

# Evaluación de la resistencia a la cipermetrina en cepas de campo de *Boophilus microplus* obtenidas de ranchos bovinos del estado de Yucatán, México

## Evaluation of cypermethrin resistance in *Boophilus microplus* strains from cattle farms in the State of Yucatán, Mexico

Darwin Cabrera-Jiménez<sup>a</sup>, Roger Iván Rodríguez-Vivas<sup>a</sup>, José Alberto Rosado-Aguilar<sup>a</sup>

### RESUMEN

El objetivo del presente estudio fue determinar el nivel de resistencia de cepas de campo de *Boophilus microplus* a la cipermetrina en ranchos bovinos del estado de Yucatán, México. Se estudiaron garrapatas *B. microplus* de 31 ranchos. La técnica de paquete de larvas fue usada y mediante el análisis Probit se obtuvieron las concentraciones letales al 50 y 99 % (CL<sub>50</sub>, CL<sub>99</sub>) y pendientes. Para evaluar el nivel de resistencia a la cipermetrina, de cada cepa se obtuvieron dos índices de resistencia (IR<sub>50</sub>, IR<sub>99</sub>). Se consideraron como cepas susceptible, tolerante y resistente a la cipermetrina, aquéllas que presentaron IR con valores de <3, 3-5 y >5 respectivamente. Se encontraron variaciones entre los IRs de las cepas estudiadas. Se identificó una cepa (FC32) altamente resistente a la cipermetrina con IR<sub>50</sub> de 2297.8. Cuando el nivel de resistencia fue determinado con IR<sub>50</sub> se encontró el 32.3 % resistentes y el 67.7 % susceptibles; sin embargo, con IR<sub>99</sub> se encontraron 74.2 % resistentes y 25.8 % susceptibles ( $P < 0.05$ ). Cuando se utilizaron ambos IRs para clasificar a las cepas, se encontró el 32.3 % resistentes y 25.8 % susceptibles, habiendo un 41.9 % de cepas resistentes o susceptibles. Todas las cepas susceptibles con ambos IRs presentaron pendientes >2.5. Se concluye que a nivel de campo en el estado de Yucatán, México, las cepas de *B. microplus* estudiadas presentan variaciones en los niveles de resistencia a la cipermetrina; y al clasificar una cepa como resistente o susceptible es necesario considerar el comportamiento de los IRs (50 y 99 %) y la pendiente.

**PALABRAS CLAVE:** *Boophilus microplus*, Cipermetrina, Resistencia, Índice de resistencia.

### ABSTRACT

The purpose of this study was to determine the level of resistance of *Boophilus microplus* field strains to cypermethrin in cattle farms in the state of Yucatán, Mexico. *B. microplus* ticks from 31 farms were studied. The larval package technique was used and the Probit analysis was applied in order to obtain both lethal concentrations 50 and 99 % (LC<sub>50</sub>, LC<sub>99</sub>), and the slopes. In order to evaluate the level of resistance to cypermethrin in each strain, resistance factors (RF<sub>50</sub> and RF<sub>99</sub>) were determined. Strains were considered as cypermethrin-susceptible, -tolerant or -resistant when RF values <3, 3-5, or >5 were obtained, respectively. RF differences were found in the strains analyzed. One strain (FC32) was identified as highly resistant to cypermethrin, with an RF<sub>50</sub> of 2297.8. When the RF<sub>50</sub> was used to determine resistance, 32.3 % of the strains were found to be resistant, while 67.7 % were susceptible. Nevertheless, when the RF<sub>99</sub> was used, 74.2 % of the strains were resistant and 25.8 % were susceptible ( $P < 0.05$ ). When both RFs were used, 32.3 % of the strains were categorized as resistant and 25.8 % were susceptible. Therefore, 41.9 % of the strains were considered as either resistant or susceptible. Using both RFs, all susceptible strains showed slopes >2.5. It was concluded that the field *B. microplus* strains from Yucatán used in this study show variable levels of resistance to cypermethrin. In order to classify a strain as resistant or susceptible, both RFs (RF<sub>50</sub> and RF<sub>99</sub>) and the slope need to be considered.

**KEY WORDS:** *Boophilus microplus*, Cypermethrin, Resistance, Resistance Factor.

Recibido el 29 de mayo de 2007. Aceptado para su publicación el 29 de febrero de 2008.

<sup>a</sup> Departamento de Parasitología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Universidad Autónoma de Yucatán. km 15.5 carretera Mérida-Xmatkuil. 97100. Mérida, Yucatán, México. Tel.: +52-999-9423200; Fax: +52-999-9423205. rvivas@tunku.uady.mx. Correspondencia al segundo autor.

En las regiones tropicales y subtropicales de centro y Sudamérica, África y Australia, el principal problema que afecta a la ganadería bovina son las garrapatas y las enfermedades que transmiten<sup>(1)</sup>, y continúan siendo los ectoparásitos que mayores pérdidas ocasionan a la ganadería bovina de México, por los graves daños que provoca, ya sea de manera directa o indirecta, las cuales se caracterizan por su gran diversidad y distribución. Asimismo, limitan la introducción de razas genéticamente especializadas en la producción de carne y leche<sup>(2)</sup>.

*Boophilus microplus* es la garrapata de mayor importancia en el trópico mexicano, y el uso de ixodicidas es la estrategia de control más importante. Entre los principales productos que se han empleado para su control se encuentran los organofosforados, piretroides, amidinas y endectocidas<sup>(2-5)</sup>. Estos productos químicos han sido empleados con éxito para controlar a las garrapatas; sin embargo, su uso intensivo ha propiciado la aparición de generaciones de garrapatas resistentes<sup>(6,7)</sup>.

