

COMPARACION DE CUATRO TECNICAS DE COLECTA DE LARVAS DE *Boophilus microplus* BAJO CONDICIONES DE CAMPO EN INFESTACION CONTROLADA ^a

Manuel Fernández Ruvalcaba ^b

RESUMEN

Se compararon cuatro técnicas para la recolección de larvas de *Boophilus microplus* en parcelas infestadas artificialmente: dos técnicas de arrastre (B, bandera y D, bandera con doble recorrido) y dos técnicas con CO₂ (C, plato con hielo seco y A, barril con hielo seco). Los muestreos se efectuaron semanalmente durante dos meses en época de secas, a partir de una contaminación de 10,000 larvas activas por transecto. Hubo variabilidad en la recolección en los cuatro dispositivos, tanto en los de arrastre como los de CO₂. Las medias de las larvas recolectadas por tratamiento fueron: barril con CO₂ (A) 41.2; bandera (B) 1400.2; plato con CO₂ (C) 77.5; y bandera doble recorrido (D) 2,946. Los valores de coeficiente de variación fueron: (A) 153.51 (intervalo de 0-29), (B) 156.119 (intervalo 0-798), (C) 180.903 (intervalo 0-65), y (D) 169.36 (intervalo 4-2026). La recolección por medio de la técnica de bandera de doble recorrido resultó ser la mejor de las cuatro ensayadas, ya que recolectó mayor cantidad de larvas y por más tiempo hasta al final del estudio. La comparación entre las técnicas de arrastre y las de CO₂, mostraron diferencias significativas entre los dispositivos ($p < 0.05$).

PALABRAS CLAVE: *Boophilus microplus*, Vida libre, Muestreo.

Tec. Pecu. Mex. Vol. 34 No. 3 (1996).

Para poder establecer algún método de control de la garrapata *Boophilus microplus*, es esencial contar con un programa que determine la presencia de las fases, tanto parásitas en el hospedero como no parásitas en los pastos (1,2,3,4); para ello, se requiere de métodos de muestreo poblacional seguros y consistentes (5,6,7). El procedimiento inicial en este programa, sería el determinar la curva de población parcial de la fase larvaria de *B. microplus* en los pastos (8,9,10).

Tres sistemas básicos han sido empleados para muestreos de poblaciones larvales de garrapatas: recolección manual directa de la vegetación, consistente en el muestreo directo a las plantas de forma manual, localizando larvas con una lupa; arrastre de dispositivos con superficies de algodón sobre la vegetación, consistente en deslizar superficies de algodón al nivel de los pastos, quedando las larvas adheridas a tal superficie; y trampas con atrayentes, tales

como dióxido de carbono ó animales vivos, mediante la colocación de dispositivos que contengan CO₂; así, las larvas son atraídas de manera semejante como sucede con los animales (5,11). El método más frecuentemente usado ha sido el de arrastre (12); sin embargo, existe controversia acerca de cual sea el mejor. En estudios con *Dermacentor andersoni*, se ha podido establecer que la población larval en las pasturas, estimadas por técnicas de arrastre, puede ser correlacionada con la población parasitaria sobre el hospedero (13).

En Puerto Rico (5), comparando la eficiencia en la colecta de tres técnicas de arrastre para la fase larval de *B. microplus*, se determinó que existe gran variabilidad con las tres técnicas estudiadas y se sugiere examinar otros diseños experimentales, dirigidos a disminuir esta variabilidad. En el mismo estudio (5), se menciona que las técnicas de arrastre pueden no ser lo más eficientes, puesto que, una cantidad de larvas recolectadas son derribadas de la vegetación cuando se hace el arrastre del dispositivo.

^a Recibido para su publicación el 8 de agosto de 1995.

^b Proyecto Garrapatas, CENID-Parasitología /INIFAP/ SAGAR, Km 11.5 Carretera Federal Cuernavaca Cuautla, edo. de Morelos. CP 62500, México.

Otros autores (14), señalan que no ha sido diseñado un dispositivo que proporcione un método estandarizado de muestreo para la fase larval de *B. microplus*. En cuanto a las técnicas de atracción que involucran animales, elevan el costo considerablemente por concepto de mantenimiento y diseño del dispositivo trampa (16,17).

