

## Susceptibilidad de larvas y adultos de *Boophilus microplus* al ixodicida coumafos en 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 electrónico: mbravo@ucla.edu.ve

### RESUMEN

La garrapata *Boophilus microplus* está distribuida por todo el mundo y es de gran importancia económica por las pérdidas que ocasiona en rebaños bovinos. El objetivo de este trabajo fue determinar la susceptibilidad *in vitro* al coumafos en cuatro poblaciones de garrapatas adultas, utilizando cinco concentraciones distintas de este principio activo, incluyendo la recomendada por el fabricante (terapéutica), y el porcentaje de mortalidad en larvas utilizando dosis terapéutica. Se utilizaron 240 teleoginas (garrapatas hembras adultas ingurgitadas) de cuatro fincas lecheras del estado Lara, un total de 60 garrapatas/finca divididas en grupos de 10 c/u, conformando 6 grupos/finca; fueron tratados individualmente cinco grupos con coumafos a las concentraciones de 125, 250, 500, 1.000 y 2.000 ppm y un grupo control con agua solamente, utilizando la técnica de inmersión de adultos. Larvas obtenidas de esta misma población fueron sometidas a la técnica de inmersión de larvas de Shaw. La media del peso de la masa total de huevos fue menor en forma significativa en los grupos tratados con concentraciones de 1000 y 2000 ppm de coumafos con respecto al grupo control en la finca 1. No se observaron diferencias entre los grupos tratados a las concentraciones de 125, 250, 500, 1.000 y 2.000 ppm en las cuatro poblaciones de garrapatas estudiadas por separado. La eficacia no presentó diferencias significativas entre los grupos tratados con las cinco concentraciones evaluadas en cada finca; el incremento de la concentración de coumafos no fue directamente proporcional a la eficacia. Los adultos de *B. microplus* resultaron resistentes al coumafos; sin embargo, se observó un 100% de mortalidad en larvas, lo que indica alta susceptibilidad de las larvas a este organofosforado.

*Palabras clave:* *Boophilus microplus*, coumafos, eficacia, larvas, teleoginas.

### Susceptibility to coumaphos on larvae and adult ticks *Boophilus microplus* in dairy farms from Lara state, Venezuela

#### ABSTRACT

The cattle tick *Boophilus microplus* is widely distributed in the world and causes significant economic losses. The aim of this work was to determine *in vitro* susceptibility of coumaphos ixodicide in adult ticks using five different concentrations including the manufacturer's recommended dosage, and the larvae mortality using therapeutic dose. A sample of 240 engorged females was collected from four dairy farms in Lara state, (60 ticks/farm), divided in groups of 10 ticks averaging 220 mg/tick. Commercial coumaphos formulation (20%) was used to prepare the working concentrations of 125, 250, 500, 1000 and 2000 ppm for the adults immersion test (AIT), and the control group was submerged in water. The Shaw larvae immersion test was applied in larvae obtained of this ticks population. In farm 1, weight average of the total egg masses was significantly smaller in the groups treated with coumaphos at concentrations of 1000 and 2000 ppm with respect to control group. Differences were not observed between the groups treated at the concentrations of 125, 250, 500, 1000 and 2000 ppm in each of the four farms. Statistical differences not were observed in the efficacy among groups. Higher concentrations of coumaphos did not increase the efficacy of the product. The adult ticks of *B. microplus* were resistant to coumaphos. Mortality in larvae reached 100%.

*Keywords:* *Boophilus microplus*, coumaphos, efficacy, larvae, adult ticks.

## INTRODUCCIÓN

La garrapata *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) es un ectoparásito que posee una alta distribución por todo el mundo y es de gran importancia económica, por las pérdidas que ocasiona en la producción de rebaños bovinos. Este parásito se originó en Asia, lugar donde se desarrolló por miles de años en estrecho contacto con el ganado cebuino (*Bos indicus*). Debido a su coevolución, esta especie bovina desarrolló y ha mantenido cierto grado de resistencia, mientras que las razas de ganado continental (*Bos taurus*) son susceptibles a este ectoparásito (Núñez *et al.*, 1987).

