

Artículo de investigación

In vitro* resistance to topical acaricides of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from four regions of ColombiaResistencia in vitro a acaricidas tópicos de poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de cuatro departamentos de Colombia**Resistância in vitro aos acaricidas tópicos de populações de carrapatos *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de quatro departamentos da Colômbia*David Villar¹  MV, PhD [CVLAC](#), Jessed Gutiérrez¹ MV, Diego Piedrahita¹ MV, MSc, PhD [CVLAC](#), Arlex Rodríguez-Durán² MVZ [CVLAC](#), Jesús A. Cortés-Vecino² MV, MSc, PhD [CVLAC](#), Agustín Góngora-Orjuela³ MV, MSc, PhD [CVLAC](#), Nicolás Martínez⁴ MV, MSc, Jenny J. Chaparro-Gutiérrez¹ MV, MSc, PhD**Fecha correspondencia:**

Recibido: 26 de julio de 2016.

Aceptado: 2 de diciembre de 2016.

Forma de citar:Villar D, Gutiérrez J, Piedrahita D, Rodríguez-Durán A, Cortés-Vecino JA, Góngora-Orjuela A, Martínez N, Chaparro-Gutiérrez JJ. Resistencia in vitro a acaricidas tópicos de poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* provenientes de cuatro departamentos de Colombia. Rev. CES Med. Zootec. 2016; Vol 11 (3): 58-70.

Open access

© Copyright

Creative commons

Éthics of publications

Peer review

Open Journal System

e-ISSN 1900-9607

Comparte

**Abstract**

In Colombia, the control of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* lies almost exclusively on the use of chemical acaricides. However, *R. (B.) microplus* has developed resistance to most of the commercially available products. The aim of this study was to assess the degree of resistance to the major topical acaricides used in Colombia. The adult immersion test was used as recommended by FAO with ticks from 7 farms originating in 4 distant Colombian regions. The efficacy of the products was calculated based on the reproductive parameters of fecundity and fertility with groups of ticks (n = 40) exposed to the recommended concentrations of each acaricide, and compared with the respective control group exposed to distilled water. In general, products containing deltamethrin (25 ppm) and amitraz (208 ppm) were less effective, with efficacy values of <20% and 10-50%, respectively. Doubling the concentration did not increase the efficacy of either compound. The combination of chlorpyrifos (312 ppm) + cypermethrin (150 ppm) showed great variation between farms, with an efficacy ranging between 22-93%. Unlike chlorpyrifos, the organophosphorus ethion (622 ppm) was 99-100% effective in completely inhibiting oviposition in 4 of the 7 farms. In conclusion, resistance to deltamethrin and amitraz is very high in seven distant strains of the Colombian territory, varies widely for chlorpyrifos, and was not detected for ethion that was 99-100% effective.

Keywords: cattle, acaricides, resistance, ticks.**Resumen**

El control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en Colombia radica casi exclusivamente en el uso de acaricidas químicos. Sin embargo, *R. (B.) microplus* ha desarrollado resistencia a la mayoría de los productos actualmente disponibles comercialmente. El objetivo de este estudio fue

Sobre los autores:

¹ Laboratorio de Parasitología Veterinaria, Grupo de Investigación CIBAV, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

² Laboratorio de Parasitología Veterinaria, Grupo de Investigación Parasitología Veterinaria, Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia, Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Colombia.

³ Escuela de Ciencias Animales, Universidad de los Llanos, Villavicencio, Colombia.

⁴ Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Universidad de Córdoba, Montería, Colombia.

valorar el grado de resistencia a concentraciones recomendadas de los principales acaricidas comerciales de uso tópico en Colombia. Se empleó la prueba de inmersión de adultas (teleoginas) recomendada por la FAO con garrapatas procedentes de siete predios localizados en cuatro departamentos colombianos. La eficacia de los productos se calculó con base en los parámetros reproductivos de fecundidad y fertilidad con grupos de garrapatas (n=40) expuestas a cada acaricida, comparándolos con el respectivo grupo control expuesto a agua destilada. En general, los productos de deltametrina (25 ppm) y amitraz (208 ppm) fueron los menos efectivos, con valores de eficacia de <20% y de entre 10-50%, respectivamente. Tampoco se observó un aumento de eficacia al doblar la concentración de ambos compuestos por separado. La combinación de clorpirifos (312 ppm) + cipermetrina (150 ppm) mostró gran variación entre fincas, con una eficacia de entre el 22-93%. A diferencia del clorpirifos, el organofosforado etión (622 ppm) sí produjo un 99-100% de eficacia inhibiendo completamente la oviposición en cuatro de las siete fincas. En conclusión, la resistencia a deltametrina y amitraz es muy alta en siete poblaciones distantes del territorio colombiano; en cuanto al clorpirifos varía mucho, y éste no parece tener resistencia cruzada con el etión que fue el de mayor eficacia.

Palabras clave: acaricidas, tópicos, resistencia, garrapatas, bovino.

