

# Nuevos enfoques para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

## Novel Approaches for control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*

Kevin B. Temeyer<sup>a</sup>, Andrew C. Chen<sup>a</sup>, Ronald B. Davey<sup>b</sup>, Felix D. Guerrero<sup>a</sup>, J.M. Howell<sup>a</sup>, Diane M. Kammlah<sup>a</sup>, Andrew Y. Li<sup>a</sup>, Kimberley H. Lohmeyer<sup>a</sup>, Pia U. Olafson<sup>a</sup>, Adalberto A. Perez de Leon<sup>a</sup>, Pamela L. Phillips<sup>a</sup>, Joe M. Pound<sup>a</sup>, and J.B. Welch<sup>a</sup>.

### RESUMEN

Esta revisión describe avances científicos enfocados al control de garrapatas de fiebre bovina (GFB), *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *R. (B.) annulatus*. Evidencia epidemiológica indica que brotes de GFB en los EE.UU. han alcanzado niveles alarmantes debido al aumento de la población del venado cola blanca (VCB) y otras especies de ungulados salvajes que son hospedadores alternativos. Investigaciones avanzadas incluyen estudios sobre: inmunología en el VCB, genética molecular de GFB, resistencia a los acaricidas, e interacciones del sistema hospedador-parásito-garrapata. La utilidad del baño garrapaticida con organofosforados (OP) en los EE.UU. depende de la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE). Tres cADNs que codifican acetilcolinesterasas (AChE, EC 3.1.1.7) en *R. (B.) microplus* se expresaron en un sistema de baculovirus y mostraron valores de  $K_m$  para acetiltiocolina de aproximadamente 5, 50, y 90  $\mu\text{M}$  para rBmAChE1, rBmAChE2, y rBmAChE3, respectivamente. Los rBmAChEs prefirieron acetiltiocolina sobre butiriltiocolina como sustrato, y se inhibieron con eserina, paraoxón, y el inhibidor específico de AChE, BW284C51, así confirmando su identidad bioquímica como AChE. La expresión de mutaciones específicas en cepas resistentes a OP disminuyeron la susceptibilidad de rBmAChE1 y rBmAChE3 a inhibición con OP. Resultados por qRT-PCR indicaron que *BmAChEs* son expresados en singanglion. Múltiples transcripciones observadas en GFB para los *BmAChEs* sugiere el empalme alternativo o duplicación genética. Resultados por qRT-PCR con ADN genómico respaldan la hipótesis de duplicación genética. Moléculas largas de dsARN específicas para rBmAChEs fueron introducidas en hembras adultas ayunadas por microinyección y la silenciamiento de genes monitoreada por qRT-PCR y efectos fenotípicos. Los roles específicos para los rBmAChEs quedan por dilucidarse.

**PALABRAS CLAVE:** Acetilcolinesterasa, Organofosforados, Resistencia acaricidas.

### ABSTRACT

We review recent progress for control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *R. (B.) annulatus*. Outbreak infestations in the U.S. have reached alarming levels, due to increased populations of deer and other ungulates serving as alternative hosts. GIS mapping of infestations and deer habitat aids in utilizing methods and equipment designed for acaricide treatment of wild ungulates. Investigations include deer immunology, tick molecular genetics, acaricide resistance, and host-parasite interactions with deer or cattle, ticks, and pathogens. Acaricide resistance is widespread in Mexico and U.S. dipping vats depend on organophosphate (OP) inhibition of acetylcholinesterase (AChE). Three cDNAs putatively encoding acetylcholinesterases (AChE, E.C. 3.1.1.7) in *R. (B.) microplus* were expressed in the baculovirus system and exhibited  $K_m$  values for acetylthiocholine of approx. 5, 50, or 90  $\mu\text{M}$ , for rBmAChE1, rBmAChE2, and rBmAChE3, respectively. The rBmAChEs exhibited substrate preference for acetylthiocholine over butyrylthiocholine, and inhibition by eserine, paraoxon, and the AChE-specific inhibitor, BW284C51, confirming biochemical identification as AChEs. Expression of specific mutations from OP-resistant strains exhibited decreased sensitivity of rBmAChE1 and rBmAChE3 to OP inhibition. Each of the *BmAChEs* was expressed in synganglion as indicated by qRT-PCR. Multiple transcripts from individual ticks for each of the *BmAChEs* suggested alternative splicing or gene duplication. Quantitative real time PCR with genomic DNA supported the gene duplication hypothesis. Long dsRNA specific for *BmAChE1*, *BmAChE2*, and *BmAChE3* was introduced by microinjection of unfed adult females and subsequent gene silencing was monitored by qRT-PCR and phenotypic effects. Specific physiological roles for BmAChE1, BmAChE2, and BmAChE3 remain to be elucidated.

**KEY WORDS:** Acetylcholinesterase, Organophosphate, Acaricide resistance.

### INTRODUCCION

Las garrapatas del ganado *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* y *R. (B.) annulatus*, fueron introducidas al nuevo mundo con el ganado y caballos a principios del siglo XVI. Estas

### INTRODUCTION

Cattle fever ticks, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* and *R. (B.) annulatus*, were brought to the new world on cattle and horses in the early 1500s. Cattle fever ticks became established

<sup>a</sup> U.S. Livestock Insects Research Laboratory, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, 2700 Fredericksburg Road, Kerrville, Texas 78028 U.S.A. Telephone: 1-830-792-0330 kevin.temeyer@ars.usda.gov Correspondencia al primer autor.

<sup>b</sup> Cattle Fever Tick Research Laboratory, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, Moore Air Base, Bldg 6419, Edinburg, Texas U.S.A. 78541

garrapatas se establecieron a lo largo del sur de Estados Unidos y California, pero recibieron poca atención hasta que el ganado transportado del estado de Texas los llevó hasta cruzar la línea de congelación en donde el ganado residente nunca había estado expuesto a las enfermedades transmitidas por garrapatas como la anaplasmosis y babesiasis. La mortalidad en el ganado residente en las áreas recién ocupadas por el ganado proveniente del estado de Texas, alcanzó cifras hasta de un 90 %, lo cual ocasionó un gran escándalo (y la violencia asociada) y la concomitante prohibición de cruzar muchas fronteras con otros estados del ganado proveniente del estado de Texas. En 1893 se descubrió que las garrapatas son responsables de la dispersión de la "Fiebre de Texas". Se diseñó una estrategia para erradicar a las garrapatas mediante un programa nacional de erradicación que fue iniciado en 1906. A finales de 1937, sólo 12,000 de las originales 700,000 millas cuadradas permanecían infestadas. El estado de Florida fue la excepción, ya que se encontró que el venado cola blanca también estaba infestado por garrapatas. Colectar los venados silvestres y tratar las garrapatas no era factible; por esta razón los oficiales decidieron despoblar a los venados. Entre 1939 y 1941 un total de 20,000 venados fueron sacrificados y los Estados Unidos fueron declarados libres de las garrapatas de la fiebre de Texas<sup>(1)</sup>. Desde 1961 no ha habido brotes de la fiebre de Texas en los Estados Unidos, excepto aquéllos en la zona de cuarentena y áreas adyacentes al sur de Texas. Los Estados Unidos se protegen contra la reintroducción de garrapatas *Boophilus* por el Programa de Erradicación de la Garrapata de la Fiebre del Ganado (CFTEP), el cual consiste en la inspección, tratamiento y cuarentena de animales y ranchos infestados que son supervisados por la Rama de Servicios Veterinarios de los Servicios de Inspección en Salud Animal y Vegetal del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA-APHIS, VS), el cual mantiene una zona de cuarentena permanente a lo largo de la frontera con México. Esta zona cuarentenaria permanente varía en amplitud que va de 200 yardas a las 35 millas en diferentes puntos a lo largo de la frontera. Cada año se importan de México -en

across the southern US and California, but received little attention until the Texas cattle drives of the mid-late 1800s carried them north of the frost line where resident cattle were naïve to the anaplasmosis and babesiosis that they vector. Mortality of resident cattle in areas crossed by the Texas cattle drives reached up to 90 %, so there was a great outcry (and associated violence) directed at prohibition of Texas cattle from crossing many state borders. In 1893 it was discovered that the ticks were responsible for the spread of "Texas Fever." A strategy was devised to eradicate the ticks by way of a national eradication program that was initiated in 1906. By the end of 1937, only 12,000 of the original 700,000 square miles remained infested. One exception was in Florida where it was found that white-tailed deer were infested with ticks. Collecting and treating the wild deer was not feasible, so officials decided to depopulate the deer. Between 1939 and 1941 a total of 20,000 deer were slaughtered and the U.S. was declared free of cattle fever ticks in 1943. A number of outbreaks occurred in Florida and Texas during the 40s and 50s, which took 17 yr to eliminate, but finally, in 1960, the U.S. was again declared free of cattle fever ticks<sup>(1)</sup>. Since 1961 there have been no cattle fever tick outbreaks in the U.S. except in the quarantine zone and adjacent areas of South Texas.