Las trampas de CO₂ proveen un sistema de atracción sin animales; sin embargo, algunos autores (16), apuntan que habría que considerar su uso, dado el pequeño tamaño de las larvas y su relativa corta distancia de migración horizontal. Estos mismos autores (18), determinan las cantidades de CO₂ requeridas para estimular tanto a ninfas como adultos de la garrapata *Amblyomma americanum*.

Con la garrapata *Amblyomma triguttatum*, se ha determinado que la técnica de atracción con CO₂ es mejor que la de rastreo con bandera (18), pero resultó sólo ser un método seguro para ninfas y adultos. En otro experimento se encontró que el uso de CO₂ como atrayente, es más eficiente que las técnicas de arrastre para la recuperación solamente de estadios buscadores de hospederio (13). Sin embargo, usando trampas de CO₂ para *Ixodes dammini* se indicó que estas fueron efectivas en el muestreo de esta especie (20).

En México, se ha usado la técnica de arrastre con bandera desde su aplicación por la Campaña Nacional contra la Garrapata (21,22); sin embargo, no existen estudios comparativos que involucren diferentes técnicas para el muestreo de pastizales infestados con la fase larval de vida libre de *B. microplus* (12,19,20). Es importante señalar que los ganaderos deben contar con una metodología segura, práctica, de poca variabilidad, para determinar el grado de infestación de los potreros, antes de introducir ganado. Es recomendable hacer estudios comparativos entre diferentes métodos de muestreo larval, para poder seleccionar el más confiable, y poder hacer

el seguimiento de la dinámica poblacional de la fase larval en los pastizales.

El objetivo del presente trabajo fue comparar cuatro métodos para la colecta de la fase larval de *Boophilus microplus*, bajo condiciones naturales e infestación controlada de las parcelas.

El estudio se llevó a cabo en el rancho ganadero «Zacatecontitla», el cual cuenta con pastizales establecidos de zacate Estrella de Africa (*Cynodon plectostachyus*) y zacate Jaragua (*Hyparrhenia rufa*), ubicado en el Km 6 de la carretera Federal Tepoztlán-Yautepec, municipio de Tepoztlán, Morelos, a 180° 53' latitud norte y 99° 14' longitud oeste; y con una superficie de 40 hectáreas, divididas en 18 potreros, donde se explota ganado Cebú Gyr rojo. El clima se clasifica como subtrópico subhúmedo A (c) wl (w) ig, (23), con una temperatura media anual de 25 C, mínima de 15 C, máxima de 34 C, y altitud de 1500 msnm, con periodos de lluvias de junio a septiembre, y precipitación media anual de 900 a 1 100 mm.

Se utilizó un potrero de aproximadamente 900 m², cercado con alambre de púas, donde se realizó un muestreo preliminar con bandera, para determinar la presencia o ausencia de larvas de *B. microplus*. El terreno se subdividió en cuatro subparcelas de 196 m² cada una, con el fin de obtener muestras cuádruples (Cuadro 1).

En las cuatro subparcelas se trazaron transectos de 35 m de largo por 90 cm de ancho, dejando entre cada transecto un pasillo de 50 cm, delimitados con hilo de nylon, de tal modo que, cada subparcela tuvo 4 transectos.

El material vegetativo en el área de estudio estuvo representado por zacate Estrella de Africa, zacate Jaragua y una variedad de *Paspalum*, distribuidos en toda el área de estudio; la altura del pasto se uniformó por medio de un chapeo, a una altura de 20 cm, al inicio del experimento. Alrededor de todo el terreno se dejó una zona amortiguadora. Los muestreos se realizaron durante la época

CUADRO 1. RESULTADOS Y PROMEDIOS FINALES DE 8 MUESTREOS DE LARVAS DE *B. microplus* CON A-BARRIL, B-BANDERA, C-PLATO Y D-BANDERA DOBLE RECORRIDO, EN TRANSECTOS CON 4 REPETICIONES DE 35m DE LARGO Y 90 cm DE ANCHO C/U