Resumo

O controle do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* na Colômbia está focado quase exclusivamente no uso de acaricidas químicos. Porém, *R. (B.) microplus* tem desenvolvido resistência à maioria dos produtos disponíveis comercialmente. O objetivo deste estudo foi valorar o grau de resistência às concentrações recomendadas dos principais acaricidas comerciais de uso tópico na Colômbia. Foi usada a prova da imersão de adultas (teleoginas) recomendada pela FAO com carrapatos procedentes de 7 fazendas localizadas em 4 departamentos colombianos. A eficácia dos produtos calculou-se com base nos parâmetros reprodutivos de fecundidade e fertilidade com grupos de carrapatos (n=40) expostos a cada acaricida. Em geral, os produtos deltametrina (25 ppm) e amitraz (208 ppm) foram os menos efetivos, com valores de eficácia de <20% e de entre 10-50%, respectivamente. Também não foi observado aumento da eficácia ao dobrar a concentração de ambos produtos por separado. A combinação de clorpirifos (312 ppm) + cipermetrina (150 ppm) mostrou uma grande variação entre as fazendas, com uma eficácia de 22-93%. Diferentemente do clorpirifos, o organofosforado etion (622 ppm) teve um 99-100% de eficácia por inibição completa da ovoposição em 4 das 7 fazendas. Em conclusão, a resistência à deltametrina e amitraz é muito alta em 7 populações distantes do território colombiano; quanto ao clorpirifos, varia muito e este não parece ter resistência cruzada com o etion que foi o de maior eficácia.

Palabras-chave: acaricidas, bovino, carrapatos, resistência, tópicos.

Introducción

La resistencia a acaricidas de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* se ha documentado en todos los países donde el control químico ha sido el método de elección para tratar infestaciones del ganado (FAO, 2003; 2004). En Colombia, aunque el problema se considera que está generalizado por todo el país, son pocos los estudios que han valorado la situación con el paso de los años (Benavides et al., 2000; Benavides y Romero, 2000; López-Valencia, 2009; Araque et al., 2014).

En los últimos cuatro años el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad de Antioquia ha recibido bastantes llamadas de ganaderos solicitando asistencia en el control de infestaciones por *R. (B.) microplus* que no responden a los acaricidas convencionales. Por ejemplo, en el caso de Antioquia, los estudios *in vivo* e *in vitro* en algunos municipios han mostrado que efectivamente existe un problema de resistencia a la mayoría de acaricidas comerciales (López *et al.*, 2015; Puerta *et al.*, 2015; Villar *et al.*, 2016). Para demostrar que se trata de una resistencia innata y no de una mala aplicación o preparación de los productos, se han realizado pruebas *in vitro* recomendadas por la FAO (2004); simultáneamente se han hecho estudios de campo empleando las guías recomendadas por la Asociación Mundial para el Avance de la Parasitología (Holdsworth *et al.*, 2006).

Los resultados muestran que incluso la ivermectina, de la que existen al menos 29 nombres comerciales distintos en Colombia, ha perdido entre un 50-75% de eficacia en limpiar bovinos infestados en varias fincas de Antioquia (López *et al.*, 2015). Dicha resistencia se manifiesta no solo como una pérdida de la eficacia terapéutica del producto, sino también en la duración del período de protección que la ivermectina debería aportar en animales tratados. Por su parte, con la prueba de inmersión de adultas (teleoginas) se ha visto que algunos acaricidas, como la cipermetrina han perdido totalmente su eficacia en todas las fincas muestreadas (López *et al.*, 2015; Puerta *et al.*, 2015). A este problema de multiresistencia se une el hecho de que en Colombia, y probablemente unido al cambio climático, la distribución geográfica de las garrapatas se está extendiendo a zonas de trópico alto donde anteriormente no podían sobrevivir (Cortés-Vecino *et al.*, 2010).

Si bien la prueba de inmersión de adultas (AIT - del inglés *Adult Immersion Test*) ha sido ampliamente usada por su simplicidad, la técnica se ha modificado en numerosas ocasiones como bien resumen algunos autores (Cutulle *et al.*, 2013). El no existir un protocolo estándar dificulta hacer comparaciones entre estudios, y algunos incluso cuestionan su capacidad de discriminar entre cepas susceptibles y resistentes (Jonsson *et al.*, 2007). Las principales modificaciones realizadas conciernen a variables como el tiempo de exposición que oscila entre 30 segundos (Drummond *et al.*, 1973) y 30 minutos (FAO, 2004), la naturaleza del acaricida (comercial vs grado analítico), y diluyentes (agua vs solventes orgánicos). Con esta prueba, la eficacia de los productos se calcula comparando el efecto sobre los parámetros reproductivos de las garrapatas (fecundidad y fertilidad) frente a un grupo control expuesto al diluyente, que en la mayoría de casos es agua destilada. Adicionalmente, se aconseja tener una cepa susceptible al producto para verificar que el producto es capaz de suprimir totalmente la oviposición y/o fertilidad de la garrapata cuando aún no existe resistencia (Cutulle *et al.*, 2013; Rodríguez-Correa *et al.*, 2015). Obviamente, esta prueba tan solo puede aportar información de resistencia en estadios adultos de garrapatas pero no serviría para valorar el impacto sobre larvas y ninfas. A pesar de las limitaciones citadas, la prueba de AIT está siendo empleada ampliamente en países de Sudamérica para realizar estudios epidemiológicos de la situación de resistencia a acaricidas (Bravo *et al.*, 2008; Andreotti *et al.*, 2011; Raynal *et al.*, 2013). Además, existen estudios que han contrastado la prueba de AIT con ensayos *in vivo* (con infestaciones naturales y experimentales en establo), mostrando que los resultados de eficacia *in vitro* reflejan bien el comportamiento esperado en campo para distintas formulaciones tópicas (Maciel *et al.*, 2015; Rodrigues *et al.*, 2015).

Los objetivos de este estudio fueron conocer la resistencia de *R. (B.) microplus* en otros departamentos de Colombia, y a su vez valorar algunos de los aspectos de

la prueba AIT, entre los cuales está la reproducibilidad, la capacidad de sinergismo entre acaricidas de distintas familias y el efecto de dosis crecientes frente a cepas resistentes.