The U.S. is protected from reintroduction of *Boophilus* ticks by the Cattle Fever Tick Eradication Program (CFTEP) consisting of inspection, treatment and quarantine of animals and infested premises administered by the Veterinary Services Branch of the Animal and Plant Health Inspection Service of the U.S. Department of Agriculture (USDA-APHIS, VS), which maintains a permanent quarantine zone along the Texas border with Mexico. The permanent quarantine zone varies in width from 200 yards to 35 miles at different points along its length. Approximately a million cattle are imported into the United States each year from Mexico where *R. (B.) microplus* and *R. (B.) annulatus* remain endemic. Animals presented for importation must have been treated with acaricide, are dipped in a vat containing 0.3% (a.i.) coumaphos and are hand inspected to check for ticks. If a single tick is found, the entire herd

donde *R. (B.) microplus* y *R. (B.) annulatus* son endémicas-, aproximadamente un millón de cabezas por los Estados Unidos. Los animales presentados para importación deben ser tratados con acaricida, y sometidos a un baño de inmersión conteniendo coumafos al 0.3% (ingrediente activo) e inspeccionados manualmente para verificar la presencia/ausencia de garrapatas. Si una sola garrapata es encontrada, se rechaza el hato entero. Después de un periodo obligado de espera de 10 días, los animales pueden ser presentados nuevamente para poder ser importados, pero si durante la segunda inspección se encuentran garrapatas nuevamente, se cancela la entrada a los ganaderos reincidentes de manera permanente. Los brotes de garrapatas de la fiebre del ganado en los Estados Unidos es causa de cuarentena obligada de los ranchos infestados con tratamiento e inspección del ganado hasta erradicar a las garrapatas. Los centros de investigación: Knippling-Bushland U.S. Livestock Insects Research Laboratory (Kerrville, TX) y el Cattle Fever Tick Research Laboratory (CFTRL) (Edinburg, TX), proporcionan el apoyo en las actividades de investigación para el Programa de Erradicación de la Garrapata de la Fiebre del Ganado.

Hay un creciente cuerpo de evidencias que indican la relación entre las garrapatas de la fiebre del ganado y diferentes ungulados silvestres localizados en el estado de Texas. La primera evidencia de esta relación ocurrió a finales de los años treinta y a principios de los cuarenta del siglo pasado en el estado de Florida, cuando se encontraron venados cola blanca infestando venados cola blanca, lo cual condujo al sacrificio de 20,000 animales<sup>(1)</sup>. Desde finales de los sesenta los reportes de venados infestados con garrapatas se han venido incrementando a lo largo de la zona cuarentenaria permanente, paralelamente con el incremento excesivo de la población de venados en el sur de Texas durante los pasados 40 años. La población de venados en Texas fue estimada recientemente en 3.8 millones de animales<sup>(2)</sup>. Adicionalmente ha habido un incremento enorme en el número de especies de ungulados exóticos que están siendo introducidos cerca de la zona cuarentenaria permanente. El antílope Nilgai, que es nativo de la India es un primer ejemplo. Se estima que hay 30,000 de

is refused entry. After a mandatory 10 d waiting period, the animals may once again be presented for importation, but are permanently barred entry if any ticks are found during the second inspection. Outbreaks of cattle fever ticks in the United States trigger mandatory quarantine of infested premises with treatment and inspection of cattle to eradicate the ticks. Our locations, the Knippling-Bushland U.S. Livestock Insects Research Laboratory (Kerrville, TX) and the Cattle Fever Tick Research Laboratory (Edinburg, TX), provide research support for the Cattle Fever Tick Eradication Program.

There is an ever increasing body of evidence indicating a relationship between fever ticks and different free-ranging ungulates located in Texas. The first evidence of this relationship occurred back in the late 30s and early 40s in Florida when ticks were found infesting white-tailed deer, which led to the slaughter of 20,000 animals<sup>(1)</sup>. Since the late 60s reports of tick infested deer have continued to increase throughout the permanent quarantine zone, coincident with an extreme increase in the deer population in South Texas during the past 40 yr. The deer population in Texas was recently estimated to be 3.8 million animals<sup>(2)</sup>. In addition, there has been an enormous increase in the numbers of exotic ungulate species that are being held in or near the permanent quarantine zone. Nilgai antelope, which are native to India, are a prime example. There are estimated to be 30,000 of these animals roaming the south Texas and northern Mexico brush land and they have been found infested with ticks on several occasions. American elks being held in the quarantine zone were found infested in the early 1990s and again in 2003. Fallow deer and Red Deer being held in the zone were found infested in 2007, and Axis deer were found infested in 2008.

Studies carried out at the Cattle Fever Tick Research Laboratory demonstrated that deer were capable of serving as alternative hosts for *R. (B.) microplus*, although the deer produced 12.5 times fewer ticks per animal than the cattle. Ticks recovered from the deer also weighed significantly less than ticks recovered from cattle and they produced significantly fewer eggs with a lower hatch rate than ticks from the cattle. In addition, based on daily observations of the deer

estos animales habitando el sur de Texas y el norte de México, en donde se han encontrado ocasionalmente infestados por garrapatas. El elk americano que habita la zona cuarentenaria fue encontrado infestado con garrapatas a principios de los años noventa y de nuevo en el año 2003. El gamo y el venado Rojo que habita en la zona cuarentenaria se ha encontrado infestado en el 2007, y los venados axis se encontraron infestados en el 2008.

Estudios llevados a cabo en el CFTRL demostraron que el venado es capaz de servir como hospedador alternativo de la garrapata *R. (B.) microplus*, aunque produce 12.5 veces menos garrapatas por animal que el ganado bovino. Las garrapatas colectadas de venados pesan también significativamente menos que las colectadas de ganado bovino y producen significativamente menos huevos con una tasa menor de eclosión que las garrapatas del ganado; con base en las observaciones diarias durante las infestaciones en venados y bovinos se muestra que los venados son muy agresivos para removerse las garrapatas que pueden alcanzar aun antes de que estas logren la repleción total. Los estudios concluyeron que aunque los venados no producen los números tan altos de garrapatas producidos por los bovinos, estos poseen una capacidad de dispersar un número de garrapatas suficiente para producir un gran brote en áreas en donde no había garrapatas previamente establecidas, y que también puedan mantener infestados de garrapatas los potreros en descanso de ganado<sup>(3,4)</sup>.

### Retos de los programas de erradicación

Actualmente, el CFTEP está muy cerca de una situación de crisis. Ha habido un número record de ranchos infestados reportados en 2009, lo que amplía aun más la preocupante tendencia de los años recientes. Desde Julio del 2008, 894,219 acres (3619 Km<sup>2</sup>) en el sur de Texas han sido cuarentenados temporalmente debido a las infestaciones por garrapatas fuera de la zona de cuarentena permanente. En 1973, hubo 170 ranchos infestados por garrapatas detectados en Texas. Entre el primero de octubre del 2007 al 30 de septiembre del 2008, hubo 132 ranchos infestados<sup>(5)</sup>, y en el periodo del primero de octubre del 2008 al 31 de agosto de 2009 ha

and cattle during the infestation, we noted that the deer were very aggressive self-groomers, removing any ticks they could reach before the ticks reached full engorgement. The study concluded that although deer do not produce the high numbers of ticks produced by cattle, they do pose a distinct risk of dispersing a sufficient number of ticks to create a major outbreak of ticks in areas where no ticks have been previously established and they may also maintain ticks on infested premises vacated of cattle<sup>(3,4)</sup>.

### Challenges to the eradication program

Currently, the CFTEP is very near to a crisis situation. There have been record numbers of infested premises reported in 2009 further expanding a disturbing trend of recent years. Since July, 2008, 894,219 acres (3,619 km<sup>2</sup>) in south Texas have been placed under temporary quarantine due to cattle fever tick infestations outside the permanent quarantine zone. In 1973, there were 170 tick-infested premises detected in Texas. Between Oct. 1, 2007 – Sept. 30, 2008 there were 132 infested premises<sup>(5)</sup> and in the period Oct. 1, 2008 - August 31, 2009 there have been infestations identified on 144 premises in Texas, 60 within the permanent quarantine zone (systematic area), and 84 outside of the quarantine zone (free area), the second highest number of outbreaks since completion of the eradication program in 1943. There are believed to be several factors responsible for this trend, including greater populations and increased surveillance of deer and other ungulates capable of serving as alternative hosts for *Boophilus microplus*<sup>(6)</sup>. Use of geographic information system (GIS) tool to map new infestations by location and date assists in elucidating the extent of infestation foci, identifying adjacent premises which are subject to inspection and quarantine, planning of control efforts, and subsequently assessing control effectiveness.