El desarrollo de la resistencia depende de la frecuencia de individuos resistentes en una población de garrapatas y de la intensidad de la presión de selección que se realiza con el empleo de ixodicidas<sup>(2)</sup>. Cuando las poblaciones de garrapatas son presionadas con ixodicidas se seleccionan poblaciones resistentes<sup>(8-10)</sup>.

En ranchos bovinos del sureste de México, la resistencia de *B. microplus* a los piretroides es el problema más importante<sup>(4,11,12)</sup>. La prevalencia de ranchos con *B. microplus* resistente a los piretroides en los estados de Yucatán, Quintana Roo, Tabasco y Chiapas es de 66.3, 95.3, 94.1 y 90.8 % respectivamente. Estos resultados fueron obtenidos mediante pruebas de paquetes de larvas e inmersión de larvas, usando dosis discriminantes para diagnosticar cepas resistentes o susceptibles. Sin embargo, para conocer el nivel de susceptibilidad de *B. microplus* a los ixodicidas es necesario obtener los índices de resistencia (IRs)<sup>(13)</sup>. Por tal motivo, el presente estudio tuvo como objetivo determinar el nivel de resistencia de cepas de campo de *B. microplus* a la cipermetrina en ranchos bovinos del estado de Yucatán, México.

In the tropical and subtropical regions of Central America, South America, Africa, and Australia, ticks and tick-vectored diseases are the main problems affecting cattle production<sup>(1)</sup>. Ticks are the ectoparasites causing the largest losses among Mexican cattle farms due to direct and indirect damages, characterized by their great diversity and distribution. Likewise, ticks are responsible for preventing the introduction of cattle breeds genetically specializing the production of beef or milk<sup>(2)</sup>.

*Boophilus microplus* is the most important tick found in the Mexican tropics. Using ixodicides is the most popular tick control strategy, including organophosphates, pyrethroids, amidines, and endectocides<sup>(2-5)</sup>. These drugs have been successfully used in the control of ticks, but their intensive use has resulted in the emergence of resistant tick generations<sup>(6,7)</sup>.

Resistance development depends on the frequency of resistant individuals within a tick population and the intensity of selection pressure resulting from the use of ixodicides<sup>(2)</sup>. When tick populations are under ixodicide pressure, resistant populations are selected<sup>(8-10)</sup>.

The resistance of *B. microplus* to pyrethroids is the most important problem among cattle farms in southeast Mexico<sup>(4,11,12)</sup>. The prevalence of farms with pyrethroid resistant *B. microplus* in the Mexican states of Yucatán, Quintana Roo, Tabasco, and Chiapas is 66.3, 95.3, 94.1, and 90.8 %, respectively, as shown by the larval package and larval immersion techniques using discriminating doses for the diagnosis of resistant or susceptible strains. Nevertheless, resistance factors (RFs)<sup>13</sup> must be used in order to learn about the level of susceptibility of *B. microplus* to ixodicides. The purpose of this study was to determine the level of resistance to cypermethrin among *B. microplus* strains in cattle farms in Yucatán.

The study was performed in Yucatán, a Mexican state located at 19° 30' and 21° 35' N; and 87° 30' and 90° 24' O<sup>(14)</sup>. The climate is hot/sub-humid (Aw), and the yearly mean temperature is

El estudio se realizó en el estado de Yucatán, México localizado a 19° 30' y 21°35' N y 87° 30' y 90° 24' O<sup>(14)</sup>, con clima Aw (cálido-subhúmedo), temperatura media anual de 26 °C, con variaciones que van desde los 24.5 °C en la costa y sierrita de Ticul a los 27.8 °C en la porción centro occidental. Las temperaturas promedio máximas mensuales son 35.6 °C y las mínimas de 16.2 °C. La precipitación anual varía desde el extremo noroccidental con 500 mm hasta la porción suroriental con 900 a 1100 mm<sup>(14)</sup>.

Para el desarrollo del presente estudio se evaluaron 31 ranchos bovinos que fueron seleccionados al azar de un listado proporcionado por la Unión Ganadera Regional del Oriente de Yucatán (UGROY). Los ranchos se encuentran ubicados en el oriente del Estado, con sistema semi-intensivo de producción y población mínima de 50 bovinos. Los animales de los ranchos son cruces de *Bos indicus* x *Bos taurus*, donde la aplicación de piretroides es de 1 a 14 tratamientos por año.

En cada uno de los ranchos se muestrearon al azar 10 bovinos, a los cuales se les colectaron 3 a 5 garrapatas *B. microplus* adultas repletas<sup>(13)</sup>, y se depositaron en tubos de ensayo tapados con algodón. Las muestras se enviaron al Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (FMVZ-UADY) para su procesamiento.

Las garrapatas repletas fueron depositadas en cajas de Petri e incubadas en oscuridad a una temperatura de 27±2 °C y humedad relativa de 80 a 90 % para permitir la oviposición<sup>(15)</sup>. Los huevos obtenidos fueron depositados en viales de cristal tapados con algodón bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad al que estuvieron las garrapatas repletas para permitir la eclosión de las larvas.