Materiales y Métodos

Fincas

Las garrapatas se colectaron en siete fincas ganaderas distribuidas en cuatro Departamentos de Colombia: Arauca, Córdoba, Meta y Valle del Cauca. La recolección se realizó directamente de bovinos infestados, se empacaron en pequeñas cajas de cartón con hierba fresca para mantener la humedad, y fueron remitidas por mensajería rápida en avión al Laboratorio de Parasitología de la Universidad de Antioquia. Junto con las garrapatas se envió un cuestionario donde se preguntaba el nombre de los productos acaricidas que se han empleado en los últimos años, así como los que actualmente estaban logrando "limpiar" los animales de garrapatas y los que ya no servían para eliminar infestaciones. Las fechas de los muestreos iniciaron en septiembre de 2014 y finalizaron en junio del 2015, con intervalos de muestreos para la misma finca no superiores a tres meses.

Prueba de inmersión de garrapatas adultas

Una vez en el laboratorio se procedió a lavar las garrapatas varias veces con agua destilada y separarlas por grupos con base en su peso, incluyendo solo las que tuviesen más de 100 mg y haciendo grupos que no tuviesen más de 25 mg de diferencia. A continuación se hicieron grupos de 40 garrapatas balanceadas por peso para que la media y desviación de cada grupo fuese lo más homogénea posible. De esta manera se corrige el efecto que el peso de la garrapata tiene sobre el parámetro de fecundidad.

Cada producto comercial se preparó siguiendo las instrucciones del fabricante en tubos Falcon a un volumen final de 50 mL. El nombre de los productos empleados y la concentración final de exposición se resumen en la [tabla 1](#). Para seguir la metodología que actualmente usan numerosos autores ([Bravo *et al.*, 2008](#); [Andreotti *et al.*, 2011](#); [Raynal *et al.*, 2013](#)), la exposición de cada grupo de 40 garrapatas se realizó durante 5 minutos en continua agitación, después se secaron en papel filtro, se pesaron individualmente, y se pegaron en placas de Petri sobre cinta doble-faz en grupos de 10 garrapatas por placa, tal que había 4 placas por cada grupo de exposición. Al cabo de 20 días de incubación a 27°C y 95% de humedad relativa se procedió a pesar la masa de huevos de cada garrapata y se pesaron 12 mg (cantidad que se calculó bajo estereomicroscopio corresponder aproximadamente a 300 huevos) de los primeros huevos puestos por cada garrapata, que se introdujeron en tubos vacutainer tapados con algodón para su posterior cálculo del porcentaje de eclosión. Los tubos se introdujeron de nuevo en la incubadora y mantuvieron por otros 20 días hasta la eclosión de las larvas. Para valorar el porcentaje de eclosión se contaron el número de huevos no eclosionados tras sacarlos de los tubos y haberlos dispersados con acetona sobre una placa de Petri.

Tabla 1. Nombres comerciales, principios activos, lotes, fecha de expiración y concentraciones nominales de acaricidas tópicos usados para exponer *R. (B.) microplus*.

Principio activo y concentración	Producto comercial (compañía)	Lote (fecha de expiración)	Concentración nominal de exposición
Deltametrina (2,5%) EC	DeltaForce (Tagros Chemical India Ltd.)	15T004 (Mayo, 2018)	25 ppm
Cipermetrina + Piperonil-butóxido	Tino (Provet S.A.S, Bogota, Colombia)	08515E01 (Mayo 2017)	150 ppm + 150 ppm
Amitraz (12,5%)	Triatox (Schering-Plough Animal Health, Baton Rouge)	50520B (Mayo, 2018)	208 ppm
Etión (83%)	Dravafos (Genfar)	5GE0126 (Abril, 2018)	622 ppm
Clorpirifos + Cipermetrina	Impacto (Ourofino Saude Animal Ltda.)	0002 (Junio, 2017)	312 ppm + 150 ppm
Triclorfón (99%)	Neguvon (Bayer S.A., Colombia)	LC007712 (08-2017)	1% (=10000 ppm)

Cálculo de la eficacia

El cálculo de la eficacia de cada producto se realizó comparando los parámetros de fecundidad (masa de huevos/peso de hembra ingurgitada) y fertilidad (% de eclosión) de cada garrapata del grupo tratado con respecto al grupo control expuesto a agua destilada. Se empleó la siguiente fórmula:

IR (Índice Reproductivo) = (masa de huevos/peso hembra individual) x % eclosión.

El porcentaje sobre el control se calculó de acuerdo a la fórmula:

% Control = $[(\sum IR \text{ control} - \sum IR \text{ tratados}) / \sum IR \text{ control}] \times 100$.

Para mostrar de forma detallada el cálculo de eficacia realizado en cada finca se seleccionó la finca del Valle del Cauca por ser la que más garrapatas remitió en dos envíos consecutivos en febrero y abril; ello permitió hacer exposición al mayor número de productos de uso tópico dispuestos comercialmente. Para valorar si existía diferencia significativa de cada parámetro reproductivo (masa de huevos, fecundidad, fertilidad e índice de reproducción) con respecto al grupo control se hizo un análisis de Kruskal-Wallis usando el paquete estadístico SPSS (versión 21, 2012), prueba que es empleada en estudios similares ([Davey et al., 1998](#); [Cutullé et al., 2013](#)).