Muestreo	1	2	3	4	5	6	7	8	TOTAL
A	17	15	6	0	0	0	0	0	38
B	625	463	225	10	14	7	5	0	1349
C	33	18	7	0	0	0	0	0	58
D	2030	1031	266	46	24	12	9	5	3423
B	671	660	111	3	16	5	3	0	1469
C	35	31	4	0	0	0	0	0	70
D	1780	939	217	20	3	14	11	7	3019
A	14	11	9	0	0	0	0	0	34
C	65	45	5	0	0	0	0	0	115
D	1920	895	228	40	23	10	7	8	3131
A	19	20	5	0	0	0	0	0	44
B	740	798	122	12	10	7	4	1	1694
D	1513	425	175	56	19	15	6	4	2213
A	29	13	7	0	0	0	0	0	49
B	662	312	68	25	12	8	2	0	1089
C	49	16	3	0	0	0	0	0	66

Con una sola contaminación de 10,000 larvas de *B. microplus* de 4 semanas de edad por transecto.

Promedios finales : A;41.2a

B;1400.2b

C;77.5a

D;2946c

Valores con la misma literal son iguales entre sí ($p < 0.05$)

de sequía de abril y mayo .

La colonia de garrapatas *B. microplus* empleada durante el experimento, fue una cepa sensible a los organofosforados . Para su reproducción se empleó inicialmente un bovino susceptible raza Holstein, macho de 2 1/2 años de edad, libre de garrapatas, mantenido en condiciones de aislamiento . El bovino fue infestado con 3,500 larvas de *B. microplus* , de cuatro semanas de edad, por medio de la técnica de manga de infestación focal (25); 21 días posteriores a la infestación se inicio la caída de las hembras adultas ingurgitadas, recolectándolas en cajas de Petri que se incubaron a 25 C, con humedad relativa de 90 % , hasta lograr la oviposición total. Las masas ovígeras recuperadas fueron pesadas

e incubadas en viales de vidrio, con tapón de tela de tul, en las mismas condiciones de temperatura y humedad de la oviposición, hasta lograr la eclosión (10).

La diseminación de larvas de cuatro semanas de edad se realizó mediante el ensayo de una serie de contaminaciones crecientes, para determinar el numero de larvas necesarias para asegurar la contaminación del terreno. Este ensayo comenzó con 100, 200 y 1250 larvas de *B. microplus* por transecto, con intervalos de un mes entre cada contaminación . Una cuarta contaminación con 10, 000 larvas se efectuó 5 meses después. Para la determinación exacta del numero de larvas, se procedió por conteo directo en 100 y 200, larvas y por peso con 1,250 y 10,000 larvas

de *B. microplus*. Las contaminaciones fueron realizadas al atardecer cuando las condiciones de temperatura no fueron drásticas. Las larvas de *B. microplus* contenidas en viales, se depositaron en el punto central del transecto, a partir del cual, se movían constantemente hacia los extremos, con la finalidad de distribuir las homogéneamente a través de todo el transecto. Las técnicas de colecta que se evaluaron fueron: (A) Barril conteniendo CO₂, que consistió en el uso de un dispositivo formado por un barril metálico (15), de 90 cm de alto y de 45 cm de diámetro, que contenía 1/2 kg de hielo seco; el barril fue fijado a un mango en forma de pinza que lo sujetaba y le permitía rodar, y que contenía orificios de 1.0 cm de diámetro distribuidos en toda la superficie rodante, y cubierta por una franela blanca. (B) Técnica de bandera; consistente en el uso de una franela blanca de 1.0 m x 90 cm, fijada al extremo transversal de un dispositivo de madera en forma de "T". (C) Plato conteniendo CO₂; consistente en el uso de cajas de Petri de 8 cm de diámetro, con 150 gramos de CO₂ en forma de hielo seco (18), y depositada sobre una franela blanca de 50x50 cm, fijada en cada extremo por medio de clavos de 2 1/2 pulgadas de largo. (D) Técnica de doble bandera; consistente en el mismo dispositivo empleado en la bandera pero con doble recorrido y tiempo de colecta. Para los muestreos se emplearon cuatro repeticiones por dispositivo, en donde estuvieron marcados los transectos en forma combinada, distribuidos en cuadro latino (26,27). Una vez contaminados los transectos, se esperó tres días antes de proceder a la toma de muestra, realizada cada ocho días. Con la bandera se procedió a realizar un recorrido de una vuelta (ida y regreso) del transecto B, de manera rasante, cubriendo el ancho del transecto, con una duración de cuatro minutos. Con doble bandera el recorrido fue de dos vueltas y duración total de ocho minutos en el