It has become clear that white-tailed deer and other ungulates appear to be important factors in maintaining southern cattle tick populations on infested premises from which cattle have been vacated as an approved eradication option. Movement of deer and other ungulates between premises is more difficult to constrain than for cattle, presenting an infestation threat to adjacent

habido infestaciones identificadas en 144 ranchos en Texas, 60 de ellas dentro de la zona de cuarentena permanente (área sistemática) y 84 fuera de ella (área libre), el segundo número más alto de infestaciones desde que se completó el programa de erradicación durante 1943. Se cree que existen varios factores responsables de esta tendencia, incluyendo el incremento de las poblaciones de venados y ungulados capaces de servir como reservorios alternativos de *Boophilus microplus*<sup>(6)</sup>. El uso de Sistemas de Información Geográfica (GIS) para el mapeo espacio temporal de nuevas infestaciones es de gran ayuda para dilucidar el grado de infestación de los focos, la identificación de ranchos adyacentes que están sujetos a inspección y cuarentena, la planeación de los esfuerzos de control y subsecuentemente la evaluación de la efectividad en el control.

Se ha probado que el venado cola blanca y otros ungulados, parecen ser factores importantes en el mantenimiento de las poblaciones de garrapatas en ranchos infestados en los cuales el ganado ha sido evacuado como una opción aprobada de erradicación. El movimiento de venados y otros ungulados entre ranchos son más difíciles de limitar que el movimiento de ganado infestado que representa una amenaza a las propiedades vecinas. El desarrollo de la metodología de mapeo GIS para identificar el hábitat de los venados a través del análisis de imágenes satelitales está en curso. Se utilizó el sistema de imágenes satelitales para desarrollar los mapas de predicción de los hábitats del venado en el condado de Zapata, en Texas basado en la vegetación, para el monitoreo del clima, disponibilidad de agua y refugio. Estos mapas son superpuestos con mapas basados en avistamiento de venados y otros parámetros del hábitat para predecir los corredores de los venados. El conocimiento de los corredores de los venados nos va a permitir el rompimiento de las rutas de viaje mediante cercas o la colocación efectiva de instrumentos diseñados específicamente para el tratamiento de venados y otros ungulados. Por otro lado, el conocimiento del hábitat de los venados dentro de las zonas de pastizales puede ser utilizado para predecir la efectividad del descanso de la pradera como un medio para la erradicación de garrapatas en ranchos infestados. El muestreo de campo de

and nearby properties. Development of methodology for GIS mapping of deer habitat identified through analysis of satellite imagery is currently underway. We utilize satellite imagery to develop predicted deer habitat maps in Zapata County, Texas based on vegetation for browsing, climate, and availability of water and cover. These maps are overlaid with maps based on deer sightings and habitat parameters to predict travel corridors for deer. Knowledge of travel corridors will permit disruption of travel routes by fencing and effectively placing of tick control devices specifically designed for treating deer and other ungulates. In addition, knowledge of deer habitat within pastures can be used to predict effectiveness of pasture vacation as a means of eradication of ticks on infested premises. Field sampling for ticks and determination of deer habitat preference through monitoring are important components needed for validation of satellite imagery mapping and currently underway at our laboratory.

In order to reduce the impact that free-ranging wild native and exotic ungulates are having on the CFTEP, the Agricultural Research Service (ARS) of the U.S. Department of Agriculture has expended a great deal of effort to develop methods for the passive acaricide treatment of these animals as a means of reducing or eliminating the ticks. One technology that has been developed by ARS for controlling ticks on free-ranging white-tailed deer and other exotic ungulates is a systemic control technology using ivermectin-medicated whole kernel corn. Studies have shown that white-tailed deer consuming 1 pound of medicated corn per hundred pounds of the deer results in a level of approx. 30 ppb in the serum of the deer. Previous studies have shown that a level of at least 10 ppb in the blood serum of an animal is adequate to kill 100% of the ticks feeding on the animal<sup>(7)</sup>. Use of this technology successfully eliminated tick infestation on a 6,500 acre ranch with a herd of elk and on a 40,000 acre ranch with white-tailed deer for which pasture vacation and cattle dipping had been unsuccessful at eliminating tick infestation. Other technologies developed include the 4-poster feeder and acaricide self-applicator for deer<sup>(8-10)</sup>. This device successfully reduced tick populations on deer in the Northeastern United States in an

garrapatas y la determinación de la preferencia de hábitats mediante el monitoreo, son componentes importantes necesarios para la validación del mapeo de imágenes satelitales, actualmente bajo evaluación en nuestro laboratorio.

Para reducir el impacto que la fauna silvestre de ungulados nativos y exóticos está teniendo en el CFTEP, los Servicios de Investigación para la Agricultura (ARS) del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, ha realizado un gran esfuerzo para desarrollar métodos para el tratamiento pasivo de estos animales con acaricidas, como un medio para reducir o eliminar las garrapatas. Una tecnología que ha sido desarrollada por el ARS para el control de garrapatas en venados cola blanca silvestres y otros ungulados exóticos, es una tecnología de control sistémica usando maíz impregnado con ivermectinas. Los estudios han demostrado que los venados cola blanca, consumen una libra de maíz medicado por cada 100 libras de peso, lo que resulta en una concentración de ivermectina de 30,000 ppm en el suero del venado. Estudios previos han mostrado que un nivel de por lo menos 10,000 ppm de ivermectina sérica es suficiente para matar el 100 % de las garrapatas que se alimentan sobre el animal<sup>(7)</sup>. El uso de esta tecnología ha eliminado exitosamente las infestaciones en un rancho de 6,500 acres con un hato de elk y en uno de 40,000 acres con venado cola blanca, en el cual el descanso del pastizal y los baños de inmersión no han tenido éxito para eliminar las infestaciones por garrapatas. Otras tecnologías desarrolladas incluyen el comedero y autoaplicador de acaricidas para los venados<sup>(8-10)</sup>. Este instrumento redujo las poblaciones de garrapatas en venados en el noreste de los Estados Unidos en una amplia área de estudio con el fin de reducir la enfermedad de Lyme<sup>(11-21)</sup>. El concepto usado para el comedero a nivel del piso, de cuatro postes, fue modificado para producir uno elevado de dos postes, que fue diseñado por ser un instrumento ligero para la aplicación tópica en los comederos ya existentes para el suministro de proteínas y utilizados para alimentar venados cola blanca en el sur de Texas. Posteriormente, se han desarrollado nuevos rodillos aplicadores que requieren menos mantenimiento para mejorar la aplicación de pesticidas (Patente en trámite). En adición a estas

area-wide study to reduce Lime disease<sup>(11-21)</sup>. The concept used for the 4-poster was recently modified to produce a 2-poster device that was designed to be a lightweight topical application retrofit on existing protein feeders used to feed white-tailed deer in South Texas. Further, new application rollers have been developed that require less maintenance to achieve pesticide application (patent application submitted). In addition, a microprocessor-driven device capable of identifying and collaring or removing collars from individual deer has been developed<sup>(22)</sup>.

### **Acaricide resistance**

Acaricide resistance is widespread in Mexico, and the organophosphate, coumaphos, is the only acaricide approved for use in CFTEP dip vats. Outbreak strains of *R. (B.) microplus* in the United States resistant to organophosphate (OP) or pyrethroid (Pyr) acaricide were first discovered in 2004<sup>(23,24)</sup>. As of August 31, 2009, there have been seven additional outbreak strains exhibiting moderate or high resistance to pyrethroids, and no additional OP-resistant outbreaks. Laboratory studies utilizing the OP-resistant strain San Román, tested the ability of larvae, nymphs, and adults to survive dipping in various concentrations of coumaphos. Results of these studies indicated that a single dip of OP-resistant ticks in 0.6% (a.i.) coumaphos did not produce the level of control required for the CFTEP, requiring multiple dips to achieve the required level of control<sup>(25-27)</sup>.

Acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) insensitivity is considered to be the primary mechanism of OP-resistance in ticks as it is in insects (28-31). Within the last decade, three different cDNAs, *BmAChE1*, *BmAChE2*, and *BmAChE3* have been described that presumptively encode acetylcholinesterases in *R. (B.) microplus*<sup>(32-34)</sup>. Of these, the identity of only *BmAChE3* was established by expression of recombinant protein and biochemical verification that it was an acetylcholinesterase<sup>(35)</sup>. A mutation (R86Q) in *BmAChE3* resulted in approx. 20-fold decreased sensitivity to OP-inhibition, was present at increased frequency in resistant lab strains, but did not appear to be sufficient by itself to produce phenotypic resistance in laboratory tick strains. Differences in  $K_m$  values

innovaciones, se ha desarrollado e incorporado a estos instrumentos manipulado por un microprocesador capaz de identificar y colocar o remover los collares de venados individualmente<sup>(22)</sup>.

