

Eficacia *in vitro* del amitraz sobre poblaciones de *Boophilus microplus* provenientes de explotaciones lecheras del estado Lara, Venezuela

Maribel J. Bravo*, Alfredo Coronado y Humberto Henríquez

Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado" Decanato de Ciencias Veterinarias. Unidad de Investigación en Parasitología Veterinaria. Barquisimeto, Lara, Venezuela. *Correo-E: mbravo@ucla.edu.ve

RESUMEN

El amitraz es un principio activo ampliamente utilizado en Venezuela para el control de garrapatas en bovinos, habiéndose detectado fallas en el control de la especie *Boophilus microplus*. El objetivo de este trabajo fue determinar la eficacia *in vitro* del amitraz en *B. microplus* utilizando cinco concentraciones distintas, incluyendo la terapéutica (208 ppm). Se utilizaron 240 teleoginas colectadas de cuatro explotaciones lecheras del estado Lara, en número de 60 por finca y divididas en grupos de 10 cada uno, con un peso promedio de 220 mg/garrapata. Se realizó el test de inmersión de adultos a cinco grupos con una preparación comercial de amitraz (12,5%) a las concentraciones de 52, 104, 208, 416 y 832 ppm, sumergiéndolas por tres minutos en cada preparación. El grupo control fue sumergido en agua. Durante 18 días se incubaron a una temperatura promedio de 27°C y humedad relativa de 85%. Posteriormente se pesó la masa total de huevos producidos por cada grupo y se incubaron por 21 días. Se realizó el conteo de larvas emergidas y huevos que no eclosionaron en cada tubo y se estimó el porcentaje de eclosión para luego calcular la eficiencia reproductiva, eficacia y factor de resistencia. Las cuatro poblaciones de *B. microplus* estudiadas resultaron resistentes a amitraz, no encontrándose diferencias significativas entre la eficacia de la concentración recomendada por los fabricantes y la de concentraciones superiores de amitraz.

Palabras clave: *Boophilus microplus*, Venezuela, amitraz, resistencia, eficacia.

***In vitro* efficacy of amitraz on *Boophilus microplus* from dairy farms in Lara state, Venezuela**

ABSTRACT

In Venezuela, the acaricide amitraz is widely used to control tick infestations in cattle, and therapeutic failures in the control of the *Boophilus microplus* species have been detected. The aim of this work was to determine the *in vitro* efficacy of amitraz on *B. microplus* using five different concentrations, including the manufacturer's recommended dosage (208 ppm), through the adult immersion test (Drummond test). A sample of 240 engorged females was collected from dairy farms in Lara state, (60 ticks/farm), divided in groups of 10 ticks averaging 220 mg/tick. Commercial amitraz formulation (12.5%) was used to prepare the working concentrations of 52, 104, 208, 416 and 832 ppm. The control group was submerged in water. Ticks were placed in glass lamina and incubated at 27°C and 85% R.H for 18 days. The eggs masses were collected, weighted, separated in vials and allowed to hatch at 85% R.H. and 27° C for 21 days. Both the emerged larvae and eggs were quantified in each tube in order to determine the reproductive efficiency, efficacy percentage and the resistance factor. The four populations of *B. microplus* studied were resistant to amitraz. Statistical significant differences between the effectiveness of highest concentration of amitraz and that recommended by the manufacturer were not observed.

Keywords: *Boophilus microplus*, Venezuela, amitraz, resistance, efficacy.

INTRODUCCIÓN

En los sistemas de producción ganadera ubicados en regiones tropicales y subtropicales del mundo, las afecciones por ectoparásitos son consideradas como una causa importante de pérdidas en la producción debido a daños como morbilidad y mortalidad de los animales y altos costos de control (FAO, 2003). Los antiparasitarios externos se han usado por décadas para el control de garrapatas y en sus comienzos se destacaron por su alta efectividad, lo que postergó la adopción de otras alternativas (Errecalde *et al.*, 2003). El manejo inadecuado de estos productos resultó en el surgimiento de fallas terapéuticas en el control de *Boophilus microplus* y con ello el de cepas resistentes de estos ectoparásitos. La baja eficacia de los productos utilizados condujo al incremento en la concentración y la frecuencia de aplicación de acaricidas, dos estrategias que se traducen en una mayor presión de selección y en mayores niveles de resistencia.