transecto D. Con el plato conteniendo CO₂ (19), se emplearon 16 cajas de Petri distribuidas a lo largo del transecto C con una distancia de dos metros entre cada plato y tiempo de 60 minutos para proceder a la colecta de larvas recuperadas. Con el barril conteniendo CO₂, el recorrido fue de dos vueltas en el transecto A, para un total de cuatro minutos.

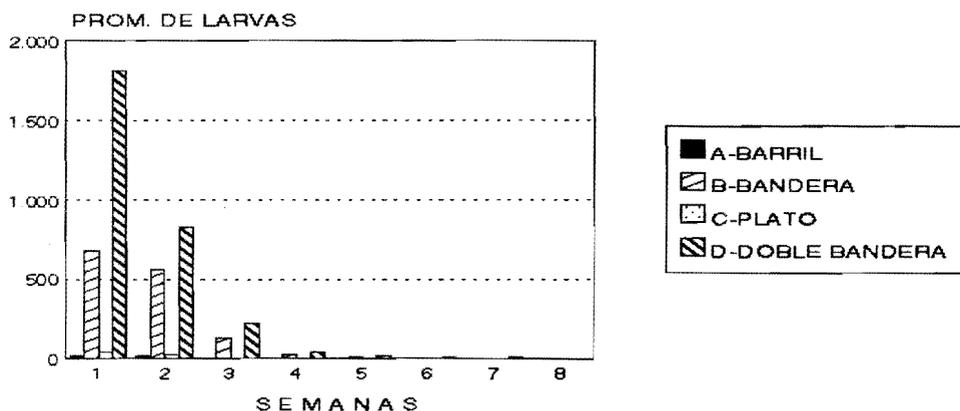
La recuperación de larvas se hizo por medio de cinta adhesiva en donde se pegaban (22), identificándose la tira adhesiva con el número de transecto, fecha y dispositivo de colecta empleado. Posteriormente, el conteo e identificación de larvas se realizó en el laboratorio.

Una vez obtenidos todos los datos del programa de muestreo, se analizaron estadísticamente mediante el método de ANDEVA, con cuatro repeticiones, Tuckey para comparación de medias, y se determinó el coeficiente de variación de cada técnica (3,27).

Los resultados de la contaminación con 10,000 larvas de *B. microplus* (por transecto), obtenidos por medio de los cuatro dispositivos de colecta de larvas con cuatro repeticiones, permitió apreciar el comportamiento de cada técnica. Se observó que el tratamiento D (bandera de doble recorrido), recolectó la mayor cantidad de larvas totales al final del experimento, con un promedio de 2 946; siguiéndole el tratamiento B (bandera) con 1,400.2; en tercer lugar el tratamiento C (plato con CO₂) con 77.5; y por último el tratamiento A (barril con CO₂) con 41.2 (Cuadro 1).

En la Figura 1 están representados los promedios del número de larvas colectadas por tratamiento de cada muestreo, durante los ocho muestreos del experimento; se observa que el tratamiento D continúa recuperando larvas de *B. microplus* hasta el final del estudio; el tratamiento B (bandera) logra recuperar larvas hasta la semana siete del muestreo; el tratamiento C (plato con CO₂) recuperó larvas únicamente hasta la