### Resistencia a los acaricidas

La resistencia a los acaricidas está ampliamente distribuida en México y el organofosforado coumafos, es el único acaricida autorizado para el uso en baños garrapaticidas en CFTEP. Brotes en los Estados Unidos provocados por cepas de garrapatas *R. (B.) microplus* resistentes a organofosforados (OP) o piretroides (Pyr), fueron descubiertos por primera vez en 2004<sup>(23,24)</sup>. Al 31 de agosto del 2009, han ocurrido otros siete brotes adicionales de cepas de garrapatas moderada o altamente resistentes a los piretroides, pero no se han reportado brotes de garrapatas resistentes a OP. Estudios de laboratorio utilizando la cepa “San Román” resistentes a OP fueron realizados para comprobar la capacidad de larvas ninfas y adultas para sobrevivir la inmersión en varias concentraciones de coumafos. Resultados de estos estudios indicaron que un solo baño de garrapatas resistentes a OP, con coumafos al 0.6% (de ingrediente activo) no produjo el nivel de control requerido por el CFTEP, necesiándose múltiples baños para alcanzar el nivel requerido de control<sup>(25-27)</sup>.

La insensibilidad de la acetilcolinesterasa (AChE, EC 3.1.1.7) se considera como uno de los principales mecanismos de resistencia a los OP, tanto en garrapatas como insectos<sup>(28-31)</sup>. Dentro de la última década, se han descrito tres diferentes cDNAs, *BmAChE1*, *BmAChE2*, y *BmAChE3*; como secuencias presuntamente codificantes de acetilcolinesterasas en *R. (B.) microplus*<sup>(32-34)</sup>. De éstas, con base en la expresión de la proteína recombinante y la verificación bioquímica, sólo se ha establecido la identidad de la *BmAChE3* como una acetilcolinesterasa<sup>(35)</sup>. Una mutación (R86Q) en *BmAChE3* que provoca una disminución aproximada de 20 veces la sensibilidad a la inhibición por OP, se ha presentado con mayor frecuencia en cepas de laboratorio resistentes, pero no pareció ser suficiente por si sola para producir resistencia fenotípica en cepas de garrapatas del laboratorio.

indicated an increased affinity for substrate (acetylthiocholine, ASCh) in the R86Q mutant. A slower rate of enzyme inhibition by paraoxon in the mutant was reflected in the lower  $k_1$  and  $k_2$  values. The wild-type enzyme was phosphorylated 19.2-times faster than the R86Q mutant. Five additional mutations in *BmAChE3* appeared to correlate with resistance status of the laboratory strains, with higher frequencies in OP-resistant strains and lower frequencies in susceptible strains; however, baculovirus expression constructs exhibited enzyme activity too low to permit characterization of biochemical properties<sup>(36)</sup>. A search for mutations associated with OP-resistance and development of genotyping assays for each of the mutations in *BmAChE3* revealed an association between the R86Q substitution in *BmAChE3* and OP-insensitive phenotype in laboratory and Mexican field-collected strains of *R. (B.) microplus*<sup>(36,37)</sup>. Similar genotyping studies of *BmAChE1* conducted for laboratory and field-collected strains of *R. (B.) microplus* revealed an apparent association of mutations P157S, Q488R, W571R, and W571F with phenotypic resistance (Temeyer unpublished).

We expressed recombinant constructs of BmAChE1 from OP-sensitive (Deutch5) and OP-resistant (Tux11) laboratory strains of *R. (B.) microplus*, as well as a construct of rBmAChE2. The rBmAChE3 construct, SR-BC26, had been previously characterized as susceptible to OP<sup>(35)</sup>. Recombinant constructs of BmAChE1, BmAChE2, and BmAChE3 were strongly inhibited by eserine sulfate and by the acetylcholinesterase-specific inhibitor BW284C51. As shown in Table 1, each of the rBmAChEs demonstrated a strong substrate preference for acetylthiocholine (ASCh) compared to butyrylthiocholine (BuSCh) as evidenced by comparative rates of substrate hydrolysis at 1 mM concentration, and by comparison of the  $V_{max}/K_m$  ratios for the two substrates, consistent with their identification as acetylcholinesterases (EC 3.1.1.7). The  $K_m$  value for the Tux11 (OP-resistant) rBmAChE1 construct was greatly elevated for butyrylthiocholine, but not for acetylthiocholine, indicating a substantial increase in substrate specificity compared to the Deutch5 (OP-

Las diferencias en los valores de  $K_m$  indicaron un incremento en la actividad del sustrato (Acetilcolina, ASCh) en la mutante R86Q. Una disminución en la tasa de inhibición enzimática por Paraoxón en la cepa mutante, fue reflejada en la disminución de los valores  $k_1$  y  $k_2$ . El tipo silvestre de la enzima fue fosforilada 19.2 veces más rápido que la cepa mutante R86Q. Cinco mutaciones adicionales en *BmAChE* parecieron correlacionar con el estatus de resistencia de las cepas de laboratorio, altas frecuencias genotípicas en cepas resistentes a organofosforados y bajas frecuencias en cepas susceptibles; sin embargo, la expresión en baculovirus de las construcciones, exhibieron poca actividad enzimática, por lo que no fue posible la caracterización de las propiedades bioquímicas<sup>(36)</sup>. La búsqueda de mutaciones asociadas con la resistencia a OP y el desarrollo de ensayos para la genotipificación para cada una de las mutaciones en *BmAChE3* reveló una asociación entre la sustitución R86Q en *BmAChE3* y el fenotipo insensible a los OP en cepas mexicanas de *R.(B.) microplus* de laboratorio y de campo<sup>(36,37)</sup>. Estudios similares de genotipificación revelaron una aparente asociación de las mutaciones P157S, Q488R, W571R, y W571F con la resistencia fenotípica (Temeyer, datos no publicados).

Se expresaron, construcciones recombinantes de *BmAChE1* de cepas de laboratorio sensibles a OP (Deutch5) y resistentes a OP (Tux11), así como una construcción de *rBmAChE2*. La construcción *rBmAChE3*, SR-BC26, ha sido previamente caracterizada como resistente a OP<sup>(35)</sup>. Las construcciones recombinantes de *BmAChE1*, *BmAChE2*, y *BmAChE3*, fueron fuertemente inhibidas por sulfato de eserina y por el inhibidor específico de acetilcolinesterasas BW284C51. Como se muestra en el Cuadro 1, cada una de las *rBmAChEs* demostraron una fuerte preferencia por la acetilcolina (ASCh) comparada con la butiriltiocolina (BuSCh), según los valores de la tasa comparativa de hidrólisis del sustrato a una concentración 1 mM, y por comparación de los índices de  $V_{max}/K_m$  para los dos sustratos, consistentes con su identificación como acetilcolinesterasas (EC 3.1.1.7). El valor de la constante  $K_m$  para el construido *rBmAChE1* de la cepa tux11 (resistente a OP) fue particularmente elevado para la butiriltiocolina (BuSCh), pero no

susceptible) construct.  $V_{max}$  values were substantially higher for acetylthiocholine (ASCh) than for butyrylthiocholine (BuSCh), reflecting substrate preference. The Tux11 construct was by far the most resistant to inhibition by paraoxon, exhibiting 20-fold higher resistant to inhibition than any other construct tested. We conclude that *rBmAChE1*, *rBmAChE2*, and *rBmAChE3* are appropriately identified as acetylcholinesterases based on substrate preference, sensitivity to AChE inhibitors, and general biochemical properties.

Amino acid sequences of the *rBmAChE* constructs were compared to sequences listed in GenBank to identify substitutions. Frequencies of amino acid substitutions present in Tux11, but not in Deutch5 were determined by cDNA sequencing for independent *BmAChE1* transcripts from OP-susceptible (OP-S) or OP-resistant (OP-R) strains. *BmAChE1* amino acid substitutions D188G, E196G, V331A, and F390S were all present at higher frequency in the OP-R transcripts than the OP-S transcripts, again suggesting an association with OP resistance (Temeyer unpublished).

We determined the AChE-OP-R/S biochemical phenotype for individual adult ticks<sup>(38,39)</sup>, reasoning that comparison of their genotypes might reveal genetic differences correlating with their differing biochemical phenotypes. Adult tick synganglia were divided, one half was used for AChE biochemical assay and the remaining half was preserved in RNALater for genetic analysis. Total RNA was isolated from each of the RNALater-preserved half synganglia and used for cDNA construction and sequencing. We were surprised to obtain more than two transcripts for each of the *BmAChEs*, suggesting alternative splicing of transcripts, or the presence of more than two alleles for each of the *BmAChE* genes. Further, sequencing of genomic DNA for *BmAChE1* found a 664 bp intron at position 1663-4 that appeared to be present in one allele, but not in another, suggesting gene duplication with associated loss/gain of the intron (Temeyer unpublished).

