

## Resistencia a cipermetrina y fipronil en larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae) del estado Aragua

### *Resistance detection to ixodicides in larvae of Rhipicephalus sanguineus (Latreille, 1806) (Acari: ixodidae) of Aragua state*

Nieves Jerardin Molina Moreno<sup>1</sup>, Darjaniva Molina de Fernández<sup>1</sup>, María Dalila Forlano<sup>2</sup>, Elias Ascanio<sup>3</sup> & José Romero Palmera<sup>4</sup>

#### RESUMEN

La garrapata *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) es un ectoparásito cosmopolita de importancia en la salud pública y veterinaria, debido a su potencial como vector de enfermedades transmisibles a animales y humanos. Las herramientas empleadas para su control se basan en el uso de ixodicidas; sin embargo, se ha observado su ineficacia a nivel operativo. El objetivo de esta investigación fue evaluar el nivel de resistencia del ectoparásito a dosis de ixodicidas, mediante la prueba de inmersión de larvas (Shaw) de *R. sanguineus*, obteniendo resistencia nivel II al fipronil en las poblaciones de garrapatas denominadas A1, A2 y C1 con factores de resistencia (FR): 6,16; 6,61 y 18,59 respectivamente. Los valores de oxidasa elevados (FS=1,97) en la población A2 sugieren resistencia a cipermetrina. Los resultados obtenidos representan el primer reporte de resistencia en esta especie en Venezuela y son una contribución al control del vector a nivel local.

**Palabras clave:** cipermetrina, ectoparásito, ixódido, fipronil, resistencia a ixodicidas.

#### SUMMARY

The tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) is a cosmopolitan ectoparasite of great importance in public and veterinary health, because it is a potential vector of diseases. The tools used for the control are based on the use of ixodicides; however, its inefficiency has sometimes been observed at the operational level. Therefore the level of resistance to the ixodicides was evaluated, by means of the immersion test for larvae (Shaw), level II resistance was found to fipronil, in tick populations: A1, A2 and C1 with resistance factors (FR): 6.16, 6.61 and 18.59 respectively. High levels of oxidases (FS= 1.97) in population A2 suggest resistance to cypermethrin. The results obtained represent the first report of resistance in this species in Venezuela and are a contribution to the control of the vector at a local level.

**Key words:** cypermethrin, ectoparasite, fipronil, ticks, ixodicides and resistances.

#### INTRODUCCIÓN

*Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806), conocido comúnmente como la garrapata marrón del canino, es un ectoparásito hematófago de los vertebrados, que se encuentra ampliamente distribuido en el mundo. Su principal huésped es el canino y accidentalmente puede parasitar a los humanos (Alcaino *et al.*, 1995; Quiroz *et al.*, 2011). La importancia de esta especie en la salud

pública y veterinaria está dada por su condición de ectoparásito hematófago y por su rol como vector, siendo capaz de transmitir agentes etiológicos a sus huéspedes, tales como parásitos y bacterias causantes de enfermedades como: anaplasmosis, ehrlichiosis, babesiosis (Quiroz *et al.*, 2011; Pérez *et al.*, 1996). También tiene la capacidad de transmitir los agentes causantes de la fiebre maculosa, *Rickettsia rickettsii* a los seres humanos (Demma *et al.*, 2005).

<sup>1</sup> Laboratorio de Evaluación de Insecticidas, Centro de Estudios de Enfermedades Endémicas y Salud Ambiental (CEEESA), adscrito al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon" (IAE-MPPS), Maracay-Aragua.

<sup>2</sup> Cátedra de Parasitología, Escuela de Ciencias Veterinarias, Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado". Cabudare-Lara.

<sup>3</sup> Cátedra de Farmacología y Toxicología, Escuela de Ciencias Veterinarias Universidad Central de Venezuela, Maracay-Aragua.

<sup>4</sup> Departamento Clínico Integral, Universidad de Carabobo, Maracay-Aragua.

\* Autora de Correspondencia: jeraldinmolina2@gmail.com

En Venezuela se registró su llegada en el año 1936 (Guerrero, 1996), y el primer caso de Ehrlichiosis se reportó en el año 1996, convirtiéndose en la primera zoonosis transmitida por este ixódido en el país (Pérez *et al.*, 1996). La causa más probable de su dispersión en el mundo es el tráfico internacional de mascotas (Walker *et al.*, 2000). Su tasa de reproducción elevada le ha permitido adaptarse al medio ambiente exitosamente, encontrándose en zonas de clima templado, sobreviviendo al invierno en áreas domésticas, peri domésticas y en cautiverios como en las perreras, en donde las condiciones ecológicas les son favorables para existir (Braz & Ferreira, 2007) aumentando el riesgo de trasmisión de agentes patógenos, siendo *R. sanguineus* una especie de alto impacto sanitario (Guerrero, 1996; Guglielmo *et al.*, 2004).

El control sanitario de *R. sanguineus* se dificulta por tener un ciclo de vida de tres hospedadores con un intermedio de vida libre entre cada uno (Quiroz *et al.*, 2011). Adicionalmente no se cuenta con un inmunógeno certificado por organismos internacionales como una herramienta alternativa de control, por tal motivo el uso de productos ixodicidas es lo más recomendado (Mencke, 2005). Por lo general, el propietario de las mascotas aplica ixodicida cuando se encuentran con una garrapata.

En las últimas décadas la industria farmacéutica ha desarrollado formulaciones ixodicidas de gran eficacia y aplicación práctica, hecho que llevó al propietario de la mascota a su empleo sistemático, sin diagnóstico ni asesoramiento de profesionales. Esto trajo como consecuencia, el desarrollo de poblaciones de garrapatas resistentes a los diferentes ixodicidas. Este problema se ha difundido por todo el mundo, dificultando aún más el control de la garrapata (FAO, 2004).