El amitraz es un compuesto químico perteneciente a las formamidinas y ha sido usado desde 1960 por su habilidad de imitar la acción del neurotransmisor octopamina en los artrópodos, causando sobre estimulación sináptica (Goldman *et al.*, 1999). Su eficacia radica en la capacidad de inhibir la oviposición en las hembras ingurgitadas, interfiriendo en su ciclo evolutivo (Booth, 1989). Es uno de los principios activos más usado como acaricida en los últimos años, lo que ha ocasionado el surgimiento de poblaciones de *B. microplus* resistentes. Esta situación ha sido reportada por varios autores en diversas partes del mundo (Kunz y Kemp, 1994; Coronado y Mujica, 1997; Foil *et al.*, 2004; Campos y De Oliveira, 2005; Pereira, 2006).

Debido a los reportes de fallas terapéuticas de este principio en varias explotaciones lecheras del estado Lara, surgió la necesidad de estudiar la situación actual de resistencia y cómo el diagnóstico de la misma podría contribuir al establecimiento de mejores estrategias que reduzcan los costos de control de ectoparásitos en el ganado y por ende los costos de producción. Como parte de este estudio, el siguiente trabajo tuvo como objetivo determinar la eficacia *in vitro* de diferentes concentraciones de amitraz sobre adultos de *B. microplus* provenientes de cuatro fincas lecheras del estado Lara, Venezuela, y con

ello determinar si existe resistencia a este principio activo.

MATERIALES Y MÉTODOS

Población y muestra

El experimento fue realizado en garrapatas, *B. microplus*, colectadas en cuatro fincas lecheras: las fincas 1 y 2 están ubicadas en Duaca, Municipio Crespo, Sector los Chispes (10° 15' 13,48" N y 69° 06' 37,63" O), a 935 msnm, con vegetación de Matorral y clima continental estacional. La finca 3 se ubica en Sarare, Municipio Simón Planas (9° 47' 28,13" N y 69° 09' 57,71" O), a 297 msnm y la finca 4 esta ubicada en Manzanita, Municipio Simón Planas, Parroquia Buría (9° 57' 48,65" N y 68° 58' 32,91" O), a 331 msnm. Las dos últimas fincas poseen vegetación intervenida, áreas de bosque y con clima continental estacional; todas en el estado Lara (Fudeco, 1986). Las muestras fueron colectadas entre los meses de Octubre a Mayo cuando existe una mayor incidencia de garrapatas (Gallardo y Morales, 1999). Se seleccionaron al azar teleoginas (hembras adultas ingurgitadas) de *B. microplus* tomadas directamente de la piel de los bovinos de las fincas en estudio. Se colocaron en envases identificados y se llevaron al Laboratorio de Parasitología Veterinaria del Decanato de Ciencias Veterinarias para su procesamiento en las siguientes 24 horas.

Determinación del peso de la masa total de huevos (PMTH) y porcentaje de eclosión

Se seleccionaron 60 garrapatas por finca, las cuales fueron colocadas por separado en un colador de acero inoxidable y se lavaron con agua, luego fueron secadas con papel absorbente y se pesaron individualmente en una balanza analítica (peso promedio de 220 mg/garrapata). Se dividieron en grupos de 10 garrapatas (Drummond *et al.*, 1973) conformando 6 grupos, con pesos homogéneos por finca. Se prepararon 30 mL de cada solución del amitraz, utilizando la dosis recomendada internacionalmente de 208 ppm y las concentraciones de 52, 104, 416 y 832 ppm. Cada grupo de teleoginas se trató individualmente, por una sola vez, utilizando la técnica de inmersión de adultos descrita por Drummond *et al.* (1973), donde se sumergen las garrapatas por 3 minutos en la solución del acaricida; el grupo control fue tratado

