average of 1,305 mm. The rainy season is from October to March, with maximum rainfall occurring in January and February, and there is a dry season from August to September. Annual mean temperature is 22 °C, varying from 0.5 °C (minimum) to 41 °C (maximum)⁽⁷⁾.

Dairy production is an important aspect of the livestock-production systems in the area. The health, nutritional and infrastructure conditions at farms in the area vary according to producer resources. One of the most common parasites of cattle in the area is *B. microplus*. This parasite is currently controlled using SP-group acaricides since OC and OP were removed from the market in Santa Cruz over the last 15 yr⁽⁸⁾.

Study population

The study population was taken from the Department Federation of Milk Producers (Federación Departamental de Productores de Leche - FEDEPLE) registry of dairy farms in all five provinces of the Zona. As of May 2001, 599 dairy farms with at least 20 head of cattle were included in the registry.

prácticas de manejo sanitario, nutricional e infraestructura varían de acuerdo a la disponibilidad de recursos del productor. Dentro de los principales problemas parasitarios que afectan al ganado bovino se encuentra la garrapata *B. microplus*. Las medidas de control para este parásito se basan principalmente en el uso de ixodicidas del grupo de los PS, ya que los OC y OF fueron retirados del mercado de Santa Cruz, Bolivia en los últimos 15 años⁽⁸⁾.

Población de estudio

Se emplearon explotaciones de ganado bovino de leche, que de acuerdo al catastro de la Federación Departamental de Productores de Leche (FEDEPLE), hasta mayo del 2001 reportó un total de 599 explotaciones lecheras que tienen al menos 20 cabezas. Estas explotaciones se encuentran distribuidas en las cinco provincias que componen dicha zona.

Diseño del estudio y tamaño de muestra

Se diseñó un estudio epidemiológico de sección cruzada de diciembre del 2001 a marzo del 2002. El tamaño de muestra fue de 83 lecherías y se obtuvo con el paquete estadístico EPISCOPE 2.0 utilizando un nivel de confianza del 95%, un error del 10% y una prevalencia de la resistencia del 50% (se tomó la máxima probabilidad por carecer de información).

Selección de la unidad de muestreo y levantamiento de encuestas

La selección de las explotaciones fue al azar, con base en un listado de explotaciones proporcionada por la FEDEPLE. Durante el muestreo se aplicó una encuesta que proporcionó información relativa al tamaño de la explotación, manejo de los animales, tipo de ganado explotado y antecedentes sobre el uso de ixodicidas. La información se obtuvo por medio de una entrevista semi-estructurada y dirigida al propietario o encargado de la explotación.

Obtención y procesamiento de muestras

De cada explotación se colectaron de 10 a 50 teleoginas de *B. microplus* recolectadas de cuando menos cinco bovinos, las cuales fueron depositadas en tubos de ensayo tapados con algodón y trans-

Study design and sample size

An epidemiological cross-sectional study was done between December 2001 and March 2002. Sample size (83 dairy farms) was calculated using the statistical package EPISCOPE 2.0 and the parameters: 95% confidence level; 10% error; and 50% expected prevalence (maximum probability was used due to lack of data).

Sample unit selection and questionnaires

Farms were randomly selected from the FEDEPLE register. After selection, a questionnaire was administered addressing farm size, animal management, animal type and acaricide use, and producers or managers were interviewed to collect additional data.

Sample collection and analysis

At each farm, samples of 10 to 50 engorged female *B. microplus* were collected from at least five animals. Ticks were placed in glass tubes capped with cotton and taken to the Veterinary Research and Diagnosis Laboratory (Laboratorio de Investigacion y Diagnostico Veterinario - LIDIVET). Here they were placed in Petri dishes and incubated in darkness at 27 ± 2 °C and 80 to 90% relative humidity⁽⁹⁾ to allow oviposition. For larvae eclosion, deposited eggs were placed in glass tubes capped with cotton and kept at the same temperature and humidity as the engorged females.

Resistance diagnosis

Diagnosis of SP resistance was done with the modified larval packet test developed by Stone & Haydock⁽¹⁰⁾, using larvae from 7 to 14 d of age⁽¹¹⁾. Larvae were evaluated using discriminating doses determined from a reference strain kept under laboratory conditions. Discriminating doses were administered that are double the acaricide concentration deemed necessary to kill 99.9% of a susceptible tick population: flumethrin (0.01%); deltamethrin (0.09%); and cypermethrin (0.05%)⁽¹²⁾. Results were recorded 24 h post-treatment⁽¹³⁾.

Larval mortality in the larval package test was calculated with the formula⁽¹³⁾:

portadas al Laboratorio de Investigación y Diagnóstico Veterinario (LIDIVET). Las teleoginas fueron depositadas en cajas de Petri e incubadas en oscuridad a una temperatura de 27 ± 2 °C y humedad relativa de 80 a 90 %⁽⁹⁾ para permitir la oviposición. Los huevos obtenidos fueron depositados en viales de cristal tapados con algodón, en las mismas condiciones de temperatura y humedad que las teleoginas para permitir la eclosión de las larvas.