La resistencia a los ixodicidas es uno de los problemas mayores crecientes que amerita ser atendido, porque afecta competitivamente la salud del animal, limitando la reducción de las infestaciones. La resistencia se define como un cambio heredable en la susceptibilidad de una población de vectores, que se evidencia en las repetidas fallas de un producto para alcanzar los niveles de control esperados al ser usado de acuerdo con las recomendaciones de la etiqueta (Morberg,

1990). Para una mejor comprensión del fenómeno es necesario el monitoreo de la resistencia con el fin de seleccionar los ixodicidas de forma adecuada, y por ende alcanzar el éxito en el control.

Diferentes autores han medido la resistencia de *R. sanguineus* a los ixodicidas así en: Panamá hallaron resistencia al DDT, permetrina, coumafos, moderada resistencia al amitraz y susceptibilidad al fipronil (Miller *et al.*, 2001); en Brasil reportaron resistencia a la cipermetrina, deltametrina y al coumafos mientras que al fipronil hallaron susceptibilidad (Ferreira *et al.*, 2007); en Estados Unidos de América a la encontraron resistencia a la permetrina y tolerancia al fipronil (Eiden *et al.*, 2015). En Venezuela hasta la fecha no existen reportes de resistencia a ixodicidas, solo se cuenta con un solo trabajo de eficacia a los ixodicidas comerciales (Coronado & Mujica, 1998). Por lo que la presente investigación se planteó determinar el nivel de la resistencia de *R. sanguineus* a piretroides y fenilpirazolona por ser de uso frecuente en el control de las garrapatas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Poblaciones en estudio*

Se colectaron teleoginas manualmente siguiendo la técnica descrita por Thompsen & Shozo (1997) sobre caninos naturalmente infestados por *R. sanguineus* en peluquerías caninas de tres municipios del estado Aragua. Un total de cincuenta teleoginas fueron seleccionadas de cada parroquia (Tabla I).

### *Ixodicida y sinergista*

Piretroides: cipermetrina (73%) y fenil-pirazolonas: fipronil (97%), en presentación grado técnico sin valor comercial. Suministrados por la compañía Internacional de Insecticidas C.A. (INICA) y laboratorios REVEEX. Los ixodicidas fueron evaluados a las concentraciones siguientes: cipermetrina: 50 ppm, 40 ppm, 30 ppm y 20 ppm y fipronil: 10 ppm, (8 ppm concentración diagnóstica), 5 ppm, 2 ppm, 1 ppm y 0,8 ppm establecida por Castro-Janer *et al.* (2009), para *Rhipicephalus (boophilus) microplus* y el sinergista butóxido de piperonilo 1% establecida por Miller *et al.* (2001) para *R. sanguineus*. Todas las concentraciones se prepararon empleando como diluyente acetona al 10%.

Tabla I. Sitios de colectade teleoginas.

Municipios	Parroquias	Sitios de colecta	Georeferencias	Poblaciones
Girardot	Andrés Eloy Blanco	Barrio Santa Rosa	10.245900, -67.611473	A1
	Los Tacariguas	Urbanización Base Sucre	10.255212, -67.648144	A2
	Madre María de San José	La Cooperativa	10.267881, -67.581070	A3
Mario Briceño Iragorry	El Limón	El limón avenida Caracas	10.299304, -67.6302029	B1
		Universidad Central de Venezuela (UCV)	10.2751431, -67.6143215	B2
Francisco Linares Alcántara	La Morita	Morita	10.2159958, -67.5566013	C1

#### Prueba de inmersión de larvas

Siguiendo la técnica descrita por Shaw (1965), modificada. Se utilizaron larvas de *R. sanguineus* de 7 a 14 días sin alimentar. Los grupos tratados y el grupo control fueron conformados por cien individuos cada uno. Se procedió de la siguiente manera: se colocaron 2500 µL de cada concentración de ixodicida en una placa de Petri previamente identificada que contenía dos papeles de filtro Whatman número uno, posteriormente se colocaron las larvas en el medio de los papeles impregnados, seguidamente se sellaron los bordes del papel de filtro quedando las larvas dentro de los papeles y la cápsula de Petri fue sellada con tirro. Posteriormente se incubó en cámara húmeda a una temperatura  $27^{\circ}\text{C} \pm 1$  y humedad relativa  $80\% \pm 10$ , por un foto periodo de (12:12). Se realizaron tres réplicas del ensayo. Para la lectura se contó el número de larvas vivas y muertas empleando un microscopio estereoscópico y una aguja de disección. El criterio de mortalidad empleado fue la incapacidad de mover las patas al ser estimuladas con una aguja pasada las 24 horas de exposición al tratamiento.

El análisis de los resultados obtenidos en los bioensayos con ixodicidas, se realizó por el modelo estadístico de regresión y correlación lineal o simple, empleando el programa Probit (Raymond, 1985). Dicho análisis arrojó el porcentaje de mortalidad a diferentes concentraciones en 24 horas y estos datos fueron graficados en el programa Microsoft® Excel® arrojando una curva sigmoideal, para cada concentración de ixodicida y mezcla con sinergista, permitiendo obtener la línea base de susceptibilidad

de las garrapatas evaluados. Se determino factor de sinergismo y factor de resistencia.