con agua. Inmediatamente fueron secadas con papel absorbente, pesadas individualmente y pegadas por su parte dorsal sobre cintas de papel adhesivo en placas de vidrio identificadas con los datos de grupo, producto utilizado, concentración, fecha de tratamiento y procedencia. Se colocaron en una cabina de incubación a una temperatura de 27°C y humedad relativa de 85% por 18 días. Luego, la masa total de huevos producidos por cada garrapata se pesó en balanza electrónica y se colectó en tubos de ensayo, al final del período de oviposición (ootoquia). Los tubos fueron identificados, tapados con algodón y mantenidos bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura señaladas anteriormente durante 21 días. Se estimó el porcentaje de eclosión cuantificando los huevos y larvas contenidas en cada tubo con la ayuda de la lupa estereoscópica, una cápsula de Petri cuadrada y un contador manual.

Determinación de la eficiencia reproductiva (ER), eficacia y factor de resistencia

Con los datos del peso de cada garrapata, el peso de la masa de huevos producidos y el porcentaje de eclosión, se calculó la eficiencia reproductiva (ER), valor que expresa la capacidad de una teleogina para transformar su peso corporal en larvas viables. La ER es un valor necesario para calcular la eficacia del acaricida. Se utilizó la fórmula siguiente (Drummond *et al.*, 1973):

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

La eficacia o porcentaje de control se calculó según la fórmula de Abbot (1925):

$$\text{Eficacia} = \frac{ER \text{ control} - ER \text{ tratado}}{ER \text{ control}} \times 100$$

El factor de resistencia se calculó dividiendo la eficacia esperada (100) entre la eficacia obtenida con la dosis terapéutica (208 ppm).

Análisis estadístico

Los datos fueron procesados en el paquete estadístico SPSS para Windows (SPSS, 2002) a los cuales se aplicó un análisis descriptivo y Prueba C de Dunnett para varianzas distintas. Las medias fueron consideradas estadísticamente significativas con $P \leq 0,01$ (Pardo y Ruiz, 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la población de garrapatas de la finca 1 el PMTH en los grupos tratados con dosis de 416 y 832 ppm fue significativamente menor que en el grupo control y el grupo tratado con la dosis de 52 ppm ($P \leq 0,01$). No se observaron diferencias significativas entre los grupos tratados a las dosis de 104, 208, 416 y 832 ppm. En la finca 2, el PMTH fue menor en forma significativa en el grupo tratado con dosis 832 ppm con respecto al grupo control ($P \leq 0,01$); mientras que en la finca 3 los valores fueron significativamente menores en todos los grupos tratados con respecto al grupo control ($P \leq 0,01$). En las fincas 2, 3 y 4 no se observaron diferencias en el PMTH entre los grupos tratados con las concentraciones de 52, 104, 208, 416 y 832 ppm (Cuadro 1).

La eficiencia reproductiva fue significativamente menor en los grupos tratados con dosis de 416 y 832 ppm con respecto al control y al grupo tratado con 52 ppm en la finca 1. En las fincas 2 y 3 se encontraron diferencias significativas entre todos los grupos tratados con respecto al grupo control. En la finca 4 no se observaron diferencias significativas en los grupos (Cuadro 1).

En la finca 1 la media del porcentaje de eficacia fue significativamente menor en el grupo tratado con 52 ppm con respecto al resto de los grupos tratados con amitraz ($P \leq 0,01$), no se observaron diferencias significativas entre las dosis de 104, 208, 416 y 832 ppm. En la finca 4 se observaron diferencias significativas entre el grupo tratado con 52 ppm con respecto a los tratados con 208 y 416 ppm (Cuadro 2).