Diagnóstico de la resistencia

El diagnóstico de la resistencia a los PS se realizó mediante la técnica de paquetes de larvas desarrollada por Stone y Haydock⁽¹⁰⁾, usando larvas de 7 a 14 días de edad⁽¹¹⁾. Las larvas fueron evaluadas mediante dosis discriminantes, establecidas con cepas susceptibles de referencia y mantenidas en laboratorio, las cuales fueron: flumetrina (0.01%), deltametrina (0.09%) y cipermetrina (0.05%)⁽¹²⁾. La lectura de la prueba se efectuó a las 24 h postratamiento⁽¹³⁾. Se consideró como dosis discriminante, al doble de la concentración de ixodicida que mata al 99.9 % de una población de garrapatas susceptible.

Para calcular la mortalidad de las larvas con la técnica de paquetes de larvas se utilizó la siguiente fórmula⁽¹³⁾:

$$\% \text{ mortalidad} = \frac{\text{larvas muertas} \times 100}{\text{larvas totales}}$$

Análisis estadísticos

Se calculó la prevalencia mediante la siguiente fórmula⁽¹⁴⁾:

$$\frac{\text{No. lecherías con garrapatas resistentes al ixodicida}}{\text{No. total de lecherías muestreadas}} \times 100$$

Las variables dependientes se basaron en el tipo de conducta que presentan las garrapatas *B. microplus* a los piretroides, y que han sido caracterizadas en Australia y México^(15,16):

a) Conducta tipo Marmor: garrapatas resistentes a deltametrina y cipermetrina pero susceptibles a flumetrina ⁽¹⁵⁾.

$$\% \text{ mortality} = \frac{\text{Dead larvae} \times 100}{\text{Total larvae}}$$

Statistical analysis

The prevalence of dairy farms with *B. microplus* ticks resistant to SP was calculated with the formula⁽¹⁴⁾:

$$\text{Prevalence} = \frac{\text{No. dairy farms with SP-resistant ticks} \times 100}{\text{Total No. sampled dairy farms}}$$

Dependant variables were based on the type of *B. microplus* response to pyrethroids as characterized in Australia and Mexico^(15,16):

a) Marmor-type⁽¹⁵⁾ response: Ticks resistant to deltamethrin and cypermethrin, but susceptible to flumethrin.

b) Parkhurst-⁽¹⁵⁾ or San Jorge and Mora-⁽¹⁶⁾ type response: Ticks resistant to flumethrin, deltamethrin and cypermethrin.

c) Response type identified here but not reported as a reference strain in Australia or Mexico.

The independent variables and corresponding terms were: stocking density in animal unit per hectare (≤ 1 AU/ha, >1 AU/ha); time using current acaricide (≤ 1 year, >1 year); doses (recommended, other); treatment interval/year (<6 times/year, ≥ 6 times/year); acaricide rotation (yes, no); other tick control method (yes, no); use of chemicals for fly control (yes, no); and grazing practices (producer property, public areas).

Degree of association between the independent and response variables was determined by analyzing the data in 2 x 2 contingency tables using the Epi Info v. 6.02⁽¹⁷⁾ program. The significance level of each association was calculated with an X² test, and independent variables with $P \leq 0.20$ were included in a logistic regression analysis. Those independent variables identified in the X² with $P < 0.20$ were analyzed with the Statistix Version 2.1 program⁽¹⁸⁾. The odds ratios were calculated to establish the strength of association between the risk factors and the presence of SP resistance; the

b) Conducta tipo Parkhurst⁽¹⁵⁾ o San Jorge y Mora⁽¹⁶⁾: garrapatas resistentes a flumetrina, deltametrina y cipermetrina.

c) Conducta que se encuentre y que no haya sido reportada como de referencia en Australia y México.

Las variables independientes y sus categorías correspondientes fueron las siguientes: carga animal en unidades animales por hectárea (≤ 1 UA/ha, >1 UA/ha), tiempo que usa el ixodicida actual (≤ 1 año, >1 año), dosis (recomendada, no recomendada), frecuencia de baños/año (<6 veces/año, ≥ 6 veces/año), rotación de ixodicidas (sí, no), uso de otra alternativa de control (sí, no), uso de químicos para el control de moscas (sí, no) y tipo de pastoreo (pastoreo en terreno propio, pastoreo en áreas comunales).

Para conocer el grado de asociación entre las variables independientes y las variables de respuesta, los datos fueron analizados en las tablas de contingencia (2x2) del programa Epi Info v. 6.02⁽¹⁷⁾. Se utilizó la prueba de Ji cuadrada para conocer el nivel de significancia entre cada asociación. Las variables independientes con valores de $P < 0.20$ fueron incluidas en un análisis de regresión logística.