Factor sinergismo: cuyo valor mayor a 1 es indicativo de sinergismo (Vassena *et al.*, 2000).

$$F_s = \frac{\text{CL50 de la mezcla ixodicida}}{\text{CL50 del ixodicida solo}}$$

Factor de resistencia: Para establecer el factor de resistencia (FR) se empleó el valor de la CL50 de lacepa susceptible (Mozo) del trabajo de Castro-Janer *et al.* (2009), que pertenece a la especie *R. (B.) microplus* para el ixodicida fipronil, por no contar en este estudio con una población susceptible para *R. sanguineus*, considerando válida su elección a nivel de género. Para la cipermetrina no se cuenta con un trabajo que contenga una CL50 de una población susceptible. Se determinó el FR con la siguiente fórmula:

$$FR = \frac{\text{CL50 población de campo}}{\text{CL50 población susceptible}}$$

En tal sentido, el criterio de los niveles de resistencia en las poblaciones de campo *R. sanguineus*, se clasificaron como: susceptibles (FR <1,4), resistentes nivel I (FR =1,5-5,0), resistentes nivel II (FR = 5,1-25,0), resistentes nivel III (FR = 26-40) y resistentes nivel IV (FR > 41) (Kumaret *al.*, 2011). Con base en lo señalado por FAO (2004), afirma que los resultados de la prueba de papel

impregnado (paquetes de larvas) son comparables con los obtenidos en la prueba de inmersión de larvas.

#### Pruebas bioquímicas

Para determinar *in vitro* resistencia metabólica se realizaron pruebas en placas para microtitulación. Estas consistieron en detectar la presencia de mecanismos de resistencia específicos en garrapatas que podrían aclarar posibles causas de la resistencia. Siguiendo el protocolo de Hemingway (1998), con algunas modificaciones, se emplearon larvas procedentes de diez teleóginas por lugar de colecta para que la prueba sea estadísticamente significativa. Se maceraron veinte larvas en cada vial con 200  $\mu$ L de agua destilada, posteriormente se centrifugaron a 1100 rpm en 15 min a 4°C, el sobrenadante se utilizó como fuente de enzima para los ensayos, se evaluaron cuatro sistemas enzimáticos que confieren resistencia a ixodicidas como: esterases alfa ( $\alpha$ ), esterasa beta ( $\beta$ ), oxidasas y glutatión S-transferasas (GST). A los valores de absorbancia se les aplicó estadística descriptiva, Análisis de Varianza

de una sola vía, no paramétrico de Kruskal Wallis a un nivel de significación del 95% ( $\alpha= 0,05$ ).

#### RESULTADOS

En la Fig. 1 se presenta el porcentaje de mortalidad de larvas de *R. sanguineus* expuestas a cipermetrina, encontrándose que las poblaciones con menor mortalidad a la concentración 50 ppm, fueron: A3 (12%), A1 (32%) y A2 (33%) y las poblaciones con el porcentaje más alto demortalidad correspondieron a las poblaciones B1 (90%), B2 (80%) y C1 (68%).

En la Fig. 2 se muestra el efecto sinérgico del butóxido de piperonilo (PB) con cipermetrina en larvas de la población A2 del municipio Girardot encontrando el FS = 1,97 quedando en evidencia la inhibición de la actividad enzimática de las oxidasas por el sinergista.

En la Tabla II se exhiben las concentraciones letales para la cipermetrina, resultando la concentración letal 50 (CL50) más elevada en las

**Fig. 1. Curva dosis respuesta en larvas de *R. sanguineus* expuestas a diferentes concentraciones de cipermetrina en seis poblaciones A1, A2, A3, B1, B2 y C1 del estado Aragua.**

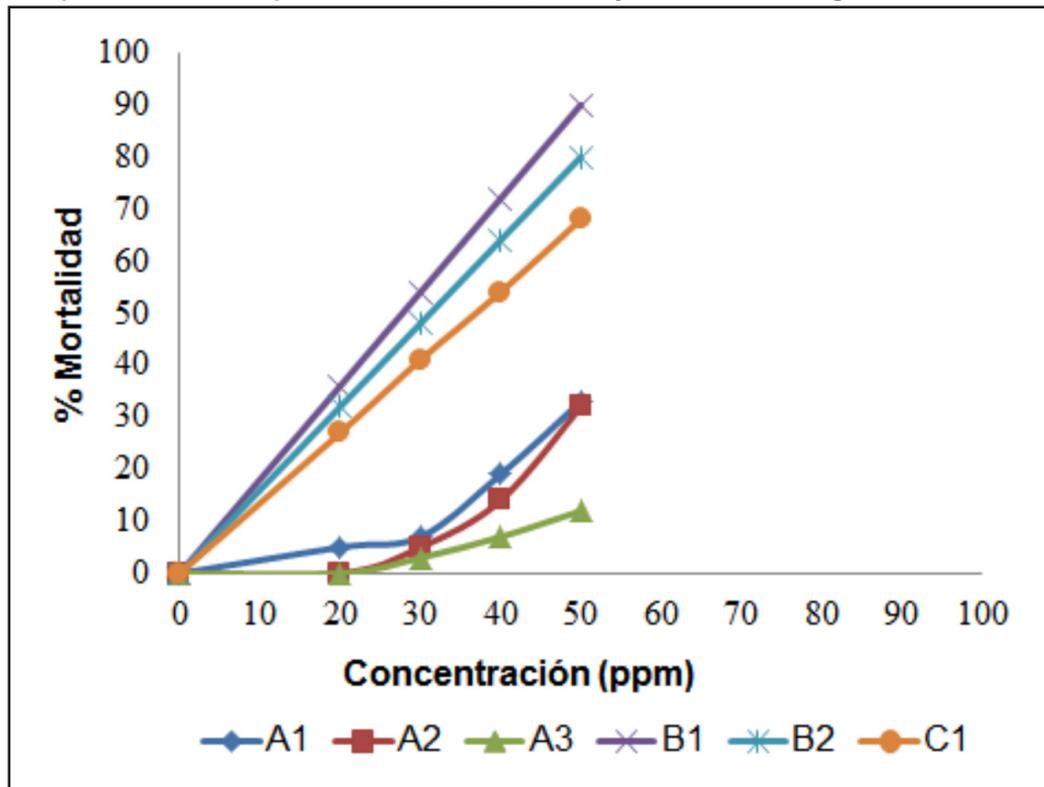


Fig. 2. Efecto sinérgico del butóxido de piperonilo (PB) con cipermetrina en la población A2 del estado Aragua.