Las cuatro fincas presentaron factores de resistencia mayores a 1,1, lo cual es indicativo de resistencia al acaricida (FAO, 2004). La finca 4 mostró un factor de resistencia alto, en comparación con las otras fincas estudiadas (Cuadro 2).

El uso continuo de acaricidas, así como el incremento en las dosis recomendadas por los fabricantes son dos de las principales causas de selección de resistencia (Mekonnen *et al.*, 2002). En la evaluación *in vitro* realizada, el aumento de la concentración del amitraz no se tradujo en variaciones importantes en los parámetros evaluados. El amitraz redujo la ER en los grupos tratados con respecto al control en tres de las fincas evaluadas; sin

Cuadro 1. Media del peso de la masa total de huevos (PMTH) y eficiencia reproductiva en *B. microplus* tratadas con amitraz.

Tratamiento	PMTH Finca				Eficiencia Reproductiva Finca			
	1	2	3	4	1	2	3	4
	----- mg -----				----- % -----			
52	114,07ac†	72,04b	85,29a	93,21a	44,96ac	36,49a	20,35a	47,52a
104	101,04abc	48,83b	83,76a	77,13a	26,96a	25,45a	11,11a	40,40a
208	80,34abc	42,34b	57,12a	87,64a	24,26a	26,58a	8,39a	48,16a
416	56,98b	54,93b	47,22a	72,35a	14,94b	31,47a	8,03a	32,51a
832	59,40b	34,84a	67,37a	70,07a	17,85b	16,53a	15,72a	35,80a
Control	124,07c	80,13b	144,75b	94,43a	51,86c	56,43b	52,05b	52,35a

† Medias con letras distintas en la columna son diferentes ($P \leq 0,01$).

Cuadro 2. Eeficacia y factor de resistencia en *B. microplus* tratadas con amitraz.

Tratamiento	Eficacia Finca				Factor de resistencia Finca			
	1	2	3	4	1	2	3	4
	----- % -----							
52	14,64a†	35,32a	60,10a	13,50a				
104	47,29b	52,35a	79,31a	24,08ab				
208	53,48b	55,00a	83,75a	10,25a	1,86	1,81	1,19	9,75
416	71,76b	45,72a	83,43a	38,00b				
832	66,82b	73,10a	70,55a	31,67b				
Control	N/A	N/A	N/A	N/A				

N/A: no aplica

† Medias con letras distintas en la misma columna son diferentes ($P \leq 0,01$).

embargo, no se observaron variaciones significativas de la ER entre grupos tratados con dosis superiores e inferiores a la terapéutica en ningún caso, lo que puede indicar que en poblaciones resistentes de *B. microplus* la ER no es afectada de la misma forma que en poblaciones susceptibles a este principio activo en las cuales hay una marcada reducción de la oviposición (Booth, 1989). La eficacia del amitraz no aumentó al incrementar la concentración, práctica esta muy común a nivel de campo cuando se comienzan a detectar fallas con el uso de los productos empleados en el control de ectoparásitos. Los grupos tratados con las concentraciones más altas (416 y 832 ppm) mostraron valores inferiores a la eficacia mínima aceptada internacionalmente, la cual debe ser igual o mayor de 90% (FAO, 2004).

La resistencia a acaricidas tiene un impacto importante sobre la incidencia de enfermedades

causadas por hemoparásitos como *Babesia bovis* y *B. bigemina* transmitidos por garrapatas (Foil *et al.*, 2004) ya que se ha demostrado que existe una alta correlación entre la carga parasitaria de *B. microplus* y la tasa de inoculación de estos hemoparásitos (Ribera-Cuellar *et al.*, 2000). Por otra parte, las garrapatas de un hospedador, como es el caso de *B. microplus*, desarrollan resistencia más rápidamente que las de múltiples hospedadores debido a que tienen más contacto con el acaricida (Mekonnen *et al.*, 2002). La reducción del número de garrapatas disminuye las enfermedades en el ganado lechero y reduce los costos de control (Foil *et al.*, 2004). Los resultados de este estudio revelan el creciente problema de resistencia que se está generando en fincas del estado Lara y coincide con los datos reportados por otros autores en países de América (Santamaría *et al.*, 2003; Foil *et al.*, 2004; Campos y De Oliveira, 2005; Rodríguez *et*