El diagnóstico de la resistencia a la cipermetrina se realizó mediante la técnica de paquetes de larvas desarrollada por Stone y Haydock<sup>(16)</sup>, usando larvas de 7 a 14 días de edad<sup>(17)</sup>. Las larvas fueron expuestas a cipermetrina en seis concentraciones (0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025 y 0.0125 %) realizando

26 °C, with a range of 24.5 °C in the coast and the small Ticul sierra, and 27.8 °C in the central western region. Maximum/minimum average monthly temperatures are 35.6 °C and 16.2 °C, respectively. Yearly rainfall rates range from 500 mm in the northwest to 900-1100 mm in the southeast<sup>(14)</sup>.

For this study, 31 cattle farms were selected at random from a list provided by Yucatan's Orient Regional Livestock Union (*Unión Ganadera Regional del Oriente de Yucatán, UGROY*). Farms are located in Eastern Yucatán, with a semi-intensive production system and a minimum population of 50 cattle, *Bos indicus* x *Bos taurus* crosses. Pyrethroid treatments are applied 1 to 14 times per year.

In each farm, 10 cattle were sampled at random, collecting 3 to 5 engorged, adult *B. microplus* ticks on each animal<sup>(13)</sup>. Ticks were placed in test tubes then capped with cotton swabs. Samples were submitted to the Parasitology Laboratory, Faculty of Veterinary Medicine and Animal Husbandry, the Autonomous University of Yucatán (*Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán, FMVZ-UADY*) to be analyzed.

Engorged ticks were placed in Petri dishes and incubated in the darkness at 27±2 °C and a relative humidity of 80 to 90 % for oviposition<sup>(15)</sup>. Eggs were then transferred to glass vials, capped with cotton swabs, and incubated under the same temperature/humidity conditions for larval eclosion.

Cypermethrin resistance was diagnosed using the larval package technique developed by Stone y Haydock<sup>(16)</sup>, using 7-14-d-old larvae<sup>(17)</sup>. Larvae were exposed to six different cypermethrin concentrations (0.4, 0.2, 0.1, 0.05, 0.025, and 0.0125 %) with three repetitions per concentration, plus controls. Results were read 24 h after treatment<sup>(18)</sup>.

Larval package test mortality results were evaluated using the Probit (dose-response) analysis by the Polo-Plus software<sup>(18)</sup>. This allows for establishing both 50 and 99 % lethal concentrations (LC<sub>50</sub>,

tres repeticiones de cada concentración más los controles. La lectura de la prueba se efectuó a las 24 h postratamiento<sup>(18)</sup>.

Los resultados de las mortalidades obtenidas en la prueba de paquete de larvas se evaluaron mediante el análisis Probit (dosis-respuesta) usando el programa Polo-Plus<sup>(18)</sup>. Este análisis permite establecer la concentración letal al 50 y 99 % (CL<sub>50</sub>, CL<sub>99</sub>), sus respectivos límites de confianza al 95 % y la pendiente. El IR<sub>50</sub> se obtuvo tomando en consideración el valor de la CL<sub>50</sub> de la muestra a evaluar entre el valor de la CL<sub>50</sub> de la cepa de referencia<sup>(13)</sup>. Adicionalmente en el presente estudio se obtuvo el IR<sub>99</sub> mediante la división del valor de la muestra a evaluar entre el valor de la CL<sub>99</sub> de la cepa de referencia. Se tomó como referencia la cepa Media Joya (CENAPA) susceptible a la cipermetrina (CL<sub>50</sub> = 0.013 y CL<sub>99</sub> = 0.046) recomendada por la FAO como cepa de referencia en Latinoamérica.

Para conocer el nivel de susceptibilidad de *B. microplus* a la cipermetrina, se utilizó el siguiente criterio: IR <3 susceptible, IR 3-5 tolerante e IR >5 resistente<sup>(19)</sup>. Para evaluar la discriminación entre cepas susceptibles y resistentes considerando los IR<sub>50</sub> e IR<sub>99</sub>, se utilizó la prueba de Ji cuadrada.

Se encontró una gran variación en los IRs de las cepas estudiadas (IR<sub>50</sub>: 0.31 -2297.8; IR<sub>99</sub>: 0.59 ->2297.8), y se identificó una cepa (FC32) altamente resistente a la cipermetrina con un IR<sub>50</sub> de 2297.8 (Cuadro 1). Cuando el nivel de resistencia fue determinado con el IR<sub>50</sub> se encontraron 32.3 % resistentes y 67.7 % susceptibles; sin embargo, con el IR<sub>99</sub> se encontró el 74.2 % resistentes y el 25.8 % susceptibles, ( $P < 0.05$ ), y no se encontró ninguna cepa tolerante. Cuando se utilizaron ambos IRs para clasificar a las cepas, se encontró un 32.3 % resistentes y 25.8 % susceptibles, habiendo un 41.9 % de cepas clasificadas como resistentes o susceptibles. Todas las cepas susceptibles con ambos IRs (<3) presentaron pendientes con valores >2.5.

Los resultados cuando se consideró el IR<sub>50</sub> para clasificar el nivel de susceptibilidad son similares a otros estudios<sup>(19)</sup>, donde estudiando 12 cepas de

LC<sub>99</sub>), their respective 95 % confidence limits, and the slope. RF<sub>50</sub> was obtained taking into account the LC<sub>50</sub> value of the test sample divided by the LC<sub>50</sub> value of the reference strain<sup>(13)</sup>. In addition, the RF<sub>99</sub> was obtained. For this purpose, the value of the test sample was divided by the LC<sub>99</sub> of the reference strain. Media Joya (CENAPA) cypermethrin-susceptible strain (LC<sub>50</sub> = 0.013 and LC<sub>99</sub> = 0.046) was used as reference strain, as recommended by the FAO for Latin America.