El control de garrapatas se ha basado principalmente en el uso de compuestos químicos (Sonenshine, 1993). El uso indiscriminado de estas sustancias ha causado el desarrollo de poblaciones de *B. microplus* resistentes a estos principios activos. La importancia de la detección de la resistencia a estos compuestos acaricidas comerciales reside principalmente en la posibilidad de escoger un producto de probada eficacia para su control (Campos y De Oliveira, 2005).

La pruebas para determinar susceptibilidad a un producto acaricida son variadas; sin embargo, la técnica de inmersión de adultos, descrita por Drummond *et al.* (1973) para teleoginas (garrapatas hembras ingurgitadas) es la referencia a nivel mundial aprobada por la FAO para la detección de resistencia (FAO, 2004). El criterio de esta técnica para diagnosticar susceptibilidad o resistencia a un acaricida es la producción de huevos después del tratamiento. Se basa en la inmersión de teleoginas en varias concentraciones del acaricida incluyendo la dosis terapéutica recomendada por los fabricantes, obteniendo el peso de la masa total de huevos, porcentaje de eclosión, eficacia y factor de resistencia al producto (Drummond *et al.*, 1973). Otra prueba utilizada es la técnica de inmersión de larvas de Shaw, la cual determina el porcentaje de mortalidad de larvas con concentraciones terapéuticas del acaricida (Shaw, 1965). Estas pruebas realizadas *in vitro* son una aproximación del comportamiento del principio activo *in vivo* y son útiles para detectar fallas en el manejo del compuesto acaricida durante la preparación y aplicación de los baños.

Los primeros reportes de resistencia a organofosforados (OPs) en garrapatas *Boophilus microplus* en Venezuela fueron publicados en 1970 (Núñez *et al.*, 1987). Luego, otras poblaciones

resistentes fueron aisladas en el occidente de Venezuela (Coronado y Sánchez, 1993).

El ixodicida coumafos, como muchos otros OPs, fue desarrollado originalmente como pesticida para el tratamiento de ectoparásitos de los animales domésticos y posteriormente comenzó a utilizarse como antihelmíntico resultando muy tóxico al ser agregado al alimento. Químicamente es el 0,0-dietil 0-(3-cloro-4-metil-7-coumarinil) fosforotioato. La principal acción de los OPs sobre estos parásitos es la inhibición de la acetilcolinesterasa (AChE), aumentando la concentración de acetilcolina, lo que produce una alteración de la transmisión neuromuscular y consecuente toxicidad (Booth y Mc. Donald, 1992).

Siendo la AChE su blanco de acción, el principal mecanismo de resistencia de *B. microplus* a OPs está asociado con la presencia de una AChE insensible a estos compuestos. Adicionalmente, existen diferencias en la tasa de hidrólisis metabólica entre cepas de garrapatas resistentes y susceptibles, lo cual sugiere la presencia incrementada de esterases y un aumento en la detoxificación de estos compuestos en las cepas resistentes (Wright y Ahrens, 1988).

Actualmente este compuesto químico no se está aplicando ampliamente porque presenta fallas al utilizar la dosis terapéutica recomendada por los fabricantes. Este trabajo tiene como objetivo determinar *in vitro* la susceptibilidad de *B. microplus* a varias concentraciones de coumafos mediante la determinación de la eficacia en adultos y porcentaje de mortalidad en larvas provenientes de cuatro fincas lecheras del estado Lara.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Población y muestra