Resultados

La eficacia de los acaricidas empleados en las seis fincas se muestra en la [tabla 2](#); para la finca del Valle del Cauca se muestran además todos los parámetros reproductivos empleados en el cálculo de dicha eficacia ([Tabla 3](#)). Los grupos controles expuestos a agua destilada tuvieron valores de los parámetros reproductivos similares a los esperados para la especie. La media del parámetro de fecundidad fue superior al 0,5 y la fertilidad se mantuvo entre 90-100% para las garrapatas controles

procedentes de todas las fincas, excepto para el segundo ensayo de las provenientes del Valle del Cauca donde la oviposición fue de tan solo el 45% del peso de la garrapata adulta (Tabla 3). Dichas garrapatas llegaron al laboratorio habiendo iniciado la oviposición lo que podría haber alterado dicho parámetro.

Los dos piretroides empleados, deltametrina o cipermetrina combinada con piperonil-butóxido, obtuvieron la eficacia más baja de todos los acaricidas. Se observó que la deltametrina perdió casi toda su eficacia (10-20%) en 6 de las fincas muestreadas, alcanzando un valor máximo de tan solo un 31-35% para la finca del Valle de Cauca a una exposición de 50 ppm, que es el doble de la recomendada por la compañía comercial (Tabla 3). En esta finca, la cipermetrina (150 ppm) combinada con el piperonil-butóxido (150 ppm) alcanzó una eficacia máxima entre 16-25%.

Tabla 2. Eficacia de acaricidas tópicos frente a poblaciones de *Rhipicephalus (B.) microplus* (n=40) procedentes de fincas tres Departamentos de Colombia, y expuestas durante 5 minutos a concentraciones recomendadas de productos comerciales.

Departamento Finca	Eficacia†				
	Amitraz (208 ppm)	Deltametrina (25 ppm y 50 ppm)	Clorpirifos (312 ppm) + Cipermetrina (187 ppm)	Etion (622 ppm)	Triclorfón (1%)
Meta					
Finca 1 (Guadales)	47,2%	10,4% [20,9%]* (25ppm)	39,2%	-	25,9%
Finca 2 (Jordán)	31,3%	18,3% (25ppm)	-	-	-
Arauca					
Finca 1 (Costa-Azul)	9,7%	6,7% (25 ppm) 9,0% (50ppm)	93,1 % [88,0%]*	100%	46,4%
Finca 2 (La Palmita)	-	22,8% (50ppm)	65,0%	99,8%	34,9%
Córdoba					
Finca 1 (Florida Blanca)	19,8%	8,8 (25 ppm)	80,1%	-	-
Finca 2 (El Deseo)	35,4%	19,7% (50ppm)	63,4%	100%	-

† Eficacia: % control = $[(\Sigma \text{IR control} - \Sigma \text{IR tratados}) / \Sigma \text{IR control}] \times 100$.

* Análisis repetido con garrapatas remitidas en una fecha posterior.

Para el amitraz, los valores de eficacia superaron ligeramente a los de deltametrina en todas las fincas excepto en una donde coincidieron en un 9%. No obstante, el valor máximo alcanzado del amitraz fue de tal solo el 47% (Tabla 2). Al igual que con la deltametrina, la exposición al doble de la concentración recomendada (416 vs 208 ppm) en la finca del Valle del Cauca no produjo un aumento de la eficacia (Tabla 3). Además, cuando en el segundo ensayo se expusieron grupos de tan solo 15 garrapatas a concentraciones crecientes de amitraz entre 208 ppm y 1040 ppm no se observó un efecto dosis-respuesta; sin embargo, si hubo una gran variación entre grupos mayor de lo esperado si la eficacia en todos ellos hubiese sido la misma (Tabla 3). Si bien el principal parámetro reproductivo afectado por el amitraz fue la oviposición para todas las fincas, muchas garrapatas tuvieron una postura grande de huevos pero de una masa más oscura con huevos deformes (Figuras 1 y 2), por lo que la medición de fertilidad también fue significativamente ($P < 0,05$) menor al control como se muestra en la tabla 3.

Tabla 3. Parámetros reproductivos de poblaciones de *Rhipicephalus (B.) microplus* recogidas de la finca del Valle del Cauca en febrero y abril 2016, y expuestas *in vitro* por 5 minutos a concentraciones recomendadas de productos comerciales†.