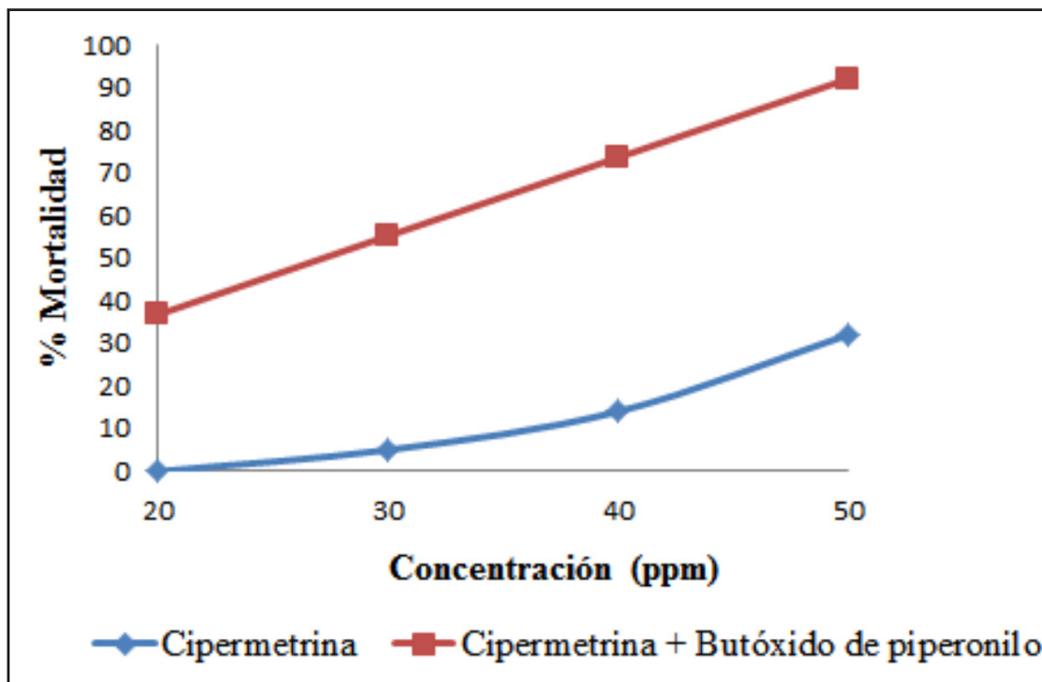


Tabla II. Concentraciones letales de cipermetrina en larvas de *R. sanguineus* de seis poblaciones del estado Aragua.

Poblaciones	CL50 (ppm) (IC 95%)	CL99 (ppm) (IC 95%)	$\chi^2$
A1	60,01 (50,3 -79,9)	110,92 (86,8-226,5)	1,52
A2 (ixodicida)	56,61 (52,4- 64,3)	91,57 (78,1 126,4)	1,20
A3	74,65 (63,1-124,4)	126,15 (95,4-279,5)	1,40
B1	29,04 (9,0-45,4)	65,65 (48,5-144,4)	7,22
B2	32,45 (32,5-54,9)	75,17 (53,4-253,4)	7,98
C1	37,32 (285,2-78,5)	86,94 (58,9 179,4)	8,32
A2 (mezcla de ixodicida-sinergista)	28,63 (-7,11- 43,83)	63,87 (47,63- 113,13)	7,0

$\chi^2$ : Chi cuadrado. CL50: concentración letal cincuenta, IC: Intervalos de confianza al 95%. CL99: concentración letal noventa y nueve. A1:barrio Santa Rosa. A2:urb. Base Sucre. A3:La Cooperativa. B1:av. Caracas. B2:UCV. 3A1: La Morita.

poblaciones A3 con el valor de Chi cuadrado 1,40. La población con menor CL50 fue B1 con el Chi cuadrado es 7,20. La concentración letal 99 (CL99) más elevada la obtuvieron las poblaciones A3 y A1. La población con menor CL99 fue B1. La población A2 expuesta a la mezcla de ixodicida-sinergista

presentó una disminución en los valores de la CL50 y la CL99 en comparación con los resultados obtenidos con el ixodicida.

En la Fig. 3 se expone la curva dosis respuesta de tres poblaciones de *R. sanguineus* expuestas a

Fig. 3. Curva dosis respuesta en larvas de *R. sanguineus* expuestas a diferentes concentraciones de fipronil.