Se utilizó el programa Statistix Versión 2.1 para realizar un análisis de regresión logística a las variables independientes que tuvieron valores de $P < 0.20$ sobre la variable de respuesta en el análisis de Ji cuadrada⁽¹⁸⁾. Se obtuvieron los valores de Razón de Probabilidad (OR por sus siglas en Inglés) para establecer la fuerza de asociación entre el factor de riesgo y la resistencia a los ixodicidas, el intervalo de confianza (IC 95 %), y el coeficiente de regresión de b.

RESULTADOS

Información general de las explotaciones

Las provincias y el número de lecherías muestreadas en cada una de ellas fueron: Andrés Ibáñez 4 (4.8 %), Sara 13 (15.7 %), Obispo Santistevan 15 (18.1 %), Warnes 24 (28.9 %) e Ichilo 27 (32.5 %). El 56.6 % de los lecherías manejan razas

confidence intervals (95%) and b coefficient regression were also determined.

RESULTS

General farm data

The number of sampled dairy farms by province was: Andrés Ibáñez, 4 (4.8 %); Sara, 13 (15.7 %); Obispo Santistevan, 15 (18.1 %); Warnes, 24 (28.9 %); and Ichilo, 27 (32.5 %). Of the sampled farms, 56.6 % (47/83) used pure bred Holstein and Brown Swiss, 42.2 % (35/83) used criollo (crossbreeds with no clear genetic proportion), and 1.2 % used (1/83) Jersey. Stocking density was ≤ 1 AU/ha at 19.0 % (15/79) of the farms, and >1 AU/ha at 81.0 % (64/79) of the farms.

Acaricide use and frequency

All (100 %, 83/83) of the surveyed producers used acaricide chemicals for tick control. Of these, 55.4 % (46/83) employed technical supervision for acaricide application, while the rest (37/83) did so without supervision.

Producers used AM most frequently (56.6 %, 47/83), followed by SP (28.9 %, 24/83), an AM/SP mixture (13.3 %, 11/83) and phenylpyrazoles (1.2 %, 1/83). Thirty percent (25/83) of the surveyed producers had used acaricides less than a year before the questionnaire was applied and the remaining 69.8 % (58/83) more than a year before. Manufacturer recommended doses were used by 48.2 % (40/83) of the producers.

Frequency of acaricide use was dictated by the presence of ticks at a farm (80.7 %, 67/83) or the tick control regime (19.3 %, 16/83). Annual treatment interval was <6 times/year at 27.7 % (23/83) of the farms and ≥ 6 times/year at the other 72.3 % (60/83). The acaricide application method used was spray at 95.2 % (79/83) of the farms, dipping at 2.4 % (2/83) and “pour-on” at 2.4 % (2/83).

Of the surveyed farmers, 51.8 % (43/83) reported acaricide rotation in the last two years; 4.8 % (4/

lecheras puras Holstein y Pardo Suizo, el 42.2 % utiliza mestizos (cruzamiento de diferentes razas sin ninguna proporción genética clara) y el 1.2 % corresponde a la raza Jersey. De acuerdo al número de animales por superficie de pastoreo, se encontró que el 19.0 % de los lecherías tienen una carga animal ≤ 1 UA/ha, mientras que el 81.0 % restante la carga es de > 1 UA/ha.

Uso y frecuencia de aplicación de ixodicidas

En cuanto al uso de ixodicidas, se observó que el 100 % de los productores usa productos químicos para el control de garrapatas, de los cuales el 55.4 % reciben asesoramiento técnico para el uso de estos productos, y el resto no cuenta con este servicio.

De los ixodicidas utilizados, las AM fueron la más utilizadas en el 56.6 %, PS 28.9 %, mezclan AM y PS 13.3 % y fenilpirazolonas 1.2 %. El 30.1 % utiliza el ixodicida hace menos de un año y el 69.8 % supera este tiempo; asimismo, el 48.2 % utiliza la dosis recomendada por los fabricantes.

Los criterios que determinan la frecuencia del uso de ixodicidas es la presencia de garrapatas en el 80.7 % de las explotaciones, y de forma rutinaria en 19.3 %. En cuanto a la frecuencia de tratamiento durante el año, se aprecia que el 27.7 % trata sus animales < 6 veces/año y el 72.3 % ≥ 6 veces/año. Con relación al tipo de aplicación de los productos, el 95.2 % utiliza aspersión, 2.4 % inmersión y 2.4 % *pour-on*.

El 51.8 % de los productores mencionaron que rotaron los ixodicidas durante los dos últimos años, de los cuales el 4.8 % señalaron que cambiaron el producto como práctica de manejo para evitar resistencia, y el 95.2 % manifestaron que el cambio del producto químico se debió a la ineficacia del mismo.

Del total de lecherías visitadas, sólo 30.1 % utilizan otra alternativa de control de garrapatas, de los cuales el 4 % utiliza vacunas, 56 % LM y 40 % quemar potreros.

Por otra parte, se encontró que el 75.9 % tiene problemas de moscas durante el año; de estos el

83) changed acaricides to prevent resistance, and 95.2 % (79/83) due to the lack of efficacy.

Only 30.1 % (25/83) of the farms used alternative tick control methods: 4 % (1/25) used vaccines; 56 % (14/25) ML; and 40 % (10/25) burned pastures.