Quantitative real time-PCR (QRT-PCR) was utilized to determine relative expression of *BmAChE1*, *BmAChE2*, and *BmAChE3* mRNAs in whole larvae and adult tick synganglion. Adult



NUEVOS ENFOQUES PARA EL CONTROL DE *Rhipicephalus (B.) microplus*

para la acetiltiocolina (ASCh), indicando un incremento sustancial en la especificidad del sustrato comparado con el construido de la cepa Deutch5 (susceptible a OP). Los valores de  $V_{max}$  fueron significativamente más elevados para la AChE que para la BuSCh, lo cual refleja la preferencia por el sustrato. El construido de la cepa Tux11 fue significativamente más resistente a la inhibición que cualquiera de los construidos analizados. Con base en esto concluimos que las construcciones rBmAChE1, rBmAChE2 y rBmAChE1 rBmAChE3, son propiamente identificadas como acetilcolinesterasas con base en su preferencia por el sustrato, sensibilidad a los inhibidores de acetilcolinesterasas y propiedades bioquímicas generales. La secuencia de aminoácidos de los construidos de rBmAChE fueron comparados con las secuencias enlistadas en el GenBank para identificar sustituciones. Las frecuencias de las

*R. (B.) microplus* synganglia were dissected and placed in RNALater at 4 °C for 24 h, then frozen until use. Total RNA was isolated from frozen unfed larvae or from adult tick synganglia using TriReagent (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO). First strand cDNA was prepared using SuperScript III Reverse Transcriptase with oligo(dT24V) primer. Quantitative RT-PCR was utilized to assess relative expression of *BmAChE1*, *BmAChE2*, and *BmAChE3* in whole tick larvae or adult synganglion using cycling conditions beginning with 2 min at 95 °C to activate the DNA polymerase, followed by 40 cycles of 20 sec at 95 °C, 1 min at 57 °C, and 1 min at 72 °C. Relative expression ratio in larvae was 1:1.6:1.9 compared to 1.2:3.6:1 for adult synganglion for *BmAChE1*:*BmAChE2*:*BmAChE3*, respectively, suggesting that expression of the three *BmAChEs* is individually developmentally regulated.

Cuadro 1: Propiedades Bioquímicas de las rBmAChEs  
Table 1. Biochemical Properties of rBmAChEs

	Substrate Hydrolysis AcSCh:BuSCh (1 mM)	$V_{max}/K_m$ AcSCh	$V_{max}/K_m$ BuSCh	$K_m$ AcSCh ( $\mu M$ )	$K_m$ BuSCh ( $\mu M$ )	$V_{max}^a$ AcSCh	$V_{max}^a$ BuSCh
<b>rBmAChE1:</b>							
Deutch5	28:1	2.13	2.45	4.25	1.42	9.05	0.33
Tux11	4:1	0.04	0.0003	5.20	320.23	0.21	0.09
<b>rBmAChE2:</b>							
SR12	4:1	0.03	0.00043	52.7	71.91	0.17	0.03
<b>rBmAChE3:</b>							
SR-BC26	26:1	0.048	0.00036	90.19	309.3	4.31	0.11

<sup>a</sup>( $10^{-7}$ molmin<sup>-1</sup>ul<sup>-1</sup>)

sustituciones de aminoácidos presentes en Tux11, pero no en la cepa Deutch5 fueron determinadas por la secuenciación del cDNA de transcritos independientes de *BmAChE* de cepas susceptibles a organofosforados (OP), (OP-S) o resistentes (OP-R). Las sustituciones D188G, E196G, V331A y F390S, estuvieron presentes con mayor frecuencia en la secuencia del gen *BmAChE1* de las cepas resistentes a OP, que en los transcritos de las cepas susceptibles, lo cual nuevamente sugiere una asociación con la resistencia a los OP (Temeyer, datos no publicados). Se determinaron los fenotipos bioquímicos

RNA interference (RNAi) was used to silence each of the *BmAChEs* individually or in combination in unfed adult female ticks. *R. (B.) microplus*  $\beta$ -actin was used as an internal reference gene for normalization, and as a positive control for silencing. Double-stranded RNA from the coding regions of the *BmAChE* or  $\beta$ -actin genes was microinjected (100-400 ng dsRNA in 50-300 nL phosphate-buffered saline, PBS) into the hemocoel of 35 unfed adult female *R. microplus* ticks per group. Microinjection used drawn glass capillary needles mounted on a Hamilton “gas-tight” 10  $\mu$ l syringe with motorized dispensing. Control groups included

AChE-OP-R/S individuales de garrapatas adultas<sup>(38,39)</sup>, con el fin de encontrar una correlación entre las diferencias de los genotipos y sus fenotipos bioquímicos. El singanglión de garrapatas adultas fue dividido en dos, la mitad se utilizó para la determinación bioquímica de la actividad de AChE y la otra mitad fue conservada en RNALater para el análisis genético posterior. Se extrajo el RNA total de cada una de las muestras de singanglión preservadas en RNALater, y se utilizó para la construcción de su cDNA y posterior secuenciación. Fue una sorpresa la obtención de más de dos transcritos para cada una de las *BmAChEs*, lo cual sugiere arreglos alternativos de los transcritos, o la presencia de más de dos alelos para cada uno de los genes de *BmAChE*. La secuenciación posterior del DNA genómico para *BmACh1* encontró un intrón de 664 bp en la posición 1663-4 en sólo uno de los alelos, lo cual sugiere una duplicación del gen asociado con la pérdida/ganancia del intrón (Temeyer, datos no publicados).

Se utilizó el ensayo de PCR cuantitativo en tiempo real (QRT-PCR), para determinar la expresión relativa de los RNA mensajeros de *BmAChE1*, *BmAChE2*, y *BmAChE3* en larvas individuales y en el singanglión de garrapatas adultas. El singanglión de garrapatas adultas fue seccionado y colocado en RNALater a 4 °C por 24 h y posteriormente congelado hasta su uso. Se extrajo RNA total a partir de larvas sin alimentar, congeladas o del singanglión de garrapatas adultas usando TriReagent (Sigma Chemical Co., St. Louis MO). La primera cadena de cDNA fue sintetizada usando Transcriptasa Reversa SuperScript III, con un oligo (dT24V) iniciador. QRT-PCR se utilizó para evaluar la expresión relativa de los genes *BmAChE1*, *BmAChE2*, y *BmAChE3* en larvas individuales o en el singanglión de hembras adultas aplicando un programa con las siguientes condiciones: 2 min at 95 °C para activar la DNA polimerasa, seguido de 40 ciclos de 20 s a 95° C, 1 min a 57 °C, y un min a 72 °C. La expresión relativa en larvas fue 1:1.6:1.9 comparado con 1.2:3.6:1 en el singanglión de garrapatas adultas para los genes *BmAChE1*:*BmAChE2*:*BmAChE3*, respectivamente, lo cual sugiere que la expresión es regulada de manera individual.

uninjected ticks or those injected with PBS alone. Uninjected males were paired with the experimental group ticks and placed in stockinettes glued to the backs of host cattle. Ticks were removed and dissected at various time intervals following injection to monitor changes in mRNA expression. Dissected tissues were stored in RNALater, and frozen until use. Engorgement time, engorged weight, egg mass, and egg hatch were monitored to determine phenotypic effects of AChE silencing, and qRT-PCR was used to evaluate mRNA expression levels. Results of qRT-PCR demonstrated 93-99 % silencing of  $\beta$ -actin transcripts by 48 hr. post-injection, with 70 % mortality prior to detachment, and survivors weighed 37 % control weight and produced no eggs. Injection of dsRNA for a single *BmAChE* did not produce measurable silencing of *BmAChE* synganglial transcripts by 48 h and engorged ticks did not display any biometric parameters different from controls. In contrast, injection with dsRNA for all three *BmAChEs* resulted in approx. 50 % mortality of ticks prior to detachment. We interpreted the results to indicate functional complementation of *BmAChEs in vivo*.

The data we have gathered regarding the biochemical characteristics of the three *R. (B.) microplus* AChEs suggests that if each of the *BmAChEs* play a separate and vital role in tick physiology, it may be necessary to have mutations in more than one of them, in the absence of metabolic resistance, to produce phenotypic resistance to OP. Based on the functional complementation observed for *BmAChEs* in gene silencing experiments, acquisition of a second target site-insensitive *BmAChE* would likely substantially increase phenotypic resistance to OP. The coumaphos-based dip barrier to reentry of the cattle fever tick into the U.S. will likely fail if current resistance levels increase. It is clear that the acetylcholinesterases of *R. (B.) microplus* present multiple possible routes for generation of acaricide resistance; however, the specific physiological roles played by the individual *BmAChEs* remain to be elucidated and may present novel opportunities for interference with these vital targets.