In order to recognize the level of susceptibility of *B. microplus* to cypermethrin, the following criterion was used: RF <3: susceptible; RF=3-5: tolerant; and RF >5: resistant<sup>(19)</sup>. The Chi<sup>2</sup> test was used to discriminate susceptible strains from resistant strains, considering both RF<sub>50</sub> and RF<sub>99</sub>.

Large variations were found in the RFs of the strains studied (RF<sub>50</sub>: 0.31-2297.8; RF<sub>99</sub>: 0.59->2297.8). One strain (FC32) was identified as highly resistant to cypermethrin, with a RF<sub>50</sub> of 2297.8 (Table 1). When the level of resistance was determined using the RF<sub>50</sub>, 32.3 % resistant strains were found, while 67.7 % strains were susceptible. Nevertheless, using the RF<sub>99</sub>, 74.2 % of the strains were found to be resistant while 25.8 % of the strains were susceptible ( $P < 0.05$ ). No tolerant strains were found. When both RFs were used for strain categorization, 32.3 % of the strains were resistant and 25.8 % were susceptible. Therefore, 41.9 % of the strains were classified as either resistant or susceptible (T.N.: 74.2-32.3=41.9). All susceptible strains with both RFs <3 had slopes with values >2.5.

When the RF<sub>50</sub> was used to classify the level of susceptibility, results were consistent with those from another study<sup>(19)</sup>, where 25 % resistance, 8.3 % tolerance and 66.7 % susceptibility to deltamethrin were found among 12 *B. microplus* strains studied in New Caledonia. Nevertheless, in a different study carried out in New Caledonia by Bianchi et al<sup>(20)</sup>, 114 *B. microplus* strains were evaluated and a higher number (46 %) of resistant strains was found. The level of susceptibility of *B. microplus* to cypermethrin varied widely among the strains studied (range: 0.31-2297.8). This can

RESISTENCIA A LA CIPERMETINA DE *Boophilus microplus*

Cuadro 1. Índice de resistencia, pendiente y fenotipo de cepas de *Boophilus microplus* a la cipermetrina en ranchos bovinos del estado de Yucatán, México. Se consideró como cepa susceptible IR <3, tolerante IR 3-5 y resistente IR >5<sup>(19)</sup>.

Table 1. Cypermethrin Resistance Factor (RF), slope and phenotype of *Boophilus microplus* strains in Yucatán cattle farms (RF <3: susceptible; RF 3-5: tolerant; RF >5: resistant)<sup>(19)</sup>

Strains	50%			99%			Slope	Phenotype	Phenotype
	LC	CI95%	RF	LC	CI95%	RF		RF <sub>50</sub>	RF <sub>99</sub>
ER3	0.012	0.011-0.013	0.92	0.032	0.028-0.038	0.70	5.442	S	S
AC2	0.008	0.006-0.009	0.62	0.044	0.036-0.060	0.96	3.163	S	S
AG1	0.009	0.008-0.0010	0.69	0.027	0.023-0.035	0.59	5.175	S	S
G4	0.011	0.009-0.012	0.85	0.088	0.071-0.117	1.91	2.548	S	S
OR5	0.013	0.012-0.015	1.00	0.090	0.077-0.108	1.96	2.827	S	S
CCH6	0.016	0.013-0.019	1.23	0.125	0.092-0.198	2.72	2.635	S	S
P8	0.022	0.020-0.026	1.69	0.094	0.095-0.174	2.04	3.666	S	S
DFL7	0.017	0.009-0.024	1.31	0.108	0.058-0.721	2.35	2.866	S	S
AC10	0.029	0.024-0.033	2.23	0.300	0.215-0.470	6.52	2.280	S	R
SE11	0.026	0.014-0.039	2.00	8.866	2.505-104.171	192.74	0.920	S	R
VE12	0.018	0.011-0.024	1.38	0.601	0.329-1.675	13.07	1.518	S	R
SPT15	0.004	0.002-0.008	0.31	1.239	0.577-4.670	26.93	0.952	S	R
SE13	0.013	0.009-0.018	1.00	0.550	0.346-1.078	11.96	1.439	S	R
SA14	0.021	0.008-0.035	1.62	1.988	0.744-16.155	43.22	1.178	S	R
D216	0.013	0.008-0.018	1.00	3.556	1.776-9.914	77.30	0.952	S	R
TP17	0.006	0.003-0.010	0.46	0.449	0.256-1.139	9.76	1.259	S	R
SA20	0.015	0.008-0.022	1.15	0.812	0.397-2.929	17.65	1.331	S	R
LPS19	0.007	0.004-0.010	0.54	3.069	1.584-7.951	66.72	0.877	S	R
MO18	0.036	0.032-0.040	2.77	0.458	0.369-0.595	9.96	2.105	S	R
CCK22	0.032	0.023-0.039	2.46	0.235	0.162-0.460	5.10	2.07	S	R
EPL21	0.013	0.010-0.019	1.15	0.409	0.254-0.840	8.89	1.609	S	R
SVE23	0.067	0.051-0.084	5.15	1.735	0.982-4.223	37.71	1.645	R	R
ML24	0.073	0.056-0.100	5.62	2.906	1.297-10.454	63.17	1.454	R	R
LES25	0.087	0.066-0.110	6.69	1.316	0.779-3.045	28.61	1.970	R	R
SG26	0.155	0.107-0.253	11.92	124.83	20.496-4318.7	2713.7	0.800	R	R
SL29	0.150	0.121-0.192	11.54	7.253	3.511-20.825	157.67	1.380	R	R
SCZ27	0.159	0.114-0.240	12.23	9.910	3.318-73.794	215.43	1.296	R	R
ALM28	0.185	0.150-0.234	14.24	10.083	4.484-35.953	219.19	1.339	R	R
IXNA30	0.159	0.128-0.195	11.84	73.824	29.986-262.949	1604.8	0.872	R	R
SIL31	0.346	0.251-0.476	26.61	12.318	5.345-53.248	267.78	1.499	R	R
FC32	29.87	4.091-4737.8	2297.8	>29.87	ND	>2297	0.935	R	R