al., 2006). Por otra parte, se observa que el grado de resistencia es variable entre fincas y probablemente está relacionado con los antecedentes de control en cuanto a frecuencia y grupos de acaricidas usados previamente en cada explotación. Esto evidencia la importancia de realizar el diagnóstico individual de resistencia a acaricidas para poder tomar decisiones más acertadas en cuanto a la estrategia a seguir para lograr el control de estos ectoparásitos.

Es necesario dar a conocer la importancia del diagnóstico de resistencia o de susceptibilidad a acaricidas para tomar las medidas oportunas y reducir las consecuencias de este fenómeno. Una de las medidas podría ser la implementación del control integrado empleando varias alternativas para disminuir el número de garrapatas por animal, como por ejemplo, el uso conjunto de acaricidas y de vacunas contra *B. microplus* que inducen una buena respuesta protectora, tal como se demostró en un estudio donde se logró una reducción en la frecuencia de baños de cada 14 días a 64 días en animales tratados con la vacuna recombinante contra la garrapata *B. microplus* (Redondo *et al.*, 1999). Se han identificado nuevos antígenos protectores contra la garrapata *B. microplus* con el fin de elaborar nuevas vacunas (De la Fuente *et al.*, 2007a).

El desarrollo de mejores vacunas en el futuro se verá muy fortalecido por las nuevas y eficientes tecnologías moleculares para el descubrimiento de antígenos y de la urgente necesidad de un método de control de garrapatas para reducir o sustituir el uso de acaricidas, especialmente en las regiones donde se ha producido la resistencia de garrapatas (De la Fuente *et al.*, 2007b). El uso de vacunas no se ha generalizado debido a que no reduce drásticamente el número de garrapatas por animal. Sin embargo, a mediano plazo podría disminuir el tamaño de las poblaciones a nivel de campo, y consecuentemente en los animales. Si adicionalmente se combina su uso con otras estrategias como descanso y rotación de potreros, su efecto podría verse multiplicado.

CONCLUSIONES

El amitraz redujo la eficiencia reproductiva en las poblaciones de *Boophilus microplus* estudiadas. El incremento de la concentración del amitraz

por encima de la dosis terapéutica, no produjo un aumento significativo de la eficacia. Las poblaciones examinadas presentaron diferentes grados de resistencia al amitraz.

AGRADECIMIENTOS

Los autores desean expresar su agradecimiento al CDCHT – UCLA por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto (014-VE-2005) y al Profesor Ortelio Mosquera por sus sugerencias en el análisis estadístico.

LITERATURA CITADA

- Abbott W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18: 256-257.
- Booth T. 1989. Effects of biogenic amines and adrenergic drugs on oviposition in the cattle tick *Boophilus*: Evidence for optopaminergic innervation of the oviduct. *Exp. Applied Acarology*, 7: 259-266.
- Campos D. y P. De Oliveira. 2005. Avaliação in vitro da eficácia de acaricidas sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. *Ciência Rural*, 6(35): 1386-1392.
- Coronado A. y F. Mujica. 1997. Resistencia a acaricidas en *Boophilus microplus* en Venezuela. *Gaceta Cien. Vet.*, 3(1): 5-14.
- De la Fuente J., C. Almazan, M. Canales, J. Pérez, K. Tocan y P. Willadsen. 2007a. A ten-year review of commercial vaccine performance for control of tick infestations on cattle. *Anim. Health Res. Rev.*, 8(1): 23- 28.
- De la Fuente J., K. Tocan y E. Blouin. 2007b. Tick vaccines and the transmission of tick-borne pathogens. *Vet. Res, Commun.*, 31(1): 85-90.
- Drummond R., S. Ernst, J. Trevino, W. Gladney y O. Graham. 1973. *Boophilus annulatus* and *Boophilus microplus*: Laboratory test of insecticides. *J. Econ. Entomol.*, 66:130-133.
- Errecalde C., G. Prieto, C. Lüders y H. García. 2003. Naturaleza y control de la quicio resistencia en ectoparásitos. *Rev. Col. Cienc. Pec.*, 16: 257-267.