Acaricida Fecha [ppm]	Parámetro	N° de hembras	Peso hembras (media ± D.E) mg	Masa huevos (media ± D.E) mg	Fecundidad (huevos÷peso hembras)	Fertilidad (% eclosión)	Índice de reproducción (fecundidad x fertilidad)	Eficacia ^a
Control (dH ₂ O)								
Feb		40	197,4±35,3	106,8±29,2	0,54±0,09	94,9±16,0	52,2±10,8	-
Abr		40	199,4±35,5	89,5±38,2	0,45±0,17	90,9±16,4	45,5±17,6	-
Deltametrina (50 ppm)								
Feb		40	195,8±36,0	70,3±47,6*	0,36±0,23*	91,2±12,1	33,5±22,4*	35,8%
Abr		40	199,2±37,2	69,7±41,7	0,36±0,21	77,9±38,8	31,4±23,2	31,0%
Cipermetrina (150 ppm) +PBO								
Feb		40	199,6±25,4	97,2±32,6	0,49±0,15	86,0±29,6*	43,9±19,1	15,9%
Abr		32	169,4±35,8	64,3±41,4	0,38±0,21	89,8±20,5	34,3±21,8	24,6%
Amitraz								
Feb (208 ppm)		40	198,0±33,6	75,0±56,8	0,36±0,26	75,7±37,1*	32,2±26,8*	38,9%
Feb (416 ppm)		40	200,4±34,7	68,3±50,0*	0,35±0,25*	81,7±26,5*	30,6±24,9*	41,4%
Abr (208 ppm)		15	198,5±34,4	81,1±41,5	0,42±0,20	91,5±14,3	39,1±20,9	14,0%
Abr (416 ppm)		15	198,3±33,8	50,5±55,9	0,24±0,26	68,3±39,1	20,4±26,3*	55,2%
Abr (624 ppm)		15	198,4±36,2	53,8±47,6	0,27±0,23	82,6±31,4	23,8±22,3*	47,7%
Abr (832 ppm)		15	202,4±35,6	54,9±51,4	0,27±0,24	68,3±42,2	22,4±25,5*	50,8%
Abr (1040 ppm)		15	201,3±30,0	65,1±44,1	0,33±0,22	76,6±39,1	27,5±23,8	38,5%
Etión (622 ppm)								
Feb		40	197,8±31,1	14,3±15,1*	0,07±0,07*	1,20±5,30*	0,26±1,54*	99,5%
Abr		40	197,0±36,2	7,92±13,9*	0,04±0,06*	0*	0*	100%
Clorpirifos + cipermetrina								
Feb		40	200,3±32,9	91,4±38,0	0,45±0,17	88,1±19,9*	40,7±18,6	22,0%
Triclorfon (1%)								
Abr		40	199,2±35,5	52,7±42,6*	0,25±0,19*	45,6±35,4*	13,4±16,9*	70,5%
Amitraz+clorpirifos+cipermetrina								
Feb		40	198,8±36,5	83,4±43,6	0,42±0,20	85,5±24,7	37,3±20,9	28,5%
Abr		40	181,5±28,4	63,3±39,7	0,35±0,21	60,9±41,9*	25,6±23,2*	43,7%
Amitraz + cipermetrina + PBO								
Feb		40	195,1±15,5	69,4±48,8*	0,35±0,25*	85,3±25,0	31,7±25,0*	39,2%
Abr		37	175,5±16,6	48,6±36,2*	0,28±0,22	77,0±33,6	24,3±21,7*	46,6%

^aEficacia: % control = $(\sum IR \text{ control} - \sum IR \text{ tratados}) / \sum IR \text{ control} \times 100$; †Productos usados: Triatox® (deltametrina), Deltalforte® (deltametrina), Impacto® (clorpirifos+cipermetrina), Tino® (cipermetrina+piperonil-butoxido), Dravafos®(etión)

*Significancia: P<0,05 comparada con el respectivo grupo control.



Figura 1. Incubación de dos garrapatas ingurgitadas tras una exposición a amitraz (208 ppm) por 5 minutos. Nótese que la garrapata de la izquierda ha puesto una masa de huevos deforme mientras que la de la derecha tiene una apariencia normal.



Figura 2. Placas de Petri con garrapatas de una de las fincas de Córdoba (Montería) después de 20 días de incubación. En la placa derecha las garrapatas fueron expuestas por 5 minutos a etión (600 ppm) y la fecundidad fue nula (=cero oviposición). Por su parte la placa izquierda muestra un grupo de garrapatas control expuestas a agua destilada.

Los productos que más letalidad produjeron en todas las fincas fueron los que contenían alguno de tres compuestos organofosforados (etiión, clorpirifos y triclorfón), si bien hubo gran diferencia entre ellos y entre distintas fincas. El etiión fue el único acaricida que mostró una eficacia del 99-100% en las garrapatas de las 4 fincas en que se empleó. Por su parte, hubo gran variación para el clorpirifos, con valores de eficacia que oscilaron entre el 22 y 93%. De igual manera se observó gran diferencia para la eficacia del triclorfón de entre el 26 y 70%. Después del etiión, el triclorfón fue el acaricida que tuvo más impacto sobre el parámetro de fertilidad de huevos con una disminución de hasta el 50% de la eclosión con respecto al grupo control (Tabla 3).

La repetición de exposiciones a garrapatas de la misma finca en distintas ocasiones, con 2 meses de diferencia para la finca del Valle del Cauca, mostró valores de eficacia muy similares para cada acaricida y sus asociaciones, con una variación de un 5-10% en la mayoría de repeticiones ([Tabla 3](#)). Esto no se cumplió para el caso de la exposición a amitraz y la mayor variación pudo deberse al uso de grupos de tan solo 15 y no de 40 garrapatas. La exposición a las combinaciones amitraz + clorpirifos, y amitraz + cipermetrina + piperonil butóxido para la finca del Valle del Cauca no produjo un efecto mayor del obtenido por alguno de los dos acaricidas por separado ([Tabla 3](#)).

Discusión

Este estudio empleó la prueba de inmersión de adultas (teleoginas) para valorar el grado de resistencia de poblaciones de *R. (B.) microplus* colombianas frente a concentraciones recomendables de acaricidas comerciales. Los resultados evidenciaron grandes diferencias de eficacia entre los distintos productos usados para garrapatas de la misma finca, así como de la eficacia de los mismos con garrapatas de distintas fincas; por ello, la resistencia debe valorarse de forma individualizada por finca.