LC= Lethal concentration; CI95%= 95% confidence interval; RF= Resistance factor; S= susceptible, R= resistant; ND= Not determined due to the high concentration of cypermethrin required to kill 99% of the population. "Media Joya" strain (Cenapa) was used as the reference strain with LC<sub>50</sub> values of 0.013 and LC<sub>99</sub>: 0.046

*B. microplus* en Nueva Caledonia encontraron 25 % resistentes, 8.3 % tolerantes y 66.7 % susceptibles a la deltametrina. Sin embargo, en otro estudio realizado en Nueva Caledonia, Bianchi *et al*<sup>(20)</sup> evaluaron 114 cepas de *B. microplus* y diagnosticaron mayor número de cepas resistentes (46 %). El nivel de susceptibilidad de *B. microplus* a la cipermetrina varió marcadamente entre las cepas estudiadas (rango de 0.31 a 2297.8), esto pudo estar asociado a diferentes factores tales como la migración de larvas entre ranchos, razas de los animales, sobrevivencia larvaria, refugio y la intensidad en el uso de ixodicidas<sup>(6)</sup>. Kunz y Kemp<sup>(7)</sup> mencionan que el desarrollo y nivel de resistencia a los ixodicidas en poblaciones de garrapatas es dependiente de la frecuencia de individuos resistentes en la población y de la intensidad de la presión de selección ejercida por el ixodicida. Grupos de investigadores<sup>(4,21)</sup> encontraron que existe alta probabilidad de resistencia de *B. microplus* a la deltametrina, flumetrina y cipermetrina cuando los tratamientos son aplicados a nivel de campo con frecuencias >5-6 veces/año.

En las cepas ER3, AC2 y AG1 (cepas susceptibles) el uso de piretroides se ha aplicado en pocas ocasiones (1 a 2 veces al año) restringiéndose al control de moscas hematófagas (datos no mostrados). Esta baja frecuencia del uso de piretroides en estas cepas podría explicar la alta susceptibilidad de las garrapatas a la familia de los piretroides. Lo contrario ocurrió con las cepas FC32, SIL31 y ALM28 que han sido presionadas con deltametrina en los últimos tres años por más de 12 veces al año (datos no mostrados) lo que podría explicar los elevados IRs a la cipermetrina, ya que en la familia de los piretroides existe marcada resistencia cruzada entre sus compuestos<sup>(7)</sup>. Esto probablemente permitió la selección de individuos homocigóticamente resistentes. Este tipo de cepas altamente resistentes han sido aisladas en varios países y son usadas como cepas de referencia resistentes a piretroides<sup>(22,23)</sup>.

Para conocer el nivel de resistencia fenotípica de una cepa de *B. microplus* a los ixodicidas generalmente se obtiene e interpreta el IR<sub>50</sub><sup>(19,20)</sup>, valor que indica la respuesta fenotípica (mortalidad

be associated with different factors such as larval migration among farms, animal breeds, larval survivability, refuges, and ixodicide intensity use<sup>(6)</sup>. Kunz and Kemp<sup>(7)</sup> reported that the development and level of resistance to ixodicides among tick populations depend on the frequency of resistant individuals in the population and the ixodicide selection pressure intensity. Various research groups<sup>(4,21)</sup> found high probabilities of *B. microplus* resistance to deltamethrin, flumethrin and cypermethrin when treatments were applied in the field with a frequency >5-6 times per year.

For susceptible strains ER3, AC2, and AG1, pyrethroids had been used only 1-2 times per year aiming the control of hematophagous flies (data not showed). The low frequency of pyrethroid use on these tick strains could explain their high susceptibility to the pyrethroid class. Conversely, strains FC32, SIL31 and ALM28 had been subjected to high deltamethrin pressure in the last 3 years with more than 12 applications per year (data not showed) which could explain their high cypermethrin RFs, since remarkable cross resistance exists among drugs within the pyrethroid class<sup>(7)</sup>. This might have probably allowed for the selection of homocytously resistant strains. This type of highly resistant strains has been isolated in several countries, and they are used as pyrethroid-resistant reference strains<sup>(22,23)</sup>.