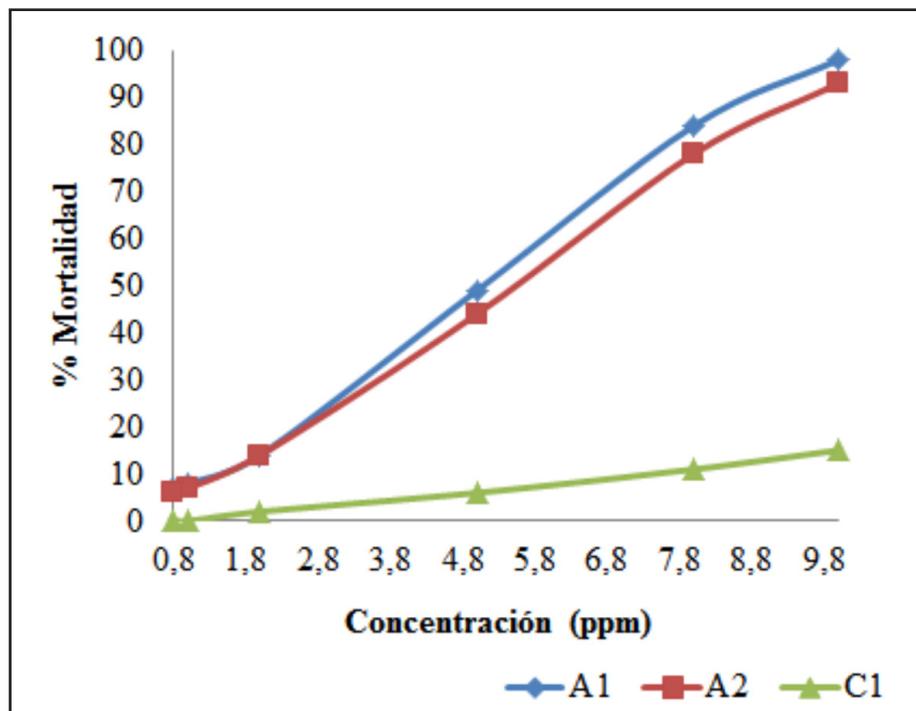


Tabla III. Concentraciones letales de fipronil en larvas de *R. sanguineus* de tres poblaciones del estado Aragua.

Poblaciones	CL50 (ppm) (IC 95%)	CL99 (ppm) (IC 95%)	$\chi^2$	FR	Nivel
A1	5,18 (4,4- 5,8)	11,69 (10,8-12,9)	4,16	6,16	II
A2	5,564 (4,8-6,2)	12,47 (11,5-13,8)	4,15	6,61	II
C1	15,621 (13,3-21,3)	29,49 (23,1-46,4)	4,38	18,59	II

$\chi^2$ : Chi cuadrado. CL50: concentración letal cincuenta. IC: Intervalos de confianza al 95%. CL99: concentración letal noventa y nueve. FR: factor de resistencia. Nivel de resistencia. A1: Barrio Santa Rosa. A2: Urb. Base Sucre. C1: La Morita.

fipronil. Resultando que para 8 ppm concentración diagnóstica en larvas determinada por Castro-Janer *et al.* (2009); la población que presentó el menor porcentaje de mortalidad fue C1 (11%), mientras que las poblaciones que presentaron los porcentajes más altos fueron A1 (84%) y A2 (78%).

En la Tabla III se evidencia las concentraciones letales para las poblaciones expuestas al fipronil. Se encontró que la población A1 presentó menores valores en las CL50 y CL99, por el contrario, la población C1 presentó valores más elevados para ambas concentraciones. Las tres

poblaciones de garrapatas obtuvieron factores de resistencia nivel II al fipronil.

En la Tabla IV se presentan los mecanismos de resistencia *in vitro* de larvas de *R. sanguineus* de seis poblaciones del estado Aragua, representado por los valores de la media y la desviación estándar, de cada población. El análisis de Kruskal Wallis demostró diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ), entre las poblaciones, donde los valores más elevados para las esterasas  $\alpha$  se encontraron en la población A1; para las esterasas  $\beta$  la población C1; para las proteínas las poblaciones A1, A2, B2 y C1;

**Tabla IV. Mecanismos de resistencia in vitro de larvas en siete poblaciones de *R. sanguineus* del estado Aragua**

Mecanismo	Poblaciones	P	F	$\bar{X}$ (Absorbanci)	SD
Esterasas $\alpha$	A1	0,000	8,35	1,6698 *A	0,5783
	A2	0,000	8,35	1,5227	0,3446
	A3	0,000	8,35	1,1602	0,4421
	B1	0,000	8,35	1,2579	0,5010
	B2	0,000	8,35	1,2702	0,3766
	C1	0,000	8,35	1,6211	0,3024
Esterasas $\beta$	A1	0,000	39,3	0,5802	0,2505
	A2	0,000	39,3	1,0467	0,2882
	A3	0,000	39,3	0,4390	0,2739
	B1	0,000	39,3	1,2805	0,5011
	B2	0,000	39,3	1,3445	0,3766
	C1	0,000	39,3	1,6423 *A	0,3416
Proteínas	A1	0,000	5,64	0,1230 *A	0,0288
	A2	0,000	5,64	0,1310 *A	0,0314
	A3	0,000	5,64	0,0834	0,0422
	B1	0,000	5,64	0,1128	0,0264
	B2	0,000	5,64	0,1108 *A	0,0476
	C1	0,000	5,64	0,1248 *A	0,0260
Oxidasas	A1	0,000	11,0	0,4618	0,2697
	A2	0,000	11,0	0,6138*A	0,4724
	A3	0,000	11,0	0,4826	0,2418
	B1	0,000	11,0	0,2815	0,1844
	B2	0,000	11,0	0,3138	0,2125
	C1	0,000	11,0	0,7638*A	0,4594
GST	A1	0,000	14,5	0,2245	0,0490
	A2	0,000	14,5	0,3292	0,0913
	A3	0,000	14,5	0,3286	0,1047
	B1	0,000	14,5	0,2942	0,0750
	B2	0,000	14,5	0,2263	0,0569
	C1	0,000	14,5	0,4002 *A	0,1789

\*A: Valores más elevados estadísticamente significativo ( $p < 0,05$ ), P: valor de p estadístico de Fisher.  $\bar{X}$ : media. SD: desviación estándar. A1: Barrio Santa Rosa. A2: Urb. Base Sucre. A3: La Cooperativa. B1: Av. Caracas. B2: UCV. C1: La Morita.

para las oxidasas las poblaciones A2 y C1; para la GST C1.