Fly problems were reported at 75.9 % (63/83) of the farms, and of these 61.9 % (39/63) had used chemicals from different families for fly control.

Cuadro 1. Análisis de Ji cuadrada para factores de riesgo de manejo asociados a la exposición de *microplus* resistentes a piretroides agrupados en tres tipos de conducta

Table 1. Chi squared analysis of management risk factors associated with pyrethroids group resistant *Boophilus microplus* ticks on dairy farms grouped by response type

Variable	Response type		
	Parkhurst	Marmor	Santa Cruz
Stocking density			
≤ 1 UA/ha			
> 1 UA/ha	0.85	0.38	0.40
Time using current acaricide			
≤ 1 año			
> 1 año	0.50	0.34	0.22
Dose			
Recommended			
Other	0.89	0.09*	0.25
Treatment interval			
< 6 times/year			
≥ 6 times/year	0.66	0.43	0.56
Acaricide rotation			
No			
Yes	0.84	0.34	0.89
Other tick control			
No			
Yes	0.19*	0.34	0.51
Use of chemicals for fly control			
No			
Yes	0.58	0.18*	0.21
Grazing practices			
Producer property			
Public areas	0.01*	0.06*	0.16*

AU/ha= Animal unit per hectare

*Variables included in the logistic regression analysis.

61.9 % utiliza químicos de las diferentes familias para controlar esta plaga.

El 36.1 % de las explotaciones realiza pastoreo colectivo o comparten la misma área de pastizales; asimismo, el 24 % realiza la movilización de sus animales a otros potreros.

Prevalencia de lecherías

La prevalencia general de lecherías con garrapatas *B. microplus* resistentes a los PS fue del 92.7 % con un intervalo de confianza de 87.4 < 92.7 < 97.9. El 42.2 % fueron resistentes a flumetrina, 88.0 % a deltametrina y 75.9 % a cipermetrina.

Se presentaron las siguientes conductas de garrapatas *B. microplus* resistentes a los PS: a) conducta tipo Marmor: 32.5 %; b) conducta tipo Parkhurst: 38.5 %; c) conducta tipo Santa Cruz (denominada en el presente estudio por no ser reportada en México y Australia como de referencia): 14.4 % resistente a deltametrina; d) otras conductas no reportadas como referencia en Australia y México (no denominadas en el presente estudio): 3.6 % resistente a cipermetrina, 2.4 % resistente a flumetrina y deltametrina, y 1.2 % resistente a flumetrina y cipermetrina.

Over thirty percent (30/83) of the farms grazed animals in public areas or shared the same grazing area, and 24 % (20/83) rotated animals to other pastures.

Prevalence of SP-resistant Boophilus microplus

Overall prevalence of SP-resistant *B. microplus* among the sampled farms was 92.7 % (77/83) with a confidence interval of 87.4 < 92.7 < 97.9. Flumethrin resistance was identified at 40 % (35/83) of the farms, deltamethrin resistance at 88.0 % (73/83) and cypermethrin resistance at 75.9 % (63/83).

The types of *B. microplus* SP resistance response were: a) Marmor-type response: 32.5 % (27/83). b) Parkhurst-type response: 38.5 % (32/83). c) Santa Cruz-type response (i.e. deltamethrin resistance): 14.4 % (12/83). (This response type has not been reported in Mexico or Australia as a reference); d) Other response types not reported in Australia or Mexico (not named in the present study): 3.6 % (3/83) resistant to cypermethrin; 2.4 % (2/83) resistant to flumethrin and deltamethrin; and 1.2 % (1/83) resistant to flumethrin and cypermethrin.

Only the Marmor-, Parkhurst- and Santa Cruz-type responses were analyzed with the X² as the three other response types were represented by a very few cases (Table 1).

Cuadro 2. Razón de probabilidades para ranchos lecheros con garrapatas *Boophilus microplus* resistentes a deltametrina y cipermetrina (conducta tipo Marmor)

Table 2. Odds ratios for dairy farms with *Boophilus microplus* ticks resistant to deltamethrin and cypermethrin (Marmor-type response)

Variables	OR	CI (95%)	β	SE(β)	P
Dose:					
Recommended	1				
Other	0.48	0.15-1.54	-0.74392	0.59895	0.2142
Use of chemicals for fly control:					
No	1				
Yes	2.00	0.65-6.21	0.69457	0.57745	0.2290
Grazing type:					
Producer property	1				
Public areas	3.02	1.01-9.00	1.10611	0.55685	0.0470

OR=odds ratios; CI= confidence interval; SE= standard error; P= probability

En el Cuadro 1 se presenta el valor de P entre los posibles factores de riesgo y lecherías con garrapatas resistentes con los tipos de conducta Marmor, Parkhurst y Santa Cruz. Las demás conductas no pudieron ser analizadas por el reducido número de casos encontrados.