In order to know about the level of phenotypic resistance of *B. microplus* strains to ixodicides, the RF<sub>50</sub><sup>(19,20)</sup> is typically determined and interpreted. The RF<sub>50</sub> is an indicator of the phenotypic response (i.e.: larval mortality) in half of the population exposed to an ixodicide in comparison to the reference values. Nevertheless, the RF<sub>50</sub> does not explain population behaviors. In order to more objectively evaluate the behavior of the majority of an insect population in the face of a pesticide, the use other CLs (i.e. CL<sub>90</sub>, CL<sub>95</sub>, or CL<sub>99</sub>)<sup>(24,25)</sup> as well as the slope (i.e.: population response to increasing doses of the ixodicide)<sup>(26)</sup> is recommended. In this study, when only the RF<sub>50</sub> was considered, 32.3 % of the strains were found to be resistant, but when the RF<sub>99</sub> was used, the percentage of resistant strains raised to (74.2 %).

larval) que tiene la mitad de la población expuesta a un ixodicida comparada con los valores de referencia; sin embargo, no explica el comportamiento de la población. Para evaluar de manera más objetiva el comportamiento de la mayoría de una población de insectos a un pesticida, se recomienda utilizar otras CLs: CL<sub>90</sub>, CL<sub>95</sub> o CL<sub>99</sub><sup>(24,25)</sup>, así como la pendiente (respuesta que presenta la población al incrementar la dosis del ixodicida)<sup>(26)</sup>. En el presente estudio cuando se consideró el IR<sub>50</sub> se encontró el 32.3 % de cepas resistentes, sin embargo, cuando se consideró el IR<sub>99</sub> aumentó el porcentaje de resistentes (74.2 %). Esto indica que el 41.9 % de las cepas estudiadas podrían ser consideradas como susceptibles o resistentes dependiendo del IR que se considere. Posiblemente estas poblaciones no son completamente homogéneas, y con cierta presión de selección con cipermetrina a corto plazo se podrían convertir en cepas resistente. En estas cepas es recomendable utilizar otra familia de ixodicida y recurrir a métodos alternativos de control de garrapatas, tales como vacunas, quema de potreros, endectocidas y control biológico<sup>(2,6)</sup>.

El diagnóstico de rutina de resistencia de *B. microplus* a los piretroides se realiza usando dosis discriminantes en bioensayos, lo que permite diagnosticar una cepa como susceptible o resistente. Con esta metodología, Rodríguez-Vivas *et al*<sup>(4)</sup> encontraron que el 59.2 % de los ranchos en el estado de Yucatán, México presentaron cepas de *B. microplus* resistentes a la cipermetrina, sin determinar el nivel de resistencia como fue obtenido en las cepas del presente estudio.

La pendiente es otro valor de importancia en la identificación de cepas susceptibles o resistentes. En el presente estudio las cepas clasificadas como susceptibles por ambos IRs presentaron pendientes >2.5. Este hallazgo coincide con Finney<sup>(27)</sup> quien menciona que las poblaciones de insectos expuestos a pesticidas que presentan pendientes con valores altos son poblaciones más homogéneas, y por lo tanto responden a la acción del pesticida. Por la alta eficacia que presentó la cipermetrina en estas cepas, es recomendable que en estos ranchos se use de forma racional piretroides para el control de garrapatas.

This means that 41.9 % of the strains studied could be considered as either susceptible or resistant, depending on the RF used. Possibly these populations are not completely homogeneous, so that if exposed to certain short-term cypermethrin selection pressure, they could become resistant. Using a different class of ixodicides for these strains is recommended, together with alternative tick control methods such as vaccines, grassland fires, endectocides, and biological control<sup>(2,6)</sup>.

Routine *B. microplus* pyrethroid resistance diagnosis is performed using bioassays with discriminating dose rates which allows for identifying a strain as either susceptible or resistant. Using this methodology, Rodríguez-Vivas *et al*<sup>(4)</sup> found cypermethrin-resistant *B. microplus* strains in 59.2 % farms in Yucatán, but these authors did not determine the level of resistance as we did with our strains.

The slope is one additional important value for the identification of susceptible or resistant strains. In our study, all strains classified as susceptible by both RF values showed slopes >2.5. This finding is consistent with that published by Finney<sup>(27)</sup>, who reported that insect populations exposed to pesticides with high slope values are more homogeneous populations. Therefore, they respond to the action of the pesticide. With the high efficacy of cypermethrin against these strains, the rational use of pyrethroids for the control of ticks in these farms is recommended.

For a *B. microplus* strain to be considered as either resistant or susceptible to pyrethroids, the behavior of both RF<sub>50</sub> and RF<sub>99</sub> and the slope must be known, given that the margins of safety could assure a more rational use of pesticides when these predictors are considered.

The high RF variations among the strains studied means an evident response of ticks to cypermethrin. Robertson and Preisler<sup>(26)</sup> stated that from the biochemical stand point, the high resistance variation among strains might suggest the presence of several resistance mechanisms in the ticks. The resistance mechanisms of *B. microplus* to pyrethroids results mostly from the Phe→Ile substitution in

Para considerar una cepa de campo de *B. microplus* como resistente o susceptible a los piretroides es necesario conocer el comportamiento de los IRs (50 y 99 %) y la pendiente, debido a que los márgenes de seguridad al considerar ambas predicciones podrían asegurar un manejo más racional en el uso de pesticidas.

La alta variación de los IRs entre las cepas estudiadas indica que la respuesta de las garrapatas a la cipermetrina es evidente. Robertson y Preisler<sup>(26)</sup> mencionan que desde el punto de vista bioquímico, la gran variación en la resistencia entre cepas podría sugerir la existencia de varios mecanismos de resistencia en las garrapatas. El mecanismo de resistencia de *B. microplus* a los piretroides es producido principalmente por la sustitución de Phe→Ile en el fragmento transmembranal S6 del dominio III del canal de sodio<sup>(28)</sup>, produciendo una modificación de la estructura del canal con alteración en la proyección estereoquímica del sitio de unión del canal con las moléculas de los piretroides, lo cual le confiere a la garrapata la característica de resistencia. La amplificación de este fragmento permitió a Rosario-Cruz et al<sup>(29)</sup> demostrar que la mutación en el canal de sodio de *B. microplus* es el mecanismo más importante que confiere resistencia en cepas aisladas en el sureste de México. Sin embargo, la actividad de esterases ha sido identificada en la resistencia de *B. microplus* a los piretroides y organofosforados<sup>(30,31)</sup>. En estudios futuros se recomienda conocer los mecanismos de resistencia involucrados en las cepas estudiadas, y determinar la frecuencia de alelos resistentes por medio de técnicas moleculares para conocer su comportamiento y mejorar el uso de los piretroides para el control de garrapatas.