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se probaron concentraciones de cipermetrina donde se encontraron valores de sobrevivencia en larvas elevados, por lo

cual se presume el desarrollo del fenómeno de la resistencia en las poblaciones bajo estudio. El origen de esta resistencia pudiera ser el resultado de la alta presión de selección ejercida con cipermetrina en las medidas de control aplicadas en las infestaciones por *R. sanguineus*. La resistencia a la cipermetrina se encuentra ampliamente documentada a nivel mundial, por lo que estos resultados concuerdan con

los reportados por Roland *et al.* (2018) en Benin; Neelu *et al.* (2018) en la India reportaron resistencia nivel IV en *R. (B.) microplus*; Gajanan *et al.* (2017) en la India; Nandi *et al.* (2015) en la India, quienes demostraron resistencia a la cipermetrina en niveles I-II en *R. (B.) microplus*, igual que Singh & Rath (2014) en la India, encontraron factor de resistencia 1,48 a 11,22 en doce poblaciones; Fragoso y Soberanes (2001) en México y en Brasil con Baffi *et al.* (2007) y Ferreira *et al.* (2007); Guerrero & Nene (2008) en México encontraron resistencia a la cipermetrina en *R. sanguineus*. Los resultados difieren de los hallazgos de Bicalho *et al.* (2001) en Brasil, para *R. sanguineus* encontraron susceptibilidad a la cipermetrina.

Se demostró resistencia al fipronil nivel II, estos resultados concuerdan por los reportados en Uruguay por Castro-Janer *et al.* (2009), (2010) en ambos trabajos hallaron resistencia al fipronil en *R. (B.) microplus* con factor de resistencia de 5,36; estos reportes son importantes para este trabajo a nivel de género; Eiden *et al.* (2017), (2016), (2015) en estados Unidos, reportaron tolerancia al fipronil en *R. sanguineus*; Shyma *et al.* (2015) en la India, obtuvieron resistencia nivel I con factor de resistencia 2,36 en *R. (B.) microplus*. En contraste con la susceptibilidad encontrada en poblaciones de *R. sanguineus* por Miller *et al.* (2001) en Panamá y en Brasil con Ferreira *et al.* (2007) y Dantas (2008). El motivo de este resultado pudiera deberse a los errores en la frecuencia de aplicación del ixodicida donde no se consideran las fases no parasitarias de *R. sanguineus* y a la aplicación incorrecta del mismo, ejerciendo una presión de selección continua. Esta es la causa más común de la resistencia según FAO, (2004).

*R. sanguineus* tiene un ciclo de vida lento de aproximadamente 63 días y produce tres o cuatro generaciones al año, generando miles de descendientes aumentando la probabilidad de generar individuos que hereden el genotipo resistente, lo cual es particularmente común en este artrópodo (Peter *et al.*, 2005). La resistencia es generalmente reconocida como el primer fracaso de un medicamento para controlar el parasitismo (Sangster, 2001; Corley *et al.*, 2013).

En cuanto a los mecanismos de resistencia a ixodicidas en esta investigación, se demostró que la resistencia a la cipermetrina está dada por la

presencia de un mecanismo: detoxificación oxidativa a través de la multi función oxidasa, este se evidenció por el efecto sinérgico del butóxido de piperonilo a las concentraciones de cipermetrina y los valores elevados de las absorbancias en las oxidasas en las pruebas bioquímicas. Estos resultados concuerdan con los reportes de Ganan *et al.* (2018); Baffi *et al.* (2007) en Brasil; Guerrero & Nene (2008) en México y Díaz & Vallejo (2013) en Colombia, en *R. (B.) microplus* donde resultó que la resistencia a la cipermetrina esta mediada por la oxidasas, debido a la presencia de un polimorfismo en el gen Est9 codificante de la carboxilesterasas y sus alelos, relacionada con la resistencia a los piretroides, debido a una mutación puntual en este gen que es metabolizante para piretroides y organofosforados existen dos alelos que difieren entre sí por la sustitución de un nucleótido, guanina por adenina, en un punto específico de su ADN, configurando individuos con algún nivel de resistencia a los ixodicidas cuando se presenta el alelo con adenina el individuos es susceptibles.

En esta investigación no se encontró el mecanismo de detoxificación al fipronil. Hasta la fecha no existen estudios que señalen el mecanismo de detoxificación en la resistencia al fipronil (Janer *et al.*, 2009; Eiden *et al.*, 2015 a; Eiden *et al.*, 2018 b).

La resistencia a los ixodicidas tiene un impacto importante sobre la incidencia en las enfermedades causada por los agentes patógenos transmitidos por las garrapatas en caninos y humanos (Pérez *et al.*, 1996 a; Pérez *et al.*, 2006 b), debido al aumento de estas en los animales y en los lugares donde estos permanecen y por ende se incrementa las probabilidades de la transmisión de agentes patógenos. Es necesario que el control de las garrapatas éste acompañado del conocimiento de su ciclo biológico. Para evitar el uso excesivo e inadecuado de los ixodicidas, pueden dejar residuos en los tejidos, lo cual ocasiona problemas de salud en animales y humanos (Yamanda *et al.*, 2006).