Se empleó la técnica de Interferencia de RNA (RNAi) para silenciar cada una de las *BmAChEs*, individualmente ó combinadas inyectando garrapatas hembras adultas sin alimentar. Se utilizó el gen de la  $\beta$ -actina de *R. (B.) microplus* como un gen interno de referencia para la normalización y como control positivo de silenciamiento. Se microinyectó RNA de doble cadena (dsRNA) de las regiones codificantes del gen de *BmAChE*, o de  $\beta$ -actina (100-400 ng dsRNA en 50-300 nL de solución salina amortiguadora de fosfatos, (PBS) en el hemocele en un grupo de 35 garrapatas hembras adultas sin alimentar. Para la microinyección se utilizaron agujas capilares montadas en jeringas Hamilton de 10  $\mu$ l acopladas a un dispensador automatizado. Los grupos control incluyeron garrapatas no inyectadas e inyectadas solo con PBS. Se cruzaron machos sin inyectar con las hembras de los grupos experimentales y se colocaron en cámaras colocadas en los lomos de bovinos mantenidos en aislamiento. Las garrapatas fueron removidas y disectadas en diferentes tiempos posteriores a la inyección para monitorear los cambios en los niveles de expresión de los mRNA. Los tejidos disectados fueron almacenados en RNALater y congelados hasta su uso. Para determinar los efectos fenotípicos del silenciamiento de la AChE El tiempo de ingurgitamiento se determinaron los pesos de las hembras ingurgitadas y de la masa de huevos y la tasa de eclosión, y se utilizó el QRT-PCR para evaluar los niveles de expresión de los mRNA. Los resultados demostraron que el 93 a 96 % de silenciamiento del gen de los transcritos de la  $\beta$ -actina se llevó a cabo a las 48 h postinyección, con 70 % de mortalidad antes del desprendimiento; los sobrevivientes pesaron el 37 % del peso de los controles y no ovipositaron. La inyección del RNA de doble cadena de solo uno de los genes de *BmAChE* no produjo un silenciamiento medible de los transcritos de *BmAChE* del singanglón dentro de las 48 hrs y las hembras adultas ingurgitadas no mostraron ningún parámetro biométrico diferente del de los controles. En contraste, la inyección con dsRNA de los tres genes *BmAChE*'s produjo el 50 % de mortalidad en las garrapatas antes del desprendimiento. Los resultados se interpretaron como la complementación funcional del

#### **Future prospects for cattle fever tick control**

We are investigating alternative control options including, i) the development of anti-tick and anti-*Babesia* vaccines for cattle and other tick hosts, ii) novel acaricide chemistries and delivery options, and iii) expanding genomic resources available for *R. (B.) microplus*.

*R. (B.) microplus*, a one-host tick, must cope with the pressures of the immune response resulting from the feeding of all life stages on a single host. Successful parasitism requires host immune system evasion for approximately 21-24 d. The antihaemostatic, anti-inflammatory, and immuno-suppressive nature of tick saliva has been documented for numerous ixodid tick species<sup>(40,41)</sup>, and extensive salivary gland transcriptome/sialome data for *I. scapularis*, *I. pacificus*, *A. variegatum*, and *R. appendiculatus* have provided remarkable insight into the array of molecules produced by this tissue that aid in successful tick feeding<sup>(42-45)</sup>.

Santos *et al* [46] briefly reported on transcripts expressed in salivary glands of rapidly engorging, adult *R. (Boophilus) microplus*. In our efforts to describe sequences expressed during early (1-2 d on host) and late (4-5 d on host) adult female *R. (Boophilus) microplus* feeding, we sequenced a cDNA library constructed from salivary gland tissues representing these particular periods. Seven transcripts isolated from the early-stage feeding library displayed significant sequence similarity to salivary gland metalloproteases that have been reported for *I. scapularis*<sup>(47)</sup>, *I. pacificus*<sup>(43)</sup>, *I. ricinus*, and recently *Haemaphysalis longicornus*. We determined the full-length sequence for five of these transcripts and analyzed their expression profile at various stages in *R. (Boophilus) microplus* development. Further, we are pursuing in-depth characterization of four transcripts that display significant sequence similarity with Kunitz-like proteins, which are implicated in enabling successful tick feeding by preventing host coagulation<sup>(48,49)</sup>.

We are also beginning studies that will characterize the acquired immune response of white-tailed deer following consecutive tick infestations, and we will test the capability of white-tailed deer to serve as reservoir hosts of *Babesia bovis*. The first hypothesis we will test

silenciamiento de *BmAChE's in vivo*.

Los datos obtenidos sin importar las características bioquímicas de las tres *BmAChE's*, sugieren que cada una de las colinesterasas juegan de manera individual un papel vital e importante en la fisiología de la garrapat, y la presencia de las mutaciones, pueden ser importantes en más de uno de los genes en ausencia de resistencia metabólica (en condiciones naturales), para poder producir una resistencia fenotípica a los OP. La barrera del baño de inmersión en coumafos, para prevenir la reentrada de la garrapata del ganado a los Estados Unidos, fallará si los niveles de resistencia se incrementan. Es claro que las acetilcolinesterasas de *R. (B.) microplus* poseen múltiples rutas posibles para la generación de resistencia; sin embargo el papel fisiológico específico que juegan cada uno de estos genes, de manera individual, todavía es un misterio por resolver. Estos blancos vitales pueden presentar nuevas oportunidades para diseñar ensayos de interferencia prometedores.

#### **Futuros prospectos para el control de la garrapata de la fiebre del ganado**

Actualmente se investigan opciones de control alternativo que incluyen: i) el desarrollo de vacunas contra garrapatas y *Babesia sp.* del ganado y de otras especies hospedadoras, II) nuevos acaricidas y excipientes y iii) la expansión de recursos de origen genómico disponibles para *R. (B.) microplus*.

*R. (B.) microplus*, una garrapata de un solo hospedador, debe sortear la presión de la respuesta inmune que resulta de alimentarse en todos los estadios sobre un solo hospedador. Un parasitismo exitoso requiere de un mecanismo de evasión que perdure entre 21 a 24 días. La naturaleza antihemostática, anti-inflamatoria e inmunosupresora de su saliva ha sido ampliamente documentada en varias especies de garrapatas ixodidas<sup>(40,41)</sup>, así como en el transcriptoma/sialoma de las glándulas salivales de *I. scapularis*, *I. pacificus*, *A. variegatum* y *R. appendiculatus*, que han llevado a encontrar un conjunto notable de moléculas producidas en el tejido y que ayudan en el proceso de alimentación de las garrapatas exitoso<sup>(42-45)</sup>.

Santos *et al*<sup>(46)</sup> brevemente, publicaron transcritos

is that white-tailed deer develop acquired immunological resistance to cattle fever ticks as a result of repeated exposure. This knowledge is essential to evaluate protective immune responses in deer so that appropriate vaccine candidates and adjuvants can be selected for future anti-tick vaccine trials. The second hypothesis is that adult female cattle fever ticks acquire *B. bovis* from white-tailed deer and transovarially transmit the parasite to larval progeny<sup>(50,51)</sup>, which are then capable of infecting a naïve bovine host.

We are in the process of identifying and characterizing of novel immune targets expressed by *B. bovis*. Using the completed *B. bovis* genome sequence<sup>(52)</sup>, we will identify antigens expressed in tick and mammalian host stages of the parasite that are predicted to be targets of the bovine immune system. The immune response to recombinant forms of these proteins will be tested in immunization studies.

In addition, we have developed a Reverse Line Blot (RLB) that will be utilized to test for the presence of *Babesia sp.* DNA<sup>(53)</sup> in cattle fever ticks found in Mexico and U.S. outbreak infestations. We will be testing the hypothesis that the level of cattle exposure to *Babesia* can be determined using this assay. The data obtained on the prevalence of these pathogens will aid the CFTEP by helping determine where resources can most efficiently be directed.

Investigations directed to elucidation of the complete genome of *R. (B.) microplus* are continuing. Currently we have obtained 650 million bp of sequence comprising approx. 9 % of the total genome estimated at 7.1 billion bp. Bacterial artificial chromosomes (BAC) are being sequenced and have revealed extensive areas of highly repetitive DNA sequences (Guerrero unpublished). We have identified approx 15,000 gene coding regions (incomplete sequences) and have assigned putative functions to 5,600 of them. We have identified specific membrane proteins from the tick gut and ovary as potential vaccine candidates and are beginning RNA interference studies.