En el Cuadro 2, se observan los resultados del análisis de regresión logística de los factores de riesgo que muestran una $P < 0.20$, de los ranchos que presentaran garrapata resistente en el tipo de conducta Marmor. Los ranchos que usan el pastoreo en áreas comunales tienen tres veces más probabilidades de presentar resistencia a esta conducta (OR=3.02; IC95 % = 1.01-9.00) comparados con los que no la realizan ($P < 0.05$).

En el Cuadro 3, se observan los resultados del análisis de regresión logística de los factores de riesgo que mostraron $P < 0.20$ de los ranchos que presentaron garrapatas resistentes al tipo de conducta denominada Parkhurst. Los ranchos que realizan pastoreo en áreas comunales presentan una mayor probabilidad de tener resistencia con la conducta tipo Parkhurst (OR=0.27; IC95 % = 0.09-0.77) comparados con las ranchos que no la realizan.

Los ranchos que presentaron garrapatas resistentes con el tipo de conducta Santa Cruz no fueron analizadas por regresión logística, por encontrarse en el análisis de Ji cuadrada un solo factor con $P \leq 0.20$.

The logistic regression analysis of the risk factors with $P \leq 0.20$ for the Marmor-type response showed grazing in public areas to have a statistically significant effect ($P \leq 0.05$) (Table 2). Indeed, farms using this practice were three times more likely to have this type of resistance (OR=3.02; IC95 % = 1.01-9.00) than farms with cattle grazing on producer property.

Grazing practices also affected the prevalence of the Parkhurst-type response, in which grazing on producer property had a statistically significant effect ($P \leq 0.05$) in the logistic regression (Table 3). Farms using this management method were more likely to have the Parkhurst-type response (OR=0.27; IC95 % = 0.09-0.77) than farms grazing in public areas.

Farms with the Santa Cruz-type response were not analyzed with logistic regression because only one factor had a $P \leq 0.20$ in the X^2 analysis.

DISCUSSION

The present study is the first done in Bolivia to determine the prevalence of SP-resistant *B. microplus* on dairy farms based on epidemiological analysis and simple random sampling. The prevalence of pyrethroids-resistant *B. microplus* was 92.7 % among the sampled farms, though this may vary depending on regional differences, animal management techniques and acaricide use. This is

Cuadro 3. Razón de probabilidades para lecherías con garrapatas *microplus* resistentes a flumetrina, deltametrina y cipermetrina (conducta tipo Parkhurst)

Table 3. Odds ratios for dairy farms with *microplus* ticks resistant to flumethrin, deltamethrin and cypermethrin (Parkhurst-type response)

Variables	OR	CI (95%)	β	SE(β)	P
Other tick control:					
Yes	1				
No	1.78	0.62-5.11	0.57632	0.53867	0.2847
Grazing type:					
Producer property	1				
Public areas	0.27	0.09-0.77	-1.31041	0.53624	0.0145

OR= odds ratio; CI= confidence interval; SE= Standard error; P= Probability

DISCUSIÓN

El presente estudio es el primer reporte de prevalencia de lecherías con garrapatas *B. microplus* resistentes a PS en Bolivia, basado en un estudio epidemiológico observacional de corte transversal y elección de muestras al azar. La prevalencia fue de 92.7 %, cifra superior a la reportada en México de 66.3 %⁽¹⁹⁾, Costa Rica 83 %⁽²⁰⁾, Brasil 31 %⁽²¹⁾ y en varios países de Centroamérica, donde se encontraron prevalencias entre 58 y 83 %⁽²²⁾.

La alta prevalencia encontrada podría deberse a la dependencia a los ixodicidas para controlar garrapatas (100 %), al tipo de aplicación (95.2 % utiliza aspersión), a la frecuencia de aplicación de los ixodicidas (72.3 % lo realiza ≥ 6 veces/año) y al uso de ganado de razas europeas puras (56.6 % son Holstein y Pardo Suizo)^(23,24).

Rodríguez-Vivas *et al.*⁽¹⁹⁾, reportaron 65 ranchos resistentes a PS en el estado de Yucatán, México, con una frecuencia de 63, 60 y 58 % a los principios activos mencionados respectivamente; sin embargo, en otro estudio encontraron que flumetrina fue el principio activo con mayor resistencia⁽¹⁵⁾. En el presente estudio se pudo constatar que los principios activos más utilizados en la zona fueron deltametrina y cipermetrina y en menor uso flumetrina, situación que está relacionada con la disponibilidad de los mismos en el mercado.