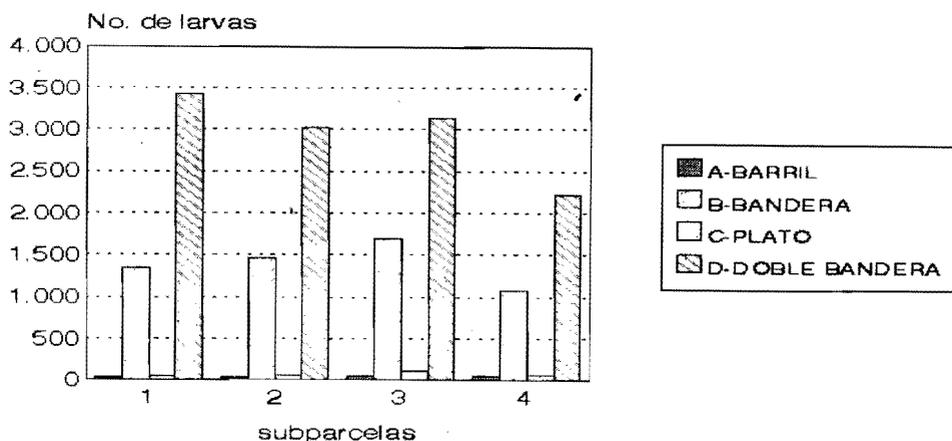
FIGURA 1. PROMEDIO DE LARVAS DE *B. microplus* RECUPERADAS POR CUATRO TÉCNICAS DE COLECTA DURANTE OCHO SEMANAS.



semana tres al igual que el tratamiento A (barril con CO₂). En la Figura 2 se representa el numero total de larvas de *B. microplus*, recuperadas al final del experimento, por cada método de muestreo. Los datos correspondientes al ANDEVA, y la prueba de Tuckey demostraron que existieron diferencias estadísticamente significativas entre las técnicas de arrastre y CO₂ ($p < 0.05$).

Inicialmente, el experimento fue pensado para ser realizado bajo condiciones completamente naturales, en un potrero infestado con garrapatas *B. microplus*; sin embargo, no fueron encontradas larvas de esta especie en los muestreos efectuados previamente con la técnica de bandera; por esta razón, se procedió a hacer un estudio de simulación, bajo condiciones controladas de contaminación del terreno con larvas de

FIGURA 2. COMPARACION DE CUATRO TÉCNICAS DE COLECTA DE *B. microplus*.



B. microplus, apreciando que, la contaminación con 100 larvas mostró no ser suficiente para asegurar la contaminación del terreno, puesto que, ninguna larva fue recuperada tres días después de ser liberadas estas en el terreno, durante cuatro muestreos, uno semanalmente; de igual manera sucedió con la contaminación con 200 larvas. Cuando se contaminó con 1,250 larvas, se empezaron a recuperar estas, pero, en cantidades insignificantes. Por tal motivo, se procedió a efectuar la contaminación con 10,000 larvas de *B. microplus* de cuatro semanas de edad, por transecto, para asegurar la contaminación del terreno. De esta manera, los dispositivos para cada tratamiento de colecta pudieron mostrar su eficacia, lo que se confirmó por los resultados encontrados (Figura 1,2).

El hecho mismo de haber modificado el plan de trabajo, de uno en condiciones completamente naturales, a otro en condiciones naturales pero con infestación artificial de las parcelas, permitió conocer la cantidad mínima requerida para asegurar la contaminación de los pastos, lo cual podría ser de utilidad para posteriores estudios de simulación del desarrollo de *B. microplus* en su fase libre.

En México, desde tiempos de la Campaña Nacional contra la garrapata, el muestreo en los pastos con la técnica de arrastre con bandera fue puesta en práctica (20, 25), a pesar de no haberse realizado estudios comparativos entre diversas técnicas de arrastre y las de CO₂. Los resultados del presente estudio permiten apreciar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre las técnicas ensayadas. Lo más relevante de esta comparación, es el hecho de que la prueba de bandera con doble recorrido en tiempo y distancia, demostró ser la más consistente hasta la finalización de los muestreos en las cuatro subparcelas (Figura 1. 2).

Llama la atención la gran variabilidad de resultados dentro de un mismo tratamiento:

sin embargo, esto ha sido largamente discutido en la literatura científica (29,28), razón por la cual se recomienda el ensayo de diversas técnicas de muestreo larval, antes de adoptar una para su uso en los potreros infestados por *B. microplus* (14,15). En cuanto a los tratamientos A y C (con CO₂), desde el cuarto muestreo dejaron de recolectar larvas, indicando con esto su poca eficacia cuando son comparados con los de arrastre. Sumado a esto, la poca adaptabilidad práctica, dada la dificultad para conseguir el CO₂ en forma de hielo seco y el incremento en el costo para estas pruebas; además, desde el inicio de los muestreos, el tratamiento del barril rodante con CO₂ mostró gran dificultad en el manejo por su diseño, que sin embargo, podría ser mejorado si en su construcción se emplearan materiales más ligeros y se perfeccionara su sistema de rodamiento .