El uso de los piretroides debe ser usado de forma racional en ranchos con poblaciones de garrapatas clasificadas como susceptibles a los piretroides. Considerando que la resistencia de las garrapatas a los ixodícos persisten por muchos años<sup>(32)</sup>, especialmente las resistentes a los piretroides<sup>(7,11,33)</sup>, es necesario que se establezcan estrategias de control que reduzcan la presión de selección y permitan prolongar la vida útil de los piretroides en el estado de Yucatán, México.

transmembranal Domain III S-6, in the sodium channel<sup>(28)</sup>, which results in a structural modification of the sodium channel thus altering the stereochemical projection of the channel-pyrethroid molecule binding site. This provides the tick with this resistance characteristic. The amplification of this fragment led Rosario-Cruz et al<sup>(29)</sup> to demonstrate that the sodium channel mutation in *B. microplus* is the most important mechanism conferring resistance to the strains isolated in the Mexican strains. Nevertheless, esterase activity has been identified in the resistance of *B. microplus* to both pyrethroids and organophosphates<sup>(30,31)</sup>. Further studies are needed to learn about the resistance mechanisms involved in the strains studied, and determining the frequency of resistant alleles using molecular techniques in order to know about their behavior, seeking to improve the use of pyrethroids in the control of ticks.

Pyrethroids must be wisely used in those farms with ticks populations classified as pyrethroid susceptible. Considering that the resistance of ticks to ixodícos persist for many years<sup>(32)</sup>, particularly in those resistant to pyrethroids<sup>(7,11,33)</sup>, the establishment of control strategies leading to decreased selection pressure thus extending the useful life of pyrethroids in the state of Yucatán is needed.

It is concluded that the *B. microplus* strains isolated from the Yucatán field and studied herein, have a great variability in their cypermethrin susceptibility levels, depending on the particular conditions in each farm. For a field *B. microplus* strain to be considered as resistant or susceptible to pyrethroids, it is necessary to learn about the behavior of its RF<sub>50</sub>, RF<sub>99</sub>, and slope, given that safety margins when all these predictors are considered can assure a more rational use of pesticides. Likewise, identifying strains with low resistance levels will allow for timely decisions when different control alternatives are needed.

## ACKNOWLEDGEMENTS

Gratitude is expressed to *Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico's*



Se concluye que a nivel de campo en el estado de Yucatán, México, las cepas de *B. microplus* estudiadas presentan una gran variación en los niveles de susceptibilidad a la cipermetrina dependiendo de las condiciones particulares de cada rancho; y para considerar una cepa de campo de *B. microplus* como resistente o susceptible a los piretroides es necesario conocer el comportamiento de los IRs (50 y 99 %) y la pendiente, debido a que los márgenes de seguridad al considerar ambas predicciones podrían asegurar un manejo más racional en el uso de pesticidas. Asimismo, la identificación de cepas con bajo nivel de resistencia permitirá tomar la decisión de buscar oportunamente otras alternativas de control.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo proporcionado al M. en C. Darwin Cabrera Jiménez en sus estudios de Maestría en la Universidad Autónoma de Yucatán. Este proyecto fue financiado por CONACYT complementario No. 52612. Se agradece al laboratorio Lapisa S.A. de C.V. México, por el apoyo en la donación de la cipermetrina para los bioensayos. Un reconocimiento especial a los ganaderos miembros de la Unión Ganadera Regional del Estado de Yucatán por permitirnos trabajar en sus ranchos y dedicarnos tiempo en esta investigación.

## LITERATURA CITADA

1. Jonsson NN, Hope M. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol* 2007;(146):193-198.
2. Rodríguez-Vivas RI, Quiñones AF, Fragoso SH. Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. En: Enfermedades de importancia económica en producción animal. Rodríguez-Vivas, RI editor. México DF: McGraw-Hill-UADY; 2005:571-592.
3. Aguilar-Tipacamu G, Rodríguez-Vivas RI. Effect of moxidectin against natural infestation of the cattle tick *Boophilus microplus*

National Science/Technology Council) for supporting Darwin Cabrera Jiménez, MSc, in his masters' studies in UADY. This project was financed by CONACYT's complementary grant No. 52612. We also thank Lapisa SA. de CV. México, laboratories, for donating the cypermethrin used in our bioassays. Our special recognition goes to the UGROY fellow members for allowing us to work in their farms and for their time dedicated for this research.