En general, la eficacia de los acaricidas piretroides (deltametrina y cipermetrina) fue la más baja de todos los acaricidas empleados y coincide con aquellos productos comerciales mencionados como ineficientes por los ganaderos. Todas las fincas mencionaron el nombre comercial de algún producto a base de cipermetrina como aquellos que ya no funcionaban. Al comparar los valores aquí observados entre un 10-20% de eficacia para ambos piretroides con estudios epidemiológicos en regiones brasileñas donde emplearon el mismo protocolo de AIT, los resultados son similares en señalar que en algunas regiones los piretroides han perdido casi toda su eficacia ([Raynal et al., 2013](#)). No obstante, en estudios anteriores y de otras zonas brasileñas citan valores de eficacia por encima del 50%, si bien siguen siendo el grupo de acaricidas donde aparece mayor resistencia ([Andreotti et al., 2011](#); [Brito et al., 2011](#)). Estudios recientes en 4 fincas de Antioquia han mostrado que para la cipermetrina los valores de eficacia también eran menores del 20%, e incluso del 0% en dos de ellas ([Puertas et al., 2015](#); [López et al., 2015](#)).

El amitraz mostró una eficacia ligeramente superior a la deltametrina en seis de las siete fincas muestreadas, pero fue baja sin superar el 50% en ninguna población analizada. Paradójicamente, en un estudio epidemiológico en Brasil que mostró valores de eficacia muy bajas para la deltametrina (0-26%), el amitraz también superó a la deltametrina en un 10-20% en la mayoría de fincas muestreadas ([Raynal et al., 2013](#)). Las concentraciones de amitraz recomendadas para uso en campo son de 200-250 ppm y estudios que usaron la prueba de AIT con una cepa susceptible y otra muy resistente al amitraz mostraron que a esa concentración la oviposición se inhibía completamente en la población susceptible, pero que era igual al grupo control en la población resistente ([Cutullé et al., 2013](#)). En el presente estudio los resultados mostraron que la eficacia del amitraz no aumentó a concentraciones por encima de lo recomendado comercialmente con garrapatas de la finca del Valle del Cauca ([Tabla 3](#)).

Otros estudios que hicieron exposiciones de adultas a concentraciones crecientes similares (208-1040 ppm) con poblaciones resistentes obtuvieron eficacias parecidas entre el 30-60% sin que ésta aumentase a las concentraciones más altas ([Bravo et al., 2008](#)). El que no exista una relación dosis-respuesta para el amitraz también

se puso de manifiesto en otros estudios, haciendo imposible establecer una dosis discriminatoria única que pudiese recomendarse internacionalmente para catalogar a una cepa como claramente resistente ([Jonsson *et al.*, 2007](#)).

La variabilidad observada a distintas concentraciones, suponiendo que todas tuviesen el mismo efecto, podría en gran medida deberse al escaso número de garrapatas usadas por grupo. A diferencia de los estudios anteriores en que se usaron grupos reducidos de tan solo 10 garrapatas, en el presente estudio se usaron 40 garrapatas por grupo y se observó que la variabilidad entre las concentraciones de 208 y 416 ppm fue de tan solo un 2.5% en el valor de eficacia (38.9 vs 41.4%, [Tabla 3](#)).

Lo anterior además podría explicar que la variabilidad al amitraz aumentase mucho cuando tan solo se emplearon 15 garrapatas por grupo. Estudios anteriores en nuestro laboratorio mostraron que dichas diferencias entre grupos similares se reducía cuando se empleaba un mayor número de garrapatas ([Puerta *et al.*, 2015](#)). La importancia de usar un mayor número de garrapatas radica precisamente en que es normal que 2-3 garrapatas en cada grupo de 40 garrapatas control no lleguen a ovipositar; el que aleatoriamente dichas garrapatas se incluyesen en grupos más reducidos, ya sea el control o tratados, afectaría los cálculos de eficacia de cualquier acaricida. Además, sería lógico pensar que al usar grupos reducidos de garrapatas aumenta la posibilidad de que el número de las resistentes y susceptibles no estén igualmente representados en dicho grupo. Eso podría explicar porque el grupo de tan solo 15 garrapatas a la dosis de 208 ppm de amitraz no produjo la eficacia esperada del 40% cuando se usaban 40 garrapatas por grupo ([Tabla 3](#)).

En contra de lo esperado, la combinación del amitraz con cipermetrina, o del amitraz con clorpirifos no produjo un aumento de la eficacia para las garrapatas de la finca del Valle del Cauca ([Tabla 3](#)). Precisamente, la razón de usar asociaciones entre pesticidas de distintas familias, con o sin inhibidores del metabolismo como el piperonil-butóxido, es la de controlar cepas resistentes de garrapatas como se ha podido demostrar experimentalmente por algunos autores ([Li *et al.*, 2007](#)) y también en estudios anteriores en nuestro laboratorio ([López *et al.*, 2015](#)). De hecho, gran número de fórmulas comerciales actuales son asociaciones entre principios que actúan por distintos mecanismos. El que no se observase un mayor efecto de las combinaciones con amitraz sugiere que, cuando alguno de ambos principios activos ha perdido mucha eficacia también se pierde la posible sinergia que podría existir. Puesto que los mecanismos de resistencia y grado de resistencia pueden ser muy variados entre poblaciones de distinto origen, habría que estudiar si las combinaciones aquí usadas resultarían eficaces con las poblaciones resistentes procedentes de las otras fincas muestreadas.