El experimento fue realizado en garrapatas *B. microplus* colectadas en cuatro fincas lecheras: Fincas 1 y 2 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 ubicada en Sarare, Municipio Simón Planas (9° 47' 28.13" N y 69° 09' 57.71" O), a 297 msnm y la finca 4 en Manzanita, Municipio Simón Planas, Parroquia Buría (9° 57' 48.65" N y 68° 58' 32.91" O), a 331 msnm. Estas dos fincas poseen vegetación intervenida y áreas

de bosque con clima continental estacional todas en el estado Lara (Fudeco, 1986). Las fincas fueron seleccionadas por presentar altas infestaciones con garrapatas e historial de fallas terapéuticas a acaricidas. Las muestras fueron colectadas entre los meses de Octubre a Mayo donde hay mayor incidencia de garrapatas (Gallardo y Morales, 1999). Las garrapatas se colocaron en envases adecuados para el transporte y fueron llevadas al Laboratorio de Parasitología Veterinaria del Decanato de Ciencias Veterinarias para su procesamiento en las siguientes 24 horas.

### Determinación de la eficacia en adultos

Las teleoginas fueron colocadas en un colador de acero inoxidable, lavadas con agua, secadas con papel absorbente y pesadas individualmente en una balanza electrónica. Para la evaluación del acaricida se utilizó un número de 60 garrapatas por finca, dividiéndolas en grupos de 10 garrapatas cada uno con un peso homogéneo por grupo (180 a 240 mg/garrapata), conformando seis grupos por finca.

Se prepararon 30 mL de las cinco soluciones garrapaticidas a concentraciones de 125, 250, 500 (dosis terapéutica), 1.000 y 2.000 ppm, más un grupo control con 30 mL de agua solamente. Cada grupo experimental de teleoginas fue sometido a tratamientos individuales, por una sola vez, en las soluciones preparadas y el grupo control se sumergió en agua, utilizando la técnica de inmersión de adultos descrita por Drummond *et al.* (1973), en la que se sumergen las garrapatas en 30 mL de la solución correspondiente durante 3 minutos.

Las teleoginas tratadas y las del grupo control fueron pasadas por un colador, secadas con papel absorbente, pesadas nuevamente y pegadas por su parte dorsal sobre cintas de papel adhesivo en placas de vidrio y colocadas en una cabina de incubación a una temperatura promedio de 27°C y una humedad relativa de 85% por 18 días. La masa total de huevos (PMTH) producidos por cada garrapata se pesó en una balanza electrónica al final del periodo de oviposición (ootoquia) a los 18 días postratamiento y se colectó en tubos de ensayo, tapándolos con algodón e incubándolas durante 21 a 25 días bajo las mismas condiciones de humedad y temperatura señaladas anteriormente. Transcurrido este tiempo, se estimó el porcentaje de eclosión cuantificando los huevos que

no eclosionaron y las larvas emergidas contenidos en cada tubo con la ayuda de una lupa estereoscópica, un contador manual y cápsulas de Petri cuadradas.

Con los datos del peso de las garrapatas, el peso de los huevos producidos y el porcentaje de eclosión se calculó la eficiencia reproductiva (ER), un valor que expresa la capacidad de una teleogina para transformar su peso corporal en larvas viables, de acuerdo a la fórmula de Drummond *et al.* (1973). La eficacia o porcentaje de control del coumafós en los grupos sometidos a la técnica de inmersión con acaricidas, se calculó según la fórmula de Abbott (1925), la cual expresa el porcentaje de control parasitario.

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

### Determinación de mortalidad de larvas

Se realizó la técnica de inmersión de larvas descrita por Shaw (1965). De cada finca se reservó un tubo contenido de larvas que no fueron sometidas a tratamiento. Se prepararon 10 mL de la solución del acaricida a la dosis terapéutica de 500 ppm, se colocaron dos hojas de papel de filtro impregnadas de la solución dentro de cada cápsula de Petri y se colocaron 100 larvas aproximadamente entre las dos hojas de papel filtro. El grupo control se preparó con el mismo procedimiento pero impregnándolas con agua. Las cápsulas de Petri tapadas y selladas se incubaron por 24 horas a 27°C y 85% H.R. Transcurrido este tiempo se estimó el porcentaje de mortalidad de larvas cuantificándolas con la ayuda de una lupa estereoscópica, un contador de laboratorio y aguja entomológica. Se corrigió el porcentaje de mortalidad según la fórmula de Abbott (1925):

$$\text{Mortalidad} = \frac{\% \text{Mort. Tratadas} - \% \text{Mort. Control}}{100 - \% \text{Mort. Control}} \times 100$$