## AGRADECIMIENTO

Queremos agradecer a la profesora Maribel Bravo y Juan Uzcategui de la Universidad Centroccidental "Lisandro Alvarado", a todo el personal del laboratorio de farmacología de la Universidad Central de Venezuela en especial al señor Santiago Alayon por todo sus aportes en

la realización de esta investigación y al Servicio Autónomo Instituto de Altos Estudios "Dr. Arnoldo Gabaldon", por el financiamiento.

## REFERENCIAS

- Alcaino H., Gorman T., Acosta P. & Fredes F. (1995). Evaluación de cinco esquemas de control con cipermetrina en *Rhipicephalus sanguineus* en la región metropolitana de Chile. *Arch. Med. Vet.* **27**: 45-51.
- Baffi M., Rocha G., Ueira C., Soares C., Ricardo L. & Bonetti A. (2007). Identification of point mutations in a putative carboxylesterases and their association with a acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Vet. Parasitol.* **148**: 301-309.
- Baffi A., de Sousa C., Ceron C. & Bonetti A. (2008). Esterase enzymes involved in pyrethroid and organophosphate resistance in a Brazilian population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari, Ixodidae). *Mole. And Bioch. Parasitol.* **160**: 70-73.
- Bicalho K. A., Ferreira F., Borges L. & Ribeiro M. (2001). Evaluación *in vitro* de los efectos de algunos estadios de vida de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae). *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* Documento en línea: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=3DSD010209352001000500006%26script=3Dsci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=3DSD010209352001000500006%26script=3Dsci_arttext) (Consulta: 2015, Marzo 11).
- Braz L. & Ferreira O. (2007). Seasonal dynamics of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in dogs from a police unit in Goiania, Goiás, Brazil. *Ccs. Rural.* **37**: 464 - 469.
- Castro-Janer E., Rifran L., Piaggio J., Gil A., Miller R. J. & Schumaker T. T. S. (2009). *In vitro* tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. *Vet. Parasit.* **162**: 120-128.
- Castro-Janer E., Rifran L., Piaggio J., Gil A., Miller R. J. & Schumaker T. T. S. (2010). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by *in vitro* bioassays. *Vet. Parasit.* **169**: 172-177.
- Corley S., Jonsson N., Piper E., Cutullé C., Stear M. & Seddon J. (2013). Mutation in the Rm\_AOR gene is associated with amitraz resistance in the cattle tick *Rhipicephalus microplus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **110**: 16772-16777.
- Coronado A. & Mujica F. (1998). Eficacia de diferentes acaricidas en el control de *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina: Ixodidae). *Bol. Dir. Malaria. y San. Amb.* **38**: 119-122.
- Dantas T. F. (2008). The brown dog tick *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille, 1806) (Acari: Ixodidae): from taxonomy to control. *Vet. Parasitol.* **152**: 173-185.
- Díaz E. & Vallejo G. (2013). Identificación de un polimorfismo del gen Est9 relacionado con resistencia a piretroides en *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. MVZ Córdoba.* **18**: 3708-3714.
- Demma L. J., Traeger M. S., Nicholson W. L., Paddock C. D., Blau D. M., Eremeeva M. E., et al. (2005). Mountain spotted fever from an unexpected tick vector in Arizona. *N. Engl. J. Med.* **353**: 587-594.
- Eiden A., Kaufman P., Faithm O., Allan S. & Miller R. (2015). Detection of permethrin Resistance and fipronil Tolerance in *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in the United States. *J. Med. Entomol.* 1-8.
- Eiden A., Kaufman P., Allan S. & Faith O. (2016). Establishing the discriminating concentration for permethrin and fipronil resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae), the brown dog tick. *Pest mang. Scie.* **72**: 1390-1395.
- Eiden A., Kaufman P., Oi FM., Dark M., Bloomquist J. & Miller R. (2017). Determination of metabolic resistance mechanisms in pyrethroid-resistant and fipronil-tolerant brown dog ticks. *Med. Vet. Entomol.* **31**: 243-251.
- Ferreira L., Fernández S., Nogueira I., Vieira V. & Cristina C. (2007). Resistencia acaricida en larvas de *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) de Goiânia-GO, Brasil. *Rev. de Patol. Tropical.* **36**: 87-95.