Con respecto a los acaricidas de la familia organofosforados, los resultados fueron más alentadores. El etión a la concentración recomendable de 622 ppm mantuvo un 99-100% de eficacia al inhibir casi por completo la oviposición en todas las garrapatas analizadas. En un estudio similar, donde se expusieron lotes de 20 garrapatas procedentes de distintas regiones colombianas con el mismo protocolo de la prueba ALT, se observó que en 37 de 71 (56%) predios analizados la eficacia del etión estuvo por encima del 90% ([Araque *et al.*, 2015](#)); por tanto, aunque aquí no se detectó una pérdida de eficacia a este compuesto, hay que resaltar que la exposición por falta de garrapatas solo se realizó con garrapatas procedentes de cuatro de las siete fincas muestreadas, y que si el muestreo se hubiese ampliado es probable que se hubiesen detectado fincas con resistencia. Una pérdida de eficacia al etión de más del 50%

se ha reportado en la mayoría de algunos predios analizados en algunos estudios epidemiológicos de Brasil ([Andreotti et al., 2011](#)). Por su parte, los resultados presentes mostraron que el clorpirifos combinado con la cipermetrina se comportó de forma distinta según la finca, con valores de eficacia que oscilaron entre un 22 y 93%. En el estudio epidemiológico de [Andreotti et al. \(2011\)](#) la variación de eficacia a la combinación clorpirifos + cipermetrina osciló entre un 0 y 100%, resaltando la importancia de hacer el estudio individualizado por predio. Ésta y otras combinaciones de piretroides y organofosforados son ampliamente usadas en Brasil donde se ha observado que, cuando existe resistencia, la asociación de ambas familias aumenta la eficacia de los principios activos de cada una por separado ([Andreotti et al., 2011](#); [Raynal et al., 2013](#), [Brito et al., 2011](#)).

Con respecto al triclorfón, los resultados mostraron que cuando se emplea solo, suele tener una eficacia inferior a los otros organofosforados, a pesar de que la concentración empleada en forma de suspensión es del 1% (=10000 ppm), es decir tres órdenes de magnitud por encima de las empleadas para el etión y clorpirifos. No obstante, este producto es raro que se prepare individualmente y la mayoría de ganaderos lo emplean combinado con emulsiones de piretroides, amitraz, u otros organofosforados. Puesto que para este compuesto la eficacia estuvo dada no solo por el efecto sobre la oviposición, sino en gran medida por afectar la fertilidad ([Tabla 3](#)), sería de interés valorar cómo se comporta en forma combinada no solo con organofosforados sino también con acaricidas de otras familias.

Es importante anotar que si bien el etión fue por primera vez registrado en USA para uso agrícola y ganadero a finales de los 1950s, se cancelaron todos los permisos y la EPA americana prohibió su uso desde finales del año 2004 (https://archive.epa.gov/pesticides/reregistration/web/html/ethion_red.html).

Entre otros, la principal preocupación de la EPA fue el riesgo de toxicidad para numerosas especies de invertebrados y peces en medios acuáticos. A diferencia de los piretroides y amitraz, los organofosforados etión y clorpirifos se eliminan por la leche y los productos de uso tópico (en baños o "pour-on") no están indicados para uso en ganado de leche ([Baynes et al., 1997](#)).

Puesto que la mayoría de las fincas aquí estudiadas son de ganado lechero, la aplicación de estos acaricidas durante la época de ordeño es probable que esté ocasionando residuos en leche. Por otra parte, varias de las fincas mencionaron el uso de un producto no registrado, y por tanto de uso ilegal, que recibe el nombre de "Ivercyt". Este producto que por las encuestas y observaciones personales parece estar distribuido por toda Colombia, se comercializa falsamente como "endectocida" a base de piretrina para uso en bovinos en lactancia; en realidad consiste en una ivermectina al 10,5% y la dosis que resulta al aplicarse de acuerdo al inserto es 4 veces por encima (2,1 mg/kg p.v.) del máximo recomendable ([López et al., 2015](#)). Todos los productos a base de ivermectina no tienen aprobación para uso en bovinos en lactancia.

En conclusión, la prueba de AIT con poblaciones de siete predios de cuatro departamentos colombianos mostró en todos ellos un grado resistencia muy alto (eficacia <20%) a la deltametrina, y de moderado a alto (eficacia ≈30-50%) para el amitraz. La eficacia para la combinación de clorpirifos + cipermetrina osciló mucho entre predios, y al haberse perdido casi por completo la eficacia a la cipermetrina, el efecto de la combinación es probable que se produzca exclusivamente por clorpirifos. Los

resultados sugieren que no existe resistencia cruzada entre el clorpirifos y el etión, ya que este último fue el único que suprimió el 100% de la oviposición en todas las cepas que el clorpirifos no inhibió. El etión fue el único acaricida que aquí no presentó resistencia. Dicha diferencia de susceptibilidad a estos dos organofosforados está siendo actualmente estudiada y podría estar causada por diferencias en sensibilidad de la acetilcolinesterasa a ambos compuestos.

Referencias

Andreotti R, Guerrero FD, Soares MA, Barros JC, Miller RJ, Perez de León A. Acaricide resistance of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* in State of Mato Grosso do Sul, Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal 2011; 20(2): 127-133. [Scielo](#)

Baynes RE, Craigmill AL, Riviere JE. Residue avoidance after topical application of veterinary drugs and parasiticides – FARAD Digest. Journal of the American Veterinary Medical Association 1997; 210(9): 1288-1289.

Benavides E, Rodríguez JL, Romero A. Isolation and partial characterization of the Montecitos strain of *Boophilus microplus* (Canestrini 1877) multiresistant to different acaricides. Ann N Y Acad Sci 2000; 916: 668-671.

Benavides E, Romero A. Preliminary results of a larval resistance test to ivermectins using *Boophilus microplus* reference strains. Ann N Y Acad Sci 2000; 916: 610-612.