### Análisis estadístico

Se realizó el análisis de los datos obtenidos de cada finca por separado, sin comparar los resultados entre las fincas porque el historial de control con acaricidas es distinto en cada explotación. Los datos fueron procesados en el paquete estadístico SPSS 11 para Windows (SPSS, 2002), a los cuales se aplicó un análisis descriptivo y prueba C de Dunnett para

varianzas distintas. Las medias serán consideradas estadísticamente significativas con un  $P \leq 0,01$  (Pardo y Ruiz, 2002).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La media del peso de la masa total de huevos (PMTH) en las fincas 1, 2, 3 y 4 no tuvo diferencias significativas entre los grupos tratados a las concentraciones de 125, 250, 500, 1.000 y 2.000 ppm de coumafós, ni entre éstas con el grupo control, excepto en la finca 1, donde el PMTH fue menor en forma significativa en los grupos tratados a las concentraciones de 1.000 y 2.000 ppm de coumafós con respecto al grupo control ( $P \leq 0,01$ ). En la finca 3, la eficacia fue mayor en forma significativa en el grupo tratado con 2.000 ppm con respecto al grupo tratado con la dosis de 500 ppm. En el resto de los grupos tratados pertenecientes a las cuatro fincas no se encontraron diferencias significativas en la eficacia entre las distintas concentraciones usadas (Cuadro 1). En ningún caso la eficacia alcanzó niveles iguales o superiores al 90%, el cual es el nivel mínimo aceptado internacionalmente (FAO, 2004). El factor de resistencia a coumafós en las fincas 1, 2, 3 y 4 fue de 1,97 3,01 6,13 y 2,17, respectivamente. La mortalidad de larvas a dosis de 500 ppm de coumafós fue del 100% en todas las poblaciones estudiadas.

El fracaso del control químico contra la garrapata puede deberse al uso de procedimientos inadecuados, aplicación ineficaz, condiciones estacionales desfavorables o a la aparición de un mecanismo de resistencia. La decisión de desechar el producto

afectado y la elección de uno alternativo, sólo deberá adoptarse después de examinar con cuidado las características de la cepa resistente (Nolan, 1987).

Los adultos de *B. microplus* fueron resistentes al coumafós; sin embargo, el compuesto fue muy eficaz en larvas coincidiendo con lo reportado en un estudio realizado en Estados Unidos, en el cual el tratamiento con coumafós resultó más eficaz en larvas que en adultos de *B. microplus* con dosis de 566 ppm; el control de larvas fue del 98% a dosis de 165, 299 y 566 ppm (Davey *et al.*, 2003), similar a los datos obtenidos en este estudio donde se alcanzó un 100% de mortalidad en larvas a dosis de 500 ppm.

Estudios *in vivo* han determinado que la aplicación de dos a tres baños a intervalos de 7 a 10 días provee protección contra *B. microplus*, alcanzando una eficacia del 92,9 al 99,9% (Davey *et al.*, 2004), pero aumentaría la cantidad de este compuesto en el ambiente, además de incrementar los costos de producción. Tradicionalmente cuando falla un producto, se cambia a otro principio o se aumenta la concentración y la frecuencia de los baños, siendo esta es una de las principales causas de resistencia (Mekonnen *et al.*, 2002). En este experimento, dosis mayores que la terapéutica no incrementaron la eficacia del coumafós en garrapatas adultas, lo que indica que no sería una buena recomendación aumentar su concentración en los baños a bovinos. Adicionalmente, se pondría en riesgo de intoxicación al rebaño y al personal encargado de aplicar los baños.