Finally, we have developed tests for acaricide resistance<sup>(54,55)</sup> and studies are underway to develop and test novel acaricide chemistries and delivery options, including synergized formulations and extended release formulations,

expresados en las glándulas salivares de hembras adultas de rápida ingurgitación de *R. (Boophilus) microplus*. En nuestros esfuerzos por describir secuencias durante la alimentación temprana (1-2 días sobre el hospedador) o tardía (4-5 días sobre el hospedador) de la hembra adulta de *R. (Boophilus) microplus*, se secuenció una biblioteca de cDNA de tejido de glándula salival representativas de estos dos periodos en particular. Se encontraron siete transcritos de la biblioteca construida a partir de tejidos de glándulas del estadio de alimentación temprano, que mostraron una significativa similitud con metaloproteasas descritas en las garrapatas *I. scapularis*<sup>(47)</sup>, *I. pacificus*<sup>(43)</sup>, *I. ricinus* y recientemente *Haemophysalis longicornis*. Se determinó la secuencia completa de estos cinco transcritos y se analizó el perfil de expresión en varios estadios de desarrollo de *R. (B.) microplus*. Además se están caracterizando a profundidad cuatro transcritos que muestran una significativa similitud en la secuencia con una proteína similar a la proteína Kunitz, implicada en la inhibición de la coagulación en el proceso de alimentación de las garrapatas<sup>(48,49)</sup>.

hipótesis a probar será que el venado adquiere resistencia inmunológica a las garrapatas del ganado como resultado de las exposiciones repetidas. La generación de este conocimiento es esencial para evaluar la respuesta inmune protectora en venados, con el fin de seleccionar las vacunas y adyuvantes apropiados para experimentos futuros de vacunación. La segunda hipótesis, es que la hembra adulta de la garrapata adquiere a la *Babesia bovis* del venado cola blanca y lo transmite de manera transovárica a la progenie larval<sup>(50,51)</sup>, la cual es capaz de infectar a los hospedadores bovinos nunca antes expuestos.

Se está en el proceso de identificar y caracterizar a nuevos inmunógenos blanco expresados por *B. bovis*. Se identificarán antígenos expresados en garrapatas y etapas parásitas del parásito en el hospedador mamífero, en los que se pueda predecir la capacidad de ser utilizados como blancos del sistema inmune de los bovinos. La respuesta inmune en contra de las formas recombinantes serán probadas en estudios de inmunización. Además, se ha diseñado un sistema de Adsorción en Línea Reversa (RLB) que será probado para determinar la presencia de

including injectable microspheres<sup>(56-60)</sup>.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Funded by U.S. Department of Agriculture, CRIS Project No: 6205-32000-026-00D; Project Title: MOLECULAR BIOLOGY OF *BOOPHILUS MICROPLUS*

*End of English version*

DNA de *Babesia sp.*<sup>(53)</sup> en garrapatas del ganado encontradas en brotes de infestaciones en México y en los Estados Unidos. Se probará la hipótesis de que el nivel de exposición del ganado a la *Babesia* se puede determinar usando este ensayo. Los datos obtenidos en la prevalencia de estos patógenos serán de gran ayuda para que el CFTEP, determine hacia donde pueden dirigirse los recursos para que sean más eficientes.

Las investigaciones dirigidas hacia la elucidación del genoma completo de *R. (B.) microplus* siguen vigentes. Actualmente se han secuenciado 650 millones de bp, lo que comprende aproximadamente 9 % del genoma total estimado en 7.1 mil millones de pares de bases. Cromosomas artificiales bacterianos (BACs) están siendo secuenciados, y en este momento se han revelado grandes áreas de secuencias de DNA repetitivo (Guerrero, datos no publicados). Se han identificado aproximadamente 15,000 regiones codificantes de genes y se le han asignado una función putativa a 5,600 de ellos. Se han identificado proteínas específicas de las membranas celulares del intestino y ovario de las garrapatas, como candidatos potenciales de las vacunas y se han iniciado ensayos de interferencia de RNA.

Finalmente, hemos desarrollado ensayos para resistencia a los acaricidas<sup>(54,55)</sup> y se están realizando estudios para desarrollar y probar nuevos acaricidas químicos y nuevos métodos para suministrarlos, incluyendo formulaciones con sinergistas y formulaciones de liberación lenta, incluyendo microesferas inyectables<sup>(56-60)</sup>.

## AGRADECIMIENTOS

Financiado por USDA, Proyecto CRIS No. 6205-32000-026-00D; Títulado: BIOLOGÍA MOLECULAR DE *BOOPHILUS MICROPLUS*.

## LITERATURA CITADA

1. Graham OH, Hourrigan JL. Eradication programs for the arthropod parasites of livestock. *J Med Entomol* 1977;13:629-65.
2. McDonald, J.S. and K. V. Miller. A history of white-tailed deer restocking in the United States. 1878-2004. Quality Deer Management Association, Watkinsville, GA. 2004.
3. Cooksey LM, Davey RB, Ahrens EH, George JE. Suitability of white-tailed deer as hosts for cattle fever ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1989; 26:155-158.
4. Davey RB. Failure of white-tailed deer, *Odocoileus virginianus* L. to sustain a population of cattle ticks, *Boophilus annulatus* (Say), through successive generations. *J Parasitol* 1990;76:356-359.
5. Hillman B. News Release: Good news, bad news for cattle fever tick eradication effort. Texas Animal Health Commission, April, 2009 [on line]. ([www.tahc.state.tx.us/news/pr/2009/2009Apr\\_FeverTickQuarantineNews.pdf](http://www.tahc.state.tx.us/news/pr/2009/2009Apr_FeverTickQuarantineNews.pdf))
6. George JE, Pound JM, Kammlah D, Lohmeyer KH. Presumptive evidence for the role of white-tailed deer in the epidemiology of *Rhipicephalus (Boophilus) annulatus* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). In: Proc VI Inter Seminar Anim Parasitol, September 3-5, Veracruz, México. 2008.
7. Pound JM, Miller JA, George JE, Oehler DD, Harmel DE. Systemic treatment of white-tailed deer with ivermectin-medicated bait to control free-living populations of lone star ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1996;33:385-394.
8. Pound JM, Miller JA, LeMeilleur CA. Device and method for its use as an aid in control of ticks and other ectoparasites on wildlife. U.S. Patent #5,367,983 dated 29 November 1994 assigned to The United States of America as represented by the Secretary of Agriculture, Washington, DC. 1994.
9. Pound JM, Miller JA, George JE, Lemeilleur CA. The '4-Poster' Passive Topical Treatment device to apply acaricide for controlling ticks (Acari: Ixodidae) feeding on White-Tailed deer. *J Med Entomol* 2000;37: 588-594.
10. Pound JM, Miller JA, George JE. Efficacy of amitraz applied to white-tailed deer by the '4-poster' topical treatment device in controlling free-living lone star ticks (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 2000;37:878-884.
11. Fish D, Childs JE. Community-based prevention of Lyme disease and other tick-borne diseases through topical application of acaricide to White-tailed deer: Background and rationale. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:355-356.
12. Pound JM, Miller JA, George JE, Fish D. The United States Department of Agriculture northeast area-wide tick control project: history and protocol. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:365-370.
13. Stafford KC 3<sup>rd</sup>, Denicola AJ, Pound JM, Miller JA, George JE. Topical treatment of white-tailed deer with an acaricide for the control of *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in a Connecticut Lyme borreliosis hyperendemic community. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:371-379.
14. Daniels TJ, Falco RC, McHugh EE, Vellozzi J, Boccia T, Denicola AJ, Pound JM, Miller JA, George JE, Fish D. Acaricidal treatment of white-tailed deer to control *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae) in a New York Lyme disease-endemic community. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:381-387.
15. Schulze TL, Jordan RA, Hung RW, Schulze CJ. Effectiveness of the 4-Poster passive topical treatment device in the control of *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) in New Jersey. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:389-400.
16. Miller NJ, Thomas WA, Mather TN. Evaluating a deer-targeted acaricide applicator for area-wide suppression of Blacklegged ticks, *Ixodes scapularis* (Acari: Ixodidae), in Rhode Island. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:401-406.
17. Carroll JF, Hill DE, Allen PC, Young KW, Miramontes E, Kramer M, Pound JM, Miller JA, George JE. The impact of 4-poster deer self-treatment devices at three locations in Maryland. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:407-416.
18. Carroll JF, Pound JM, Miller JA, Kramer M. Sustained control of Gibson Island, Maryland, populations of *Ixodes scapularis* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) by community-administered 4-poster deer self-treatment bait stations. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:417-421.
19. Brei B, Brownstein JS, George JE, Pound JM, Miller JA, Daniels TJ, Falco RC, Stafford KC 3<sup>rd</sup>, Schulze TL, Mather TN, Carroll JF, Fish D. Evaluation of the United States Department of Agriculture Northeast Area-wide Tick Control Project by meta-analysis. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:423-430.
20. Hoen AG, Rollend LG, Papero MA, Carroll JF, Daniels TJ, Mather TN, Schulze TL, Stafford KC, Fish D. Effects of tick control by acaricide self-treatment of White-tailed deer on host-seeking tick infection prevalence and entomologic risk for *Ixodes scapularis*-borne pathogens. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:431-438.
21. Pound JM, Miller JA, George JE, Fish D, Carroll JF, Schulze TL, Daniels TJ, Falco RC, Stafford KC, Mather TN. The United States Department of Agriculture northeast area-wide tick control project: summary and conclusions. *Vector Borne Zoonotic Dis* 2009;9:439-448.
22. Pound JM, LeMeilleur CA. Device and method for application of collars to animals. U.S. Patent #5,881,672 dated 16 March 1999 assigned to The United States of