- FAO. 2003. Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Producción y sanidad animal. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la alimentación. Estudio FAO 157. Roma.
- FAO. 2004. Guideline resistance management and integrated parasite control in ruminants. Agriculture Department. Module 1. Ticks: Acaricide resistance, diagnosis, management and prevention. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Animal Production and Health Division, Roma. pp. 40-45.
- Foil L.D., P. Coleman, M. Eisler, H. Fragoso, Z. García-Vazquez y F. Guerrero. 2004. Factor that influence the prevalence of acaricide resistance and tick-borne diseases. *Vet. Parasitol.*, 125(1-2): 163 -181.
- Fudeco. 1986. Mapa de vegetación, clima y suelos del estado Lara. Análisis ambiental de la Región Centroccidental. Fudeco. Barquisimeto.
- Gallardo J. y J. Morales. 1999. Incidencia de *Boophilus microplus* y *Amblyomma cajennense* y dinámica poblacional de *B. microplus* (Acari: Ixodidae) en el Municipio Morán, estado Lara. *Bioagro*, 11(2): 51-60.
- Goldman J., T. Stoker y R. Cooper. 1999. Neuroendocrine and reproductive effects of Contemporary – use pesticide. *Tox. Indus. Health*, 15: 26-36.
- Kunz S.E. y D.H. Kemp. 1994. Insecticides and acaricides: resistance and environmental. *Rev. Sci. Tech.*, 13(4): 1249-1286.
- Mekonnen S., N. Bryson, L. Fourie, R. Peter, A. Spickett, R. Taylor. T. Strydom y I. Horak. 2002. Acaricide resistance profiles of single and multi-host ticks from communal and commercial farming areas in the Eastern Cape and North-West Provinces of South Africa. *Onder. J. Vet. Res.*, 69: 99-105.
- Pardo A. y M. Ruiz. 2002. Comparaciones múltiples post hoc. SPSS 11 Guía para el análisis de datos. Mc Graw Hill. Madrid, España.
- Pereira J.R. 2006. *In vitro* efficacy of comercial formulations of ixodicides in engorged female of *Boophilus microplus* collected of dairy cattle at Paraiba valley in the state of Sao Paulo. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, 15: 45-48.
- Redondo M., H. Fragoso, M. Ortiz, C. Montero, J. Lona y J. Medellín. 1999. Integrated control of acaricide-resistant *Boophilus microplus* populations on grazing cattle in Mexico using vaccination with Gavac™ and amidine treatments. *Exp. Appl. Acarol.*, 23: 841- 849.
- Ribera-Cuellar H., A. Cuellar, G. Barba, J. Carrique-Mas y A. Walker. 2000. Estudio sobre babesiosis y anaplasmosis en relación con la carga de garrapatas en terneros lecheros del oriente boliviano. *Vet. Mex.*, 31(1): 39-46.
- Rodriguez - Vivas R., F. Rodriguez - Arevalo, M. Alonso-Diaz, H. Fragoso-Sanchez, V. Santamaría y M. Rosario-Cruz. 2006. Prevalence and potential risk factors for amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms in the State of Yucatan, Mexico. *Prev. Vet. Med.*, 75: 280-286.
- Santamaría M., N. Soberanes, H. Fragoso, J. Martins y C. Cordovés. 2003. Avaliação *in vitro* de uma cepa de campo de *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) resistente à amitraz. *Ciencia Rural*, 33: 737-74.
- SPSS. 2002. SPSS para Windows. Ver. 11.5.1. Chicago, USA.