*End of english version*

- 
- (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Vet Parasitol* 2003;(111):211-216.
  4. Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Arevalo F, Fragoso-Sánchez H, Santamaria VM, Rosario-Cruz R. Prevalence and potential risk factors for organophosphate and pyrethroid resistance in *Boophilus microplus* ticks on cattle ranches from the State of Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol* 2006;(136):335-342.
  5. Rodríguez-Vivas RI, Rodríguez-Arevalo F, Alonso-Díaz MA, Fragoso-Sánchez H, Santamaria VM, Rosario-Cruz R. Amitraz resistance in *Boophilus microplus* ticks in cattle farms from the state of Yucatan, Mexico: prevalence and potential risk factors. *Prev Vet Med* 2006;(75):280-286.
  6. Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H, Rosario-Cruz R. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Arch Med Vet* 2006;(38):105-113.
  7. Kunz SE, Kemp DH. Insecticides et acaricides: résistance et impact sur l'environnement. *Revue Scientifique et Technique. OIE.* 1994;(13):1249-1286.
  8. Davey RB, George JE. *In vitro* and *in vivo* evaluations of a strain of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) selected for resistance to permethrin. *J Med Entomol* 1998;(35):1013-1019.
  9. 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.
  10. Davey RB, George JE, Miller RJ. Control of organophosphate-resistant strain *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) infested on cattle after a series of dips in coumaphos applied at different treatment intervals. *J Med Entomol* 2004;(41):524-528.
  11. Rodríguez-Vivas RI, Fragoso SH, Rosario CR, García VZ, Alonso DM, Rosado AA, Neri OS, Ortiz NA, Osorio MJ. Avances en la epidemiología de la resistencia de *Boophilus microplus* a los ixodicidas en el sureste de México. XXX Aniversario del CENAPA. 30 años al servicio de la ganadería Nacional, 1975-2005. Jiutepec, Morelos, México. 2005.
  12. Rodríguez-Vivas RI, Rivas AL, Chowell G, Fragoso SH, Rosario CR, García Z, Smith SD, Williams JJ, Schwager SJ. Spatial distribution of acaricide profiles (*Boophilus microplus* strains susceptible or resistant to acaricides) in southeastern Mexico. *Vet Parasitol* 2007;(146):158-69.

13. Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO). Control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten: manual práctico de campo. FAO. 1987(1):5-20.
14. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática, INEGI. Anuario estadístico del estado de Yucatán. Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática. México. 2002.
15. Cen AJ, Rodríguez-Vivas RI, Domínguez AJL, Wagner G. Studies on the effect on infection by *Babesia sp* on oviposition of *Boophilus microplus* engorged females naturally infected in the Mexican tropics. *Vet Parasitol* 1998;(78):253-257.
16. Stone BF, Haydock P. A method for measuring the acaricide susceptibility of the cattle *Boophilus microplus*. *Bull Entomol Res* 1968;(53):563-578.
17. Rodríguez Vivas RI, Cob-Galera LA. Técnicas diagnósticas en parasitología veterinaria. 2a ed. Mérida, México: Universidad Autónoma de Yucatán; 2005.
18. LeOra Software. A user's guide to probit or logit analysis. LeOra Software. CA, USA: Berkeley. 2004.
19. Beugnet F, Chardonnet L. Tick resistance to pyrethroids in New Caledonia. *Vet Parasitol* 1995;(56):325-338.
20. Bianchi MW, Barre N, Messad S. Factors related to cattle infestation level and resistance to acaricides in *Boophilus microplus* tick populations in New Caledonia. *Vet Parasitol* 2003;(112):75-89.
21. Jonsson NN, Mayer DG, Green PE. Possible risk factors on Queensland dairy farms for acaricide resistance in cattle tick (*Boophilus microplus*). *Vet Parasitol* 2000;(88):79-92.
22. Nolan J, Wilson JT, Green PE, Bird PE. Synthetic pyrethroids resistance in field samples in the cattle tick (*Boophilus microplus*). *Aust Vet J* 1989;(66):179-182.
23. Miller RJ, Davey RB, George JE. Characterization of pyrethroid resistance and susceptibility to coumaphos in Mexican *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 1999;(36):533-538.
24. Cameron PJ, Walker GP, Hernan TJB. Development of resistance to fenvalerate in *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae) in New Zealand. *NZ J Crop Hort Sci* 1995(23):429-436.
25. Miller R, Davey RB, White WH, George JE. A comparison of three bioassay techniques to determine amitraz susceptibility in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *J Med Entomol* 2007(44):283-294.
26. Robertson JL, Preisler HK. Pesticides bioassays with arthropods. Florida, USA: CRC, Boca Raton; 1992.
27. Finney DJ. Probit analysis. 3rd Ed. United Kingdom: Cambridge University Press; 1971:333.
28. He H, Chen AC, Davey RB, Ivie GW. Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;(261):558-561.
29. Rosario-Cruz R, Guerrero FD, Miller RJ, Rodríguez-Vivas RI, Domínguez-García DI, Cornel AJ, Hernández-Ortiz R, George JE. Roles played by esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in populations of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) collected from Yucatan, Mexico. *J Med Entomol* 2005;(42):1020-1025.
30. Rosario-Cruz R, Miranda-Miranda E, Garcia-Vazquez Z, Ortiz-Estrada M. Detection of esterase activity in susceptible and organophosphate resistant strains of cattle tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae). *Bull Entomol Res* 1997;(87):197-202.
31. Jamroz RC, Guerrero FD, Pruett JH, Oehler DD, Miller RJ. Molecular and biochemical survey of acaricide resistance mechanisms in larvae from Mexican strain of the southern cattle tick, *Boophilus microplus*. *J Insect Physiol* 2000;(46):685-695.
32. Willandsen P. Tick control: Thoughts on a research agenda. *Vet Parasitol* 2006;(138):161-168.
33. Davey RB, George JE, Miller RJ. Comparison of the reproductive biology between acaricide-resistant and acaricide-susceptible *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet Parasitol* 2006;(139):211-220.