NUEVOS ENFOQUES PARA EL CONTROL DE *Rhipicephalus (B.) microplus*

- America as represented by the Secretary of Agriculture, Washington, DC. 1999.
23. Miller R, Davey RB, George JE. First report of permethrin-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) within the United States. *J Med Entomol* 2005; 44:308-315.
  24. Miller R, Davey RB, George JE. First report of organophosphate-resistant *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) within the United States. *J Med Entomol* 2005;45:912-917.
  25. Davey, RB, George JE. Efficacy of coumaphos applied as a dip for control of an organophosphorus-resistant strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. *J Econ Entomol* 1999;92:1384-1391.
  26. Davey RB, George JE, Miller RJ. Efficacy of various concentrations of coumaphos to control adult, nymphal, and larval stages of an organophosphate-resistant strain of *Boophilus microplus* on infested cattle. *Am J Vet Res* 2003;64:684-689.
  27. Davey RB, George JE, Miller RJ. Control of an organophosphate-resistant strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infested on cattle after a series of dips in coumaphos applied at different treatment intervals. *J Med Entomol* 2004;41:524-428.
  28. Fournier D. Mutations of acetylcholinesterase which confer insecticide resistance in insect populations. *Chem Biol Interact* 2005;157:257-261.
  29. Villatte F, Ziliani P, Marcel V, Menozzi P, Fournier D. A high number of mutations may provide insecticide-resistance in insect acetylcholinesterase. *Pestic Biochem Physiol* 2000;67:95-102.
  30. Li AY, Davey RB, Miller RJ, George JE. Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. *J Med Entomol* 2003; 40:482-490.
  31. Li AY, Pruett JH, Davey RB, George JE. Toxicological and biochemical characterization of coumaphos resistance in the San Roman strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Pestic Biochem Physiol* 2005;81:145-153.
  32. Baxter GD, Barker SC. Acetylcholinesterase cDNA of the cattle tick, *Boophilus microplus*: characterization and role in organophosphate resistance. *Insect Biochem Mol Biol* 1998;28:581-589.
  33. Hernandez R, He H, Chen AC, Ivy GW, George JE, Wagner GG. Cloning and sequencing of a putative acetylcholinesterase from *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1999;36:764-770.
  34. Temeyer KB, Davey RB, Chen AC. Identification of a third *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) cDNA presumptively encoding an acetylcholinesterase. *J Med Entomol* 2004;41:259-268.
  35. Temeyer KB, Pruett JH, Untalan PM, Chen AC. Baculovirus expression of *BmAChE3*, a cDNA encoding an acetylcholinesterase of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 2006;43:707-712.
  36. Temeyer KB, Pruett JH, Olafson PU, Chen AC. R86Q, a mutation in *BmAChE3* yielding a *Rhipicephalus microplus* organophosphate-insensitive acetylcholinesterase. *J Med Entomol* 2007;44:1013-1018.
  37. Temeyer KB, Olafson PU, Miller RJ. Genotyping mutations in *BmAChE3*: a survey of organophosphate-resistant and -susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J Med Entomol* 2009 [in press].
  38. Pruett JH. Comparative inhibition kinetics for acetylcholinesterase extracted from organophosphate resistant and susceptible strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Econ Entomol* 2002;95:1239-1244.
  39. Pruett JH Jr, Pound JM. Biochemical diagnosis of organophosphate-insensitivity with neural acetylcholinesterase extracted by sonication from the adult tick synganglion. *Vet Parasitol* 2006;135:355-363.
  40. Gillespie RD, Mbow ML, Titus RG. The immunomodulatory factors of bloodfeeding arthropod saliva. *Parasite Immunol* 2000;22:319-331.
  41. Ribeiro JM, Francischetti IM. Role of arthropod saliva in blood feeding: sialome and post sialome perspectives. *Annu Rev Entomol* 2003;48:73-88.
  42. Valenzuela JG, Francischetti IM., Pham VM, Garfield MK, Mather .N, Ribeiro JMC. Exploring the sialome of the tick *Ixodes scapularis*. *J Exp Biol* 2002; 205:2843-2864.
  43. Francischetti IM, My Pham V, Mans BJ, Andersen JF, Mather TN, Lane RS, Ribeiro JM. The transcriptome of the salivary glands of the female western black-legged tick *Ixodes pacificus* (Acari: Ixodidae). *Insect Biochem Mol Biol* 2005;35:1142-1161.
  44. Nene V, Lee D, Quackenbush J, Skilton R, Mwaura S, Gardner MJ, Bishop R. AvGI, an index of genes transcribed in the salivary glands of the ixodid tick, *Amblyomma variegatum*. *Int J Parasitol* 2002;32:1447-1456.
  45. Nene V, Lee D, Kang'a S, Skilton R, Shah T, de Villiers E, Mwaura S, Taylor D, Quackenbush J, Bishop R. Genes transcribed in the salivary glands of female *Rhipicephalus appendiculatus* ticks infected with *Theileria parva*. *Ins Biochem Mol Biol* 2004;34:1117-1128.
  46. Santos IK, Valenzuela JG, Ribeiro JM, de Castro M, Costa JN, Costa AM, da Silva ER, Neto OB, Rocha C, Daffre S, Ferreira BR, da Silva JS, Szabó MP, Bechara GH. Gene discovery in *Boophilus microplus*, the cattle tick: the transcriptomes of ovaries, salivary glands, and hemocytes. *Ann N Y Acad Sci* 2004;1026:242-6.
  47. ER, Neto OB, Rocha C, Daffre S, Ferreira BR, da Silva JS, Szabó MP, Bechara GH. Francischetti IMB, Mather TN, Ribeiro MC. Cloning of a salivary gland metalloprotease and characterization of gelatinase and fibrin(ogen)lytic activities in the saliva of the Lyme disease tick vector *Ixodes scapularis*. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;305:869-875.
  48. Maritz-Olivier C, Stutzer C, Jongejan F, Neitz AWH, Gaspar ARM. Tick anti-hemostatics: targets for future

- vaccines and therapeutics. Trends Parasitol 2007;23:397-407.
49. Corral-Rodriguez MA, Macedo-Ribeiro S, Pereira PJB, Fuentes-Prior P. Tick-derived Kunitz-type inhibitors as antihemostatic factors. Insect Biochem Mol Biol 2009;39:579-595.
50. Howell JM, Ueti MW, Palmer GH, Scoles GA, Knowles DP. Persistently infected calves as reservoirs for acquisition and transovarial transmission of *Babesia bovis* by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. J Clin Microbiol 2007; 45:3155-3159.
51. Howell JM, Ueti MW, Palmer GH, Scoles GA, Knowles DP. Transovarial transmission efficiency of *Babesia bovis* tick stages acquired by *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* during acute infection. J Clin Microbiol 2007;45:426-431.
52. Brayton KA, Lau AOT, Herndon DR, Hannick L, Kappmeyer LS, Berens SJ, Bidwell SL, *et al.* Genome sequence of *Babesia bovis* and comparative analysis of apicomplexan hemoprotozoa. PLoS Pathogens 2007;3:1401-1413.
53. Laughery JM, Lau AOT, White SN, Howell JM, Suarez CE. *Babesia bovis*: transcriptional analysis of rRNA gene unit expression. Exp Parasitol 2009. [in press].
54. Chen AC, He H, Temeyer KB, Jones S, Green P, Barker SC. A survey of *Rhipicephalus microplus* populations for mutations associated with pyrethroid resistance. J Econ Entomol 2009;102:373-380.
55. Li AY, Davey RB, Miller RJ, George JE. Detection and characterization of amitraz resistance in the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). J Med Entomol 2004;41:193-200.
56. Barre N, Li AY, Miller RJ, Gaia H, Delathiere J-M, Davey RB, George JE. *In vitro* and *in vivo* evaluation of deltamethrin and amitraz mixtures for the control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in New Caledonia. Vet Parasitol 2008;155:110-119.
57. Davey, RB, Miller RJ, George JE, Klavons JA. Efficacy of a single doramectin injection against adult female *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in the final stages of engorgement before detachment. J Med Entomol 2007;44:277-282.
58. Lohmeyer KH, Miller JA, Pound JM, Klavons JA. A sustained release gel formulation of doramectin for control of lone star ticks (Acari: Ixodidae) and horn flies (Diptera: Muscidae) on cattle. J Econ Entomol 2009;102:804-808.
59. Lohmeyer KH, Miller JA, Pound JM, Oehler DD. Efficacy of eprinomectin and doramectin against *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidae) on cattle. J Econ Entomol 2009;102:809-814.
60. Miller JA, Oehler DD, Pound JM. Delivery of ivermectin by injectable microspheres. J Econ Entomol 1998;91:655-659.