Bravo M, Henriquez H, Coronado A. In vitro efficacy of amitraz and cypermethrin on *Boophilus microplus* from dairy farms in Lara State, Venezuela. Ann. N. Y. Acad. Sci 2008; 1149:246-248. doi:[10.1196/annals.1428.032](https://doi.org/10.1196/annals.1428.032)

Brito LG, Barbieri FS, Rocha RB, Oliveira MCS, Ribeiro ES. Evaluation of the efficacy of acaricides used to control the cattle tick, *Rhipicephalus microplus*, in dairy herds raised in the Brazilian Southwestern Amazon. Veterinary Medicine International. 2011; Article ID 806093. Doi:10.4061/2011/806093.

Cortés Vecino J. A. Cambios en la distribución y abundancia de las garrapatas y su relación con el calentamiento global. Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria y de Zootecnia. 2010; Vol 57(1): 48-58. Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá.

Cutullé C, Lovis L, D'Agostino BI, Balbiani GG, Morici G, Citroni D, Reggi J, Caracostangolo JL. In vitro diagnosis of the first case of amitraz resistance in *Rhipicephalus microplus* in Santo Tomé (Corrientes), Argentina. Veterinary Parasitology 2013; 192(1-3): 296-300.

Davey RB, Ahrens EH, George JE, Hunter JS, Jeannin P. Therapeutic and persistent efficacy of fipronil against *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on cattle. Veterinary Parasitology 1998; 74: 261-276

Drummond RO, Ernst S E, Trevino J L, Gladney WJ, and Graham OH. *Boophilus annulatus* and *B. microplus*: laboratory tests of insecticides. J. Econ. Entomol. 1973; 66: 130-133.

FAO (2003) Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Dirección de Producción y Sanidad Animal de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma. (www.fao.org/docrep/006/y4813s/y4813s03.htm)

[FAO] Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2004. Working group on parasite resistance. "Acaricide resistance: diagnosis, management and prevention", in Guidelines for resistance management and integrated parasite control in ruminants. Pp. 25-77 (<http://www.fao.org/ag/aga.html>)

Holdsworth PA, Kemp D, Green P, *et al.* World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology (W.A.A.V.P.) guidelines for evaluating the efficacy of acaricides against ticks (Ixodidae) on ruminants. *Veterinary Parasitology* 2006; 136:29-43.

Jonsson NN, Miller RJ and Robertson JL. Critical evaluation of the modified-adult immersion test with discriminating dose bioassay for *Boophilus microplus* using American and Australian isolates. *Veterinary Parasitology* 2007; 146:307-317.

Li AY, Chen AC, Miller RJ, Davey RB, George JE. Acaricide resistance and synergism between permethrin and amitraz against susceptible and resistant strains of *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) *Pest Management Science* 2007; 63:882-889.

López-Arias, A., D. Villar, J. Chaparro-Gutiérrez, R. J. Miller, and A. A. Pérez de León. Reduced efficacy of commercial acaricides against populations of resistant cattle tick *Rhipicephalus microplus* from two municipalities of Antioquia, Colombia. *Environmental Health Insights Suppl: Disease Vectors* 2015; 8 (Suppl 2): 71-80. (doi:[10.4137/EHI.S16006](https://doi.org/10.4137/EHI.S16006)).

López Valencia G, Grisi do Nascimento C, Gómez Oquendo J, Valencia Agudelo LA, Gonzalez Carrasquilla D. Evaluación de una mezcla de cipermetrina + clorpirifos sobre la garrapata *Rhipicephalus microplus* en pruebas de campo y de laboratorio en el predio Esteban Jaramillo Román Gómez del Politécnico Colombiano de Marinilla, Antioquia. *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia* 2009; Vol 4(2):57-65.

Maciel WG, Lopes WZ, Cruz BC, Gomes LV, Teixeira WF, Buzzulini C, Bichuette MA, Campos GP, Felippelli G, Soares VE, Oliveira GP, Jose da Costa A. Ten years later: evaluation of the effectiveness of 12.5% amitraz against a field population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* using field studies, artificial infestation (stall tests) and adult immersion tests. *Veterinary Parasitology* 2015; 214: 233-241.

Puerta JM, Chaparro JJ, López-Arias A, Arias-Arroyave, Villar D. Loss of *in vitro* efficacy of topical commercial acaricides on *Rhipicephalus microplus* from Antioquian farms, Colombia. *J. Med. Entomol* 1-6. 2015; DOI: [10.1093/jme/tjv129](https://doi.org/10.1093/jme/tjv129)

Raynal JT, Borges da Silva AA, Sousa TJ, Bahiense TC, Meyer B, Portela RW. Acaricide efficiency on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* from Bahia state North-Central region. *Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal* 2013; 22(1):71-77.

Rodriguez-Correa R, Zanetti-Lopes WD, Pires-Teixeira WF, Cayeiro-Cruz B, Costa-Gomez LV, Felippelli G, Giquelin-Maciel W, Favero FC, Buzzulini C, Bichuette MA, Soares VE, José da Costa A. A comparison of three different methodologies for evaluating *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* susceptibility to topical spray compounds. *Veterinary Parasitology* 2013; 207:115-124

Villar D, Puerta J, López-Arias A, Chaparro JJ. Ivermectin resistance of three *Rhipicephalus microplus* populations using the larval immersion test. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias* 2016; 29:51-57. Doi: [10.17533/udea.rccp.v29n1a06](https://doi.org/10.17533/udea.rccp.v29n1a06)).