Cuadro 1. Media del peso de la masa total de huevos y eficacia en *B. microplus* tratadas con distintas dosis de coumafós

Dosis	Peso masa huevos				Eficacia			
	Finca				Finca			
	1	2	3	4	1	2	3	4
	----- mg -----				----- % -----			
125	88,83	90,36	81,19	80,13	43,15	26,88	35,84	23,05
250	93,12	71,50	96,26	67,23	51,84	39,79	30,75	51,06
500	100,92	86,80	10,62	49,86	50,80	33,22	16,31b	46,02
1000	50,38b†	78,04	71,91	44,77	75,74	49,54	45,39	40,76
2000	62,28b	95,78	53,03	52,88	71,39	24,19	66,20a	49,76
Control	149,16a	124,07	94,43	50,22				

† Promedios con distintas letras en la misma columna indica diferencias significativas ( $P \leq 0,01$ ).

La garrapata *B. microplus* ha desarrollado en la mayoría de los países un grado importante de resistencia a OPs, la cual es causada por mecanismos de detoxificación y por alteraciones o insensibilidad de la acetilcolinesterasa, que es su sitio o blanco de acción en insectos y arácnidos (Andrew *et al.*, 2003). En las poblaciones estudiadas se evidenció una alta resistencia al coumafos y posiblemente estas poblaciones de garrapatas podrían ser resistentes a otros OPs y desarrollar resistencia cruzada contra piretroides sintéticos, ya que se ha demostrado que algunos mecanismos de resistencia a OPs son comunes con los de piretroides sintéticos como es el caso del incremento de la frecuencia del mecanismo de glutathione-S-transferasa (Rodríguez *et al.*, 2003).

La resistencia a acaricidas tiene un impacto importante sobre la incidencia de las enfermedades causadas por los hemoparásitos *Babesia bovis* y *B. bigemina* transmitidos por garrapatas, debido a que aumenta el número de éstas por animal y por ende las posibilidades de que se incremente la transmisión de estas enfermedades (Foil *et al.*, 2004). La presencia de una población de reserva de garrapatas que no hayan sido expuestas a acaricidas se recomienda para mantener la estabilidad enzoótica de los hemoparásitos, la cual es imprescindible para la disminución de animales adultos con sintomatología clínica de estas enfermedades.

Es necesario que el control de garrapatas esté acompañado del conocimiento de su ciclo biológico y otros factores ambientales importantes. El uso inadecuado de drogas, incluyendo los antiparasitarios, puede dejar residuos en los tejidos, lo cual ocasiona problemas de salud en animales y humanos (Yamada *et al.*, 2006). Muchos de estos productos pueden ser absorbidos por la piel del bovino y pasar a circulación sanguínea para ser biotransformados y luego excretados en la orina y heces, teniendo un impacto en la fauna no parasitaria u organismos del suelo, como coleópteros, dípteros, nemátodos del suelo y microorganismos que favorecen la degradación y reciclaje de los excrementos animales. El coumafos puede resultar tóxico para insectos coprófagos y perturbar el funcionamiento de pastizales por la disminución en la velocidad de desaparición del estiércol (Lumaret y Martínez, 2005). En el uso de acaricidas en general se debe considerar el impacto ambiental de estos principios activos.

## CONCLUSIONES

En las fincas estudiadas existió baja susceptibilidad a coumafos en hembras adultas de *B. microplus*. La eficacia no alcanzó valores aceptables para el control, aún usando concentraciones más altas del producto. El coumafos causó 100% de mortalidad en larvas de *B. microplus*.

## RECOMENDACIONES

La complejidad del problema de resistencia hace necesario realizar un control integrado, que no es más que la combinación de varios métodos incluyendo vacunas contra *B. microplus*, manejo de potreros, utilización de animales o razas bovinas resistentes a las garrapatas, aumento del intervalo entre baños contra ectoparásitos usando las dosis recomendadas, pruebas diagnósticas de resistencia a acaricidas y otros métodos que permitan reducir el número de garrapatas por animal a mediano y largo plazo.