Los patrones de resistencia observados difirieron con los reportados en México y Australia. En Australia describieron tres patrones de resistencia a PS: "Parkhurst", "Marmor", y la cepa "Lamington", resistente a flumetrina y susceptible a cipermetrina⁽¹⁵⁾. En México, caracterizaron cepas resistentes a los PS: "San Jorge" y "Mora" con muy alta resistencia a flumetrina, deltametrina y cipermetrina y mediana a organofosforados (similar a la cepa Parkhurst); cepa Aldama, con resistencia moderada a flumetrina y deltametrina; Coatzacoalcos, con resistencia moderada a cipermetrina y muy baja a deltametrina (similar a la cepa Marmor), encontrada en aquellos lugares donde el uso de este último producto (deltametrina pour-on) es elevado y existen graves problemas con el control de moscas del cuerno⁽¹⁶⁾; lo anterior

higher than prevalences reported for Mexico (66.3 %)⁽¹⁹⁾, Costa Rica (83 %)⁽²⁰⁾, Brazil (31 %)⁽²¹⁾ and some Central American countries (58 % to 83 %)⁽²²⁾. This elevated prevalence may result from widespread use of acaricide tick control (100 %), type of tick control application (95.2 % spray), acaricide application frequency (72.3 % applied ≥ 6 times/year) and use of European pure bred animals (56.6 % Holstein and Brown Swiss)^(23,24).

Rodríguez-Vivas *et al.*⁽¹⁹⁾, reported 65 farms with SP-resistant ticks in the state of Yucatan, Mexico, with frequencies of 63 % having ticks resistant to flumethrin, 60 % having ticks resistant to deltamethrin and 58 % having ticks resistant to cypermethrin. In a study of tick resistance to SP, Nolan *et al.*⁽¹⁵⁾ reported that the highest resistance was against flumethrin, whereas in the present study resistance was highest against deltamethrin and cypermethrin. These chemicals are also more frequently used in the study area than flumethrin, which responds to market availability.

The resistance types observed here did not completely coincide with those reported as references in Mexico and Australia. In Australia, Nolan *et al.*⁽¹⁵⁾ described three SP resistance strains: a) Parkhurst strain, resistant to flumethrin, deltamethrin and cypermethrin; b) Marmor strain, resistant to deltamethrin and cypermethrin but susceptible to flumethrin; and c) Lamington strain, resistant to flumethrin and susceptible to cypermethrin. In Mexico, Ortiz *et al.*⁽¹⁶⁾, also characterized three SP resistance strains: a) San Jorge and Mora strains, with high resistance to flumethrin, deltamethrin and cypermethrin and moderate organophosphates resistance (similar to Parkhurst strain); b) Coatzacoalcos strain, with moderate resistance to cypermethrin and very low resistance to deltamethrin (similar to Marmor strain); c) Aldama strain, with moderate resistance to flumethrin and deltamethrin. In the same study, the authors reported that the Coatzacoalcos strain occurs where the use of deltamethrin pour-on is high and there are serious horn fly control problems. This may result from the high potential effect of cypermethrin and deltamethrin in comparison to flumethrin.

es debido a que cipermetrina y deltametrina son PS con un potente efecto mosquicida en comparación con flumetrina.

En la zona de estudio, las conductas que principalmente se presentaron fueron Parkhurst, Marmor y Santa Cruz. Esta última conducta no ha sido reportada en Australia y México, por lo que en futuros estudios será necesario evaluarla mediante pruebas de inmersión de garrapatas adultas, para conocer su respuesta frente a otros piretroides. De la misma manera será de gran utilidad conocer si en las garrapatas el mecanismo de la resistencia es similar al observado en cepas de *B. microplus* en México, donde se ha demostrado que la presencia de una mutación kdr en el canal de sodio⁽²⁵⁾.

B. microplus es el ectoparásito en bovinos más importante en la Zona Integrada del Departamento de Santa Cruz⁽⁴⁾. En el presente estudio, se encontró que las razas puras Holstein y Pardo Suizo son las que predominan en la zona, lo que se traduce en una mayor susceptibilidad a las garrapatas, y como consecuencia, a un mayor uso de ixodicidas, que conlleva a una mayor presión de selección sobre las poblaciones de garrapatas⁽²⁶⁾. El 100% de los productores reportan la utilización de productos químicos para el control de las garrapatas y 36.1% de las explotaciones realizan el pastoreo en áreas comunales. Este sistema de manejo de pastoreo en áreas comunales, consiste en realizar el pastoreo de los animales en caminos y en áreas sin alambradas y barbechos, y está relacionado con la falta de infraestructura y potreros para el pastoreo de animales, donde el productor se ve obligado a pastorear sus animales en áreas donde lo hacen otros animales. De esta forma los animales se infestan con garrapatas expuestas a diferentes presiones de selección de los ixodicidas. Davey y George⁽²⁷⁾, mencionan que en las áreas relativamente pequeñas, los animales tienen más oportunidad de estar en contacto con las garrapatas, lo que provoca una mayor posibilidad de interacción con las subpoblaciones de garrapatas genéticamente resistentes.

En relación a los factores de riesgo asociados a la resistencia a flumetrina, deltametrina y cipermetrina

Of the three main strains in the study area (Parkhurst, Marmor and Santa Cruz), the Santa Cruz strain has not been reported in Australia or Mexico. Further research is needed to determine this strain's response to other pyrethroids, using the immersion adult test, for instance, and to determine if its resistance mechanism is similar to those observed in *B. microplus* strains in Mexico, where the kdr mutation in the sodium channel occurs⁽²⁵⁾.