- Fragoso S. H. & Soberanes C. N. (2001). *Control de la resistencia a los ixodídeos a la luz de los conocimientos actuales*. Memorias de XXV Congreso Nacional de Buiatria. Veracruz. Asociación Mexicana de Médicos especialistas en Bovinos, A. C. Veracruz, México.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations FAO (2004). *Guidelines resistance management and integrated parasite control in ruminants*. 25-77 pp. Module 1 ticks: Acaricide resistance: Diagnosis, management and prevention. FAO, Rome.
- Gajanan M., Anil S., Sachin K., Ashutosh F., Sharath V., *et al.* (2017). Role of metabolic enzymes in conferring resistance to synthetic pyrethroids, organophosphates, and phenylpyrazole compounds in *Rhipicephalus microplus*. *Inter. J of acarol.* **44**: 28-34.
- Guerrero R. (1996). Las ixodídeos de Venezuela (Acarina: Ixodoidea). Listado de especies y claves para su identificación. *Bol. Dir. Mariol. San. Amb.* **36**: 1-19.
- Guerrero F. & Nene V. (2008). Gene structure and expression of a pyrethroids metabolizing esterase, CzEst9, from a pyrethroids resistant Mexican population of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *J. Med Entomol.* **45**: 677- 685.
- Guglielmone A., Bechara G., Szabó M. P. J., Barros-Battesti D. M., Faccini J. L. H., Labruna M. B., *et al.* (2004). Ticks of importance for domestic animals in Latin America and Caribbean countries. Printed on CD by the International Consortium on Ticks and Tick-borne Diseases-2 of the European Commission INCO-DEV programmed.
- Kumar S., Paul S., Sharma A. K., Kumar R., Tewari S. S., Chaudhuri P., *et al.* (2011). Diazinon resistant status in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* collected from different agroclimatic zones of India. *Vet. Parasitol.* **181**: 274-281.
- Hemingway J. (1998). *Techniques to detect insecticide resistance mechanism (field and laboratory manual)*. documento en línea. WHO/CTD/CPC/MAL/98.6. World Health Organization, Geneva. (Consulta: 2016 Diciembre 10).
- Miller R., George J., Guerrero F., Carpenter L. & Welch J. (2001). Characterization of acaricide resistance in *Rhipicephalus sanguineus* (Latreille) (Acari: Ixodidae) collected from the Corozal Army Veterinary Quarantine Center, Panamá. *J. Med. Entomol.* **38**: 298-302.
- Mencke N. (2005). *Vector borne diseases: Importance of ticks and tick\_borne diseases in dogs and humans*. Disponible en línea: [http://www.simposiobayer.com.mx/index.php?art\\_id=22&categ=16&expand=10/16&10file=view\\_article.tp](http://www.simposiobayer.com.mx/index.php?art_id=22&categ=16&expand=10/16&10file=view_article.tp) (Consulta: 2015 febrero 1).
- Morberg W. (1990). Understanding and combating agrochemical resistance. In: Management resistance to agrochemicals; Green, M.N., Lebaron, H. M. W. K. Morelos. México. Pp. 4-20.
- Nandi A., Jyoti-Singh H. & Singh N. K. (2015). Esterase and glutathione S-transferase levels associated with synthetic pyrethroid resistance in *Hyalomma anatolicum* and *Rhipicephalus microplus* ticks from Punjab, India. *Exp. Appl. Acarol.* **66**: 141-157
- OMS (1998). *Classification of Pesticides by Hazard 1998-1999*. International Programme on Chemical Safety, WHO/IPCS/98.21.
- Peter R., Van den Bossche P., Penzhorn & Sharp B. (2005). Tick, fly and mosquito lessons from the past, solutions for the future. *Vet. Parasitol.* **132**: 205-208.
- Pérez M., Bodor M., Zhang C., Xiong Q. & Rikihisa Y. (2006). Human infection with *Ehrlichia canis* accompanied by clinical signs in Venezuela. *Ann. N Y. Acad. Sci.* 110-117.
- Pérez M., Rikihisa Y. & Wen B. (1996). *Ehrlichia canis*-like agent isolated from a man in Venezuela: antigenic and genetic characterization. *J. Clin. Microbiol.* **34**: 2133-2139.
- Quiroz H., Figueroa J., Ibarra F. & López M. (2011). *Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos* (Ed.). Pp 767-773. Trillas, México.

- Raymond M. (1985). Présentation d' un programme basic d' analyse log probit pour micro- ordinateur cahiers O. R. S. T. O. M., ser. *Entomol. Med. Parasitol.* **22**: 117-121.
- Roland Y., Yao A., Razaki O., Camus A., Rudi C., Martin A. & Show A. (2018). Molecular characterization of pyrethroids resistance mechanisms in field populations of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in district of Kpinnou and Opkara, Benin. *Inter. J of acarol.* **44**: 198-203.
- Sangster N. C. (2001). Managing parasiticide resistance. *Vet. Parasitol.* **98**: 89-109.
- Sharma N., Singh V., Shyma K., Solanki V., & Prakash J. (2018). Comparative resistance status of *Hyalomma anatolicum* and *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks against Synthetic Pyrethroids (deltamethrin and cypermethrin) from Banaskantha, Gujarat, India. **44**: 268-275.
- Shaw R. (1966). Culture of an organophosphate-resistant strain of *Boophilus microplus* (Can.) and an assessment of its resistance spectrum. *Bull. Entomol. Res.* **56**: 398-405.
- Shyma K. P., Gupta J., Singh. V. & Patel K. K. (2015). *In vitro* Detection of Acaricidal Resistance Status of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* against commercial preparation of deltamethrin, flumethrin, and fipronil from North Gujarat, India. *J. Parasitol. Res.* 1-7.
- Singh N. & Rath S. (2014). Esterase mediated resistance against synthetic pyrethroids in field populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) in Punjab districts of India. *Vet. Parasitol.* **204**: 330-338.
- Thompson D. & Shozo L. (1997). Estudio de polimorfismo de tamaño de fragmentos de restricción (RFLP) No DNA do carrapato de bovinos *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Arq. Fac. Vet. UFRGS. Porto Alegre.* **25**: 99-100.
- Vassena C. & Picollo M. (2000). Insecticide resistance in Brazilian triatomine infestans and Venezuelan *Rhodnius prolixus*. *M. and Vet. Entomol.* **14**: 51-55.
- Walker J., Keirans J. & Horak I. (2000). *The genus Rhipicephalus (Acari: Ixodidae): a guide to the brown ticks of the world*. Cambridge University Press: Cambridge, 655Pp.
- Yamada R. M., Kosono T., Ohmori F., Morimatsu 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**: 54-65.

Recibido el 21/06/2019  
Aceptado el 16/08/2019