Respecto al coeficiente de variación, los valores encontrados son normales, en virtud de que se colectan muchas larvas al inicio del estudio, decreciendo al final del mismo. Esto puede deberse a la mortalidad natural de las larvas, incrementada por las condiciones ambientales desfavorables imperantes durante el periodo de estudio (época de seca), con los tratamientos que correspondieron a la contaminación con 10, 000 larvas por transecto .

El tratamiento D fue el más efectivo de los cuatro en virtud de que en la última colecta, solo en este grupo se colectaron larvas, y a pesar de que este tratamiento no tiene el menor valor del coeficiente de variación (169.3), esto se debe a que los que tienen menor valor de este coeficiente, uno de ellos, el A (barril) (153.5) es el que recupero menor cantidad de larvas y por lo tanto, con cifras tan pequeñas, la variación con respecto a la media es menor y el B (bandera) (156.1) a pesar de tener un coeficiente de variación menor con respecto a C y D, recupero menor cantidad de larvas que la técnica de doble bandera (D), lo cual demuestra la eficacia

de D. Respecto a la comparación de los promedios de los muestreos se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el tratamiento D respecto a los otros tres. Bajo las condiciones del presente estudio el tratamiento de bandera con doble recorrido (D) para muestreo larval de *B. microplus*, fue el más eficaz colectando larvas, en mayores cantidades y por más tiempo que los otros ensayados. El número mínimo requerido para asegurar la contaminación de los transectos fue de 1,250 larvas.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa su agradecimiento al MVZ Ricardo Guerrero Ríos por el apoyo brindado al proporcionar el área de estudio y material necesario para el cultivo, en el rancho ganadero "Zacatecontitla". Al Ingeniero Agrónomo Ignacio Delgado Escobar, de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por su asistencia estadística. Al MVZ Víctor Vázquez Prats por asistencia técnica.

COMPARISON OF FOUR SAMPLING TECHNIQUES FOR *Boophilus microplus* LARVAE UNDER FIELD CONDITIONS IN A CONTROLLED INFESTATION .

SUMMARY

Four techniques were compared for the recovery of *Boophilus microplus* larvae in artificially infested plots: 2 dragging techniques (B single flag passage and D double flag passage) and 2 dry ice attraction techniques (C, plate and A, barrel). Tick sampling was carried out weekly during 2 months, during the dry season after a 10,000 active larvae per transect contamination. There was variability on the recovery capability of the 4 devices. The mean numbers of recovered larvae were: (A) 41.2 barrel with CO₂; (B) 1,400.2 flag; (C) 77.5 plate with dry ice and (D) 2,946 flag with double passage. The coefficient variation values were: (A) 153.51 (range 0-29), (B) 156.1 (range 0-798), (C) 180.90 (range 0-65) and (D) 169.36 (range 4-2026) respectively. The double flag passage (D) was the best collection technique. In fact it recovered more larvae and during more time, until the end of the experiment. There were significant differences between devices used ($p < 0.05$)

KEY WORDS: *Boophilus microplus*, Free life stage, Sampling.