The logistic regression analysis of dairy farms with *B. microplus* resistant to deltamethrin and cypermethrin (Marmor-type response) showed grazing in public areas to be statistically significant ($P < 0.05$). Farms using this management strategy had a higher probability of harboring ticks resistant to the tested SP (OR=3.02; CI95% = 1.01-9.00) than those not using this strategy.

Boophilus microplus is the most common ectoparasite on cattle in the Zona Integrada of Santa Cruz Department⁽⁴⁾. Pure bred Holstein and Brown Swiss cows were the predominant breeds in the study. Both are more susceptible to ticks and must therefore be treated more frequently with acaricides, consequently exercising high suppression pressure against tick populations⁽²⁶⁾. All the surveyed producers used chemical products for tick control and 36.1% of the farms grazed animals in public areas. Grazing in public areas, that is, on roads and in unfenced areas, is associated with lack of infrastructure and pasture, conditions which force producers to graze their animals with those of other producers. This leads to interaction between animals infested with ticks that experience different selection pressure from acaricides. Davey and George⁽²⁷⁾ mentioned that animals have a greater opportunity to come into contact with ticks in small areas, which also results in a higher possibility of interaction between genetically-resistant tick subpopulations.

Grazing in public areas also had a statistically significant effect ($P < 0.05$) on the risk factors associated with resistance to flumethrin, deltamethrin and cypermethrin (Parkhurst-type response)

(conducta tipo Parkhurst) se muestra un efecto significativo para la variable tipo de pastoreo (pastoreo en áreas comunales), presentándose este factor de manera protectora, lo que indica que el pastoreo en terreno propio está influenciado para que se presenten garrapatas resistentes a este tipo de conducta, comportamiento que es difícil de explicar. En el futuro se recomienda hacer estudios prospectivos en la zona para conocer si el tipo de pastoreo está influenciando la presentación de la resistencia tipo Parkhurst o están involucrados otros factores.

CONCLUSIONES E IMPLICACIONES

Se concluye que la prevalencia de lecherías con *B. microplus* resistentes a piretroides sintéticos es un problema actual en la Zona Integrada del Departamento de Santa Cruz, Bolivia, y el tipo de pastoreo es un factor de riesgo en el desarrollo de la resistencia a los comportamientos tipo Marmor y Parkhurst.

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los ganaderos del la Zona Integrada del Departamento de Santa Cruz, Bolivia por permitir manejar a sus animales y dedicarnos tiempo durante la realización del proyecto.

LITERATURA CITADA

1. Rodríguez-Vivas RI, Domínguez AJL. Grupos entomológicos de importancia veterinaria en Yucatán, México. *Rev Bioméd* 1998;(9):26-37.
2. Rojas PE. Situación de los ixodidos en Bolivia [tesis licenciatura]. Santa Cruz, Bolivia Universidad Autónoma Gabriel René Moreno. 1999:25-40.
3. Sutherst RW. Management of arthropod parasitism in livestock. World Association or the Advancement of Veterinary Parasitology. Australia: Dansmore. 1983.
4. Gil ME. Cuantificación de garrapatas e infestación por babesiosis y anaplasmosis en bovinos de carne (época seca de la Zona Santa Cruz Central) [tesis licenciatura]. Santa Cruz, Bolivia: Universidad Autónoma Gabriel René Moreno; 2000.
5. Rodríguez-Vivas RI, Mata-Mendez Y, Pérez-Gutierrez E, Wagner G. The effect of management factors on the

(OR=0.27, CI95%=0.09-0.77), but this factor occurs in a protective form, meaning that grazing on producer property influences the presence of Parkhurst-type resistance in ticks, which is difficult to explain. Further research in the form of prospective studies is needed to determine if this grazing practice is what influences occurrence of the Parkhurst-type response or if additional factors are involved.

CONCLUSIONS AND IMPLICATIONS

The prevalence of SP-resistant *B. microplus* tick populations on dairy farms in the Zona Integrada of Santa Cruz Department, Bolivia, is an ongoing problem and grazing practices (i.e. in public areas or on producer property) is a risk factor for development of the Marmor-and Parkhurst-type resistance responses.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the dairy farmers of the Zona Integrada of Santa Cruz Department, Bolivia, for allowing us to handle their animals and for finding the time to answer the questionnaires.

End of english version

seroprevalence of *Anaplasma marginale* in *Bos indicus* cattle in the Mexican tropics. *Trop Ani Health Prod* 2004;(36):135-143.