## AGRADECIMIENTOS

Al CDCHT-UCLA por el financiamiento otorgado a través del Proyecto 014-VE-2005.

## LITERATURA CITADA

- Abbott W. 1925. A method of computing the effectiveness of an insecticide. *J. Econ. Entomol.*, 18: 256-257.
- Andrew L., R. Davey, R. Miller y J. George. 2003. Resistance to coumaphos and diazinon in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) and evidence for the involvement of an oxidative detoxification mechanism. *J. Entomol.*, 40: 482-490.
- Booth N. y L. McDonald. 1992. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. Editorial Acribia, Zaragoza, España.
- Campos D. y P. Oliveira. 2005. Avaliação *in vitro* da eficácia de acaricida sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) de bovinos no município de Ilhéus, Bahia, Brasil. *Ciencia Rural*, 35: 1386-1392.
- Coronado A. y J. Sánchez. 1993. Sensibilidad de dos cepas venezolanas de *Boophilus microplus* a tres acaricidas de origen comercial. Trabajo de Ascenso para Personal Docente, Decanato

- Ciencias Vet., Univ. Centroocc. Lisandro Alvarado. Barquisimeto, Lara. Venezuela.
- Davey R., J. George y R. Miller. 2003. Efficacy of various concentrations of coumafos to control adult, nymphal and larval stages of an organophosphate-resistance strain of *Boophilus microplus* on infested cattle. *Am. J. Vet. Res.*, 64(6): 684-689.
- Davey R., J. George y R. Miller. 2004. 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.*, 41(3): 524-528.
- 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.
- FAO. 2004. Guideline resistance management and integrated parasite control in ruminants. Agriculture Department. Animal Production and Health Division, FAO, Roma. Italia.
- Foil L., P. Coleman, M. Eisler, H. Fragoso, Z. García-Vazquez y F. Guerrero. 2004. Factors 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. Barquisimeto, Lara. Venezuela.
- Gallardo J. y J. Morales. 1999. *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae): Preoviposición, oviposición, incubación de los huevos y geotropismo. *Bioagro*, 11(3): 77-87.
- Lumaret J.P. e I. Martínez. 2005. El impacto de productos veterinarios sobre insectos coprófagos: consecuencias sobre la degradación del estiércol en pastizales. *Acta Zool. Mex.*, 21(3): 137-148.
- 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.
- Nolan J. 1987. New approaches in the development and management of drugs used in ectoparasites control. *Vet. Parasitol.*, 25: 135-145.
- Nuñez J., M. Muñoz y H. Moteldo. 1987. *Boophilus microplus*. La garrapata común del ganado vacuno. Editorial Hemisferio Sur. Buenos Aires, Argentina.
- Pardo, A. y M. Ruiz. 2002. Comparaciones múltiples post hot. SPSS 11 Guía para el análisis de datos. Editorial Mc Graw Hill, España.
- Rodríguez M., J. Bisset, C. Díaz y L. Soca. 2003. Resistencia cruzada a piretroides en *Aedes aegypti* de Cuba inducida por la selección con el insecticida organofosforado malation. *Rev. Cubana Med. Trop.*, 55(2): 105-111.
- SPSS. 2002. SPSS para Windows. Ver. 11.5.1. Chicago, USA.
- Shaw R. 1965. Culture of an organophosphorus resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. *Bull. Entomol. Res.*, 56: 389-405.
- Sonenshine D. 1993. *Biology of Ticks*. Oxford University Press. New York. NY.
- Wright F. y E. Ahrens. 1988. Cholinesterase insensitivity: a mechanism of resistance in Mexican strains of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) against coumaphos. *J. Med. Entomol.*, 25: 234-239.
- Yamada R., M. Kosono, T. Ohmori, F. Morimatsu y M. Kitayama. 2006. Simultaneous determination of residual veterinary drugs in bovine, porcine, and chicken muscle using liquid chromatography coupled with electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Bios. Biotechnol. Biochem.*, 70(1): 54-65.