REFERENCIAS

1. Soulsby E J L. Parasitología y enfermedades parasitarias en los animales domésticos. 7a. Ed. México: Interamericana 1987; 464.
2. Schmidtman T E. Ecologically based strategies for controlling ticks. 1st. Ed. London. Oxford University Press 1993: 7-38.
3. Davey B R, Garza J, Thompson D G. Seasonal observations on the development and ovipositional capability of *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus* reared on bovines. J. Med. Entomol. 1982:1:19 .
4. Camino L M. The development of an integrated pest management system of tick free living on pastures and parasitic on cattle. Ann. Entomol. Soc. 1981;74:507 .
5. Zimmerman H R, Garris I G. Sampling efficiency of three dragging techniques for the collection of non parasitic *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) Larvae in Puerto Rico. J. Econom. Entomol. 1985: 78 : 627 .
6. Sutherst W R, Morehouse E D. The seasonal incidence of Ixodid ticks on cattle in an elevated area of South Eastern Queensland Austr. J.Agric.Res. 1972 :23 : 195 .
7. Barnard D R. *Amblyomma americanum*: Comparison of populations of ticks free living on pastures and parasitic on cattle . Ann Entomol. Soc. 1981: 74 : 507 .
8. Sutherst W R, Floyd R B. Modeling tick populations. Australian Centre for International Agricultural Research, Proceedings No, 17, 1987;62-64.
9. Ravinovich I. Ecología de Poblaciones Animales. 2a Ed. C.E.C.S.A. 1985 : 28-35 .
10. Sutherst W R, Wharton H R, Utech W P K. Guide to studies on tick ecology. Division of Entomology. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization, Australia. Technical Paper. 1978:14:35-49.
11. Gladney W J. Ticks (Acarina: Argasidae and Ixodidae) Handbook. Agr. Res. Serv. U.S. Dept. Agr. Washington, D.C. 1978; 518: 102-113.
12. Spickett A M, Horak I G, Braack L E O, Van Hark H. Drag-sampling of free-living Ixodid tick in the Kruger National Park . Onderstepoort J. Vet. Res. 1991:58:27 .
13. Wilkinson R P, Gregson D J. Comparison of sampling methods for recording the numbers of Rocky Mountain wood ticks (*Dermacentor andersoni*) on cattle and range vegetation during control experiments. Acarologia. 1985: 26:2: 131 .
14. Cornet P J, Degallier N, Herve P J. Description of a sledge for tick sampling (ACARIDA : IXODIDA). Acarologia. 1984: 25:1:1 .
15. Koch H G, McNew W R. Comparative catches of field populations of Lone Star Tick *Ixodes ricinus* and its use in a red water fever area . Ann. Entomol. Soc. Am. 1981. 74: 498.
16. Aycardi E, Benavides E O, Garcia G, Mateos G, Zuluaga F N. *Boophilus microplus* tick burdens on grazing cattle in Colombia . Trop. Anim. Hlth. Prod. 1984:16 :78 .
17. Koch H G, MaCnew W R. Sampling of Lone Star ticks (Acari: Ixodidae): Dry ice quantity and capture success. Ann. Entomol. Soc. Am. 1982: 75:5 ;579
18. Gugliemone A A, Morehouse E D , Wolf G. Attraction to carbon dioxide of unfed stages of *Amblyomma triguttatum* under field conditions. Acarolog_a . 1985: 26 : 2 :123-129 .
19. Falco C R, Durland F. The Use of carbon-dioxide baited tick traps for sampling *Ixodes dammini* (ACARI: IXODIDAE). Acarologia 1989: 25:1 : 29 .
20. Solis S S. Estudio de *Amblyoma cajenense* en una zona de aridez transicional con un índice de 39 Atasta en Campeche. Tesis Licenciatura. Universidad Nacional Autonoma de México. México. D. F. 1976: 47.

21. Solis S S. Ecología de Garrapatas en México. Memorias Seminario Internacional de Parasitología Animal. Asociación Mexicana de Parasitología Veterinaria-SARH. Cuernavaca, Morelos. México, 1986 :256
22. Fideicomiso Campaña Nacional Contra la Garrapata., S.A.R.H., B.N.C.R. Manual para el Inspector. México, D.F. 1980:36.
23. García E. Modificaciones al Sistema de Clasificación Climática de Köppen. 2a ed. Instituto de Geografía, Universidad Nacional Autónoma de México México D.F. 1973:173.
24. FAO. El Control de las Garrapatas y de las Enfermedades que Transmiten. Roma, 1987: 1:40 .
25. Programa de Acreditación de Médicos Veterinarios B) Técnicas de campo. Manual técnico. SARH-Colegio Nacional de Médicos Veterinarios Zootecnistas de Morelos. México 1991:149.
26. Snedecor G W, Cochran W G . Métodos Estadísticos. 1a Ed. México. C.E.C.S.A. 1980:386.
27. Infante G S. Métodos estadísticos un enfoque interdisciplinario. 1a Ed. México. Trillas 1986: 413.