6. Fragoso SH, Ortiz EM, De Labra V, Ortiz NN, Rodríguez M, et al. Evaluación de la vacuna contra la garrapata Bm86 (Gavac) para el control de *Boophilus microplus*. En: García VZ, Fragoso SH editores. IV Seminario Internacional de parasitología. Control de la resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 1999:47-50.
7. Corporación Regional de Desarrollo de Santa Cruz (CORDECRUZ). Plan de Uso de Suelo. Tierras de uso agropecuario intensivo. Santa Cruz, Bolivia: 1995:14-20.
8. Ribera H, Cuellar AM. Uso de pruebas de Elisa para el diagnóstico de enfermedades transmitidas por garrapatas. XIII curso de actualización para Médicos Veterinarios de Campo. Santa Cruz, Bolivia. 2002:1-10.
9. Cen AJ, Rodríguez VRI, Domínguez AJL, Wagner G. Studies on the effect on infection by *Babesia spp* on oviposition of

PREVALENCIA CON *Boophilus microplus* RESISTENTES A PIRETROIDES

- Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. Vet Parasitol 1998;(78):253-257.
10. Stone BF, Haydock P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *Boophilus microplus*. Bull Entomol Res 1962;(53):563-57.
 11. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Acaricide resistance in the cattle-ticks *Boophilus microplus* and *B. decoloratus*: Review of resistance data; standardization of resistance tests and recommendation for integrated parasite control to delay resistance. Report to the animal health services, AGAH, FAO y CSIRO Trop Agric, QLD, Australia. 1998:1-28.
 12. Santamaría VM. Determinación de la dosis discriminantes a tres piretroides sintéticos en la cepa *Boophilus microplus* susceptible CENAPA [resumen]. II Congreso nacional de parasitología. Veracruz, México. 1992:74.
 13. Aguirre EJ, Santamaría VM. Purificación y caracterización toxicológica de garrapatas *B. microplus* resistentes a ixodicidas organofosforados y organoclorados [resumen]. IV Reunión anual de la Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria. Ciudad Victoria, Tamaulipas. 1986:4.
 14. Leaverton PE. A review of biostatistics a program for self-instruction. 4a ed. USA: Litte, Brow and Company Medical Division. 1991.
 15. Nolan J, Wilson JT, Green PE, Bird PE. Synthetic pyrethroid resistance in field samples in the cattle tick (*Boophilus microplus*). Aust Vet J 1989;(66):179-182.
 16. Ortíz EM, Santamaría VM, Ortiz NA, Soberanes CN, Osorio MJ, Franco BR, Martínez IF, Quezada DR, Fragoso SH. Caracterización de la resistencia de *Boophilus microplus* a ixodicidas en México. En: Rodríguez CS, Fragoso SH editores. IV Seminario internacional de parasitología animal: Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria. Acapulco, Guerrero, México. 1995:58-66.
 17. Dean AG, Dean JA, Coumbier D, Brendel KA, Smith DC, Burton, AH, Dicker RC, Sullivan D, Fagan RF, Arner TG. Epi Info version 6: A Word Processing, database and statistics program for epidemiology on microcomputer. Atlanta, Georgia, USA: Centers Disease Control and Prevention; 1994.
 18. Silva ALC. Excursión a la regresión logística en ciencias de la salud. La Habana, Cuba: Díaz de Santos; 1995.
 19. Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Arevalo F, Fragoso-Sanchez H, Santamaria VM, Rosario-Cruz R. Prevalence and potential risk factors for organophosphorus and pyrethroids resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms from the State of Yucatan, Mexico [In press]. Vet Parasitol 2005.
 20. Álvarez V, Bonilla R, Chacón I. Situación de la resistencia de la garrapata *B. microplus* (Canestrini, 1887) a organofosforados y piretroides en Costa Rica. Rev Cien Vet 1999;(22):41-60.
 21. Furlong J. Diagnóstico de la susceptibilidad de la garrapata del ganado *Boophilus microplus* a los acaricidas en el estado de Minas Gerais, Brasil. En: Morales SG et al editores. IV Seminario Internacional de Parasitología Animal. Puerto Vallarta, Jalisco. México. 1999:41-46.
 22. Hagen S, Kopp JA, Liebisch A. Estudios de resistencia a acaricidas en la garrapata bovina *Boophilus microplus* en América Central. En: Morales SG et al editores. IV Seminario Internacional de Parasitología Animal. Puerto Vallarta, Jalisco. México. 1999:33-34.
 23. Kunz SE, Kemp DH. Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. Rev Sci Tech OIE. 1994;(13):1249-1286.
 24. Norval RAI, Suthers RW, Kerr JD. Infestations of the bont tick *Amblyomma hebraeum* (Acari: Ixodidae) on different breeds of cattle in Zimbabwe. Exp Applied Acarol 1996;(20):599-605.
 25. Rosario-Cruz R, Guerrero FD, Miller RJ, Rodríguez-Vivas RI, Dominguez-García DI, Cornel AJ, Hernández-Ortiz R, George EJ. Roles played by esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in populations of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) collected from Yucatan, Mexico [In Press]. J Med Entomol 2005;(42):1020-1025
 26. Coronado A. Control químico de *Boophilus microplus* en Venezuela: Situación actual. En: IV Seminario Internacional de Parasitología: control de la resistencia en garrapatas y moscas de importancia veterinaria y enfermedades que transmiten. Morales SG et al. editores. Puerto Vallarta, Jalisco, México. 1999:51-54.
 27. Davey BR, George EJ. *In vitro* and *in vivo* evaluations of a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) selected for resistance to permethrin. J Med Entomol 1998;(35):1013-1019.

