

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES
MAESTRÍA EN SALUD Y PRODUCCIÓN ANIMAL SUSTENTABLE

**Determinación del grado de infección por *Babesia bigemina* en garrapatas
Rhipicephalus microplus resistentes y susceptibles a ivermectina.**

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de Maestro en Salud y
Producción Animal Sustentable

Presenta

MVZ. José Rodrigo Morales García.

Dirigido por

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito.

Asesores

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú

Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón.

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez.

Dr. Rubén Hernández Ortiz.

Querétaro, Querétaro.
Diciembre 2018.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable

Determinación del grado de infección por *Babesia bigemina* en garrapatas
Rhipicephalus microplus resistentes y susceptibles a ivermectina.

TESIS

Como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Salud y Producción Animal Sustentable

Presenta:


MVZ. José Rodrigo Morales García

Dirigido por:

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito

SINODALES

Dr. Juan Joel Mosqueda Gualito.
Presidente


Firma

Dra. Gabriela Aguilar Tipacamú
Secretario


Firma

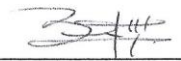
Dr. Germinal Jorge Cantó Alarcón
Vocal


Firma

Dra. Bertha Isabel Carvajal Gámez
Vocal


Firma

Dr. Rubén Hernández Ortiz.
Vocal


Firma
Dra. Juana Elizabet Elton Puente
Directora de la Facultad
de Ciencias Naturales
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña.
Directora de Investigación y Posgrado

Campus Juriquilla,
Querétaro, Qro.
Diciembre, 2018
México.

RESUMEN.

La babesiosis bovina es una enfermedad que afecta al ganado bovino, es transmitida por garrapatas y es causada por parásitos protozoarios del género *Babesia*. La enfermedad se encuentra distribuida ampliamente en países con climas tropicales y subtropicales se caracteriza por ocasionar lisis eritrocítica que ocasiona anemia, ictericia, hemoglobinuria e incluso la muerte, el vector transmisor de *Babesia* más importante es la garrapata *Rhipicephalus microplus*, que es una plaga endémica de ganado y que causa pérdidas económicas en la ganadería. Los acaricidas químicos han desempeñado un papel fundamental en el control de *R. microplus*, sin embargo, como consecuencia de su uso extensivo, esta especie ha desarrollado resistencia a todas las clases principales de acaricidas. Actualmente las ivermectinas son cada vez más utilizadas para el control de garrapatas y como parasiticidas en general; su sitio de acción es el canal de cloro, el cual se encuentra presente en las células musculares y nerviosas de los invertebrados, pero aun los mecanismos que participan molecularmente no se han establecido. La presencia de estos vectores, los patógenos y la aparición de resistencia a los acaricidas, tiene un alto impacto en la epidemiología de las enfermedades transmitidas. A la fecha se desconoce si la capacidad vectorial de garrapatas *Rhipicephalus microplus* resistentes a ivermectina es distinta a la de las poblaciones susceptibles por lo que en el presente trabajo se obtuvo una cepa resistente a ivermectina de *R. microplus* con un I.R de 2.4 a partir de una cepa susceptible Media Joya, ambas cepas fueron infectadas con *B. bigemina* y se obtuvo una diferencia estadística en cuanto disminución en la cepa resistente en comparación con la susceptible, en el peso de las garrapatas (2.60%), ovoposición (10.06%), reducción de fertilidad en huevos (23.29%) y efecto de la resistencia (51%) lo que sugiere que la resistencia tiene un efecto negativo en la tasa de reproducción exitosa de la garrapata, se analizó el grado de infección por *B. bigemina* en larvas de la cepa resistente y susceptible y no mostró diferencia significativa.

Palabras Clave: *Babesia*, Resistencia, Ivermectina, Garrapata.

SUMMARY

Bovine babesiosis is a disease that affects cattle, is transmitted by ticks and is caused by protozoan parasites of the genus *Babesia*. The disease is widely distributed in countries with tropical and subtropical climates and is characterized by erythrocytic lysis that will cause anemia, jaundice, haemoglobinuria and even death, the most important transmitting vector of *Babesia* is the tick *Rhipicephalus microplus*, which is an endemic pest of cattle and that causes economic losses in livestock. The chemical acaricides have played a fundamental role in the control of *R. microplus*, however, as a consequence of its extensive use, this species has developed resistance to all the major classes of acaricides.

Currently, ivermectins are increasingly used for the control of ticks and as parasiticides in general; its site of action is the chlorine channel, which is present in the muscle and nerve cells of invertebrates, but even the mechanisms that participate molecularly have not been established. The presence of the vectors, the pathogens and the emergence of resistance to acaricides, has a high impact on the epidemiology of transmitted diseases. To date, it is unknown whether the vector capacity of *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin ticks is different from that of susceptible populations, so in the present work an ivermectin-resistant strain of *R. microplus* was obtained with an I.R of 2.4 from a susceptible Media Joya strain, both strains were infected with *B. bigemina* and a statistical difference was obtained as a decrease in the resistant strain compared to the susceptible one in the weight of the ticks (2.60%), oviposition (10.06%), reduction of fertility in eggs (23.29%) and effect of the resistance (51%) which suggests that the resistance has a negative effect on the fitness of the tick, the degree of infection by *B. bigemina* in larvae of the resistant and susceptible strain was analyzed and it was not shown significant difference

Keys Word: Babesia, Resistance, Ivermectin, Tick.

DEDICATORIAS.

A mis padres Pablo Morales y María García por estar siempre apoyándome, alentándome e impulsándome en la vida, gracias a ellos tengo la oportunidad de seguir estudiando y superarme día con día.

A mis hermanos que en conjunto nos apoyamos para poder enfrentar situaciones difíciles y poder terminar de estudiar.

A mis amigos que en lo personal son pocos, pero gracias a ellos pude encontrar apoyo tanto en lo académico como en la vida personal, el cual es vital para poder seguir con los retos académicos. Nerina Veyna, Dulce Verdugo y Diego Josimar que durante el posgrado pude compartir experiencias académicas y personales y fueron un pilar de apoyo y conocimiento importante.

Al doctor Juan Mosqueda le agradezco el apoyo que me ha brindado desde la licenciatura y ahora el posgrado, gracias por orientarme académicamente y ayudarme a enfrentar los retos profesionales, los consejos y regaños que me han ayudado.

AGRADECIMIENTOS.

A mi comité tutorial cada uno fue de vital importancia para poder sacar el proyecto adelante. El doctor Mosqueda como director de tesis del cual surgió la idea de la investigación y estuvo atento en el desarrollo y financiamiento del mismo y guiándome en el proceso, a la doctora Gabriela Aguilar por la confianza brindada y aportar financiamiento y material de su proyecto en conjunto de resistencia, al doctor Germinal Canto gracias por sus consejos y por estar al pendiente del desarrollo del proyecto, y la motivación a desarrollar nuevas ideas y puntos de vista, la doctora Bertha Carbajal gracias por su apoyo en poder procesar los resultados y analizarlos y al doctor Rubén Hernández gracias por su apoyo en conocimientos e ideas al trabajar en el área de resistencia, su experiencia en el tema de investigación fue de mucha ayuda.

Debo agradecer al equipo del laboratorio que tuve, donde se logró establecer una actitud de compañerismo y colaboración en las actividades, su experiencia y apoyo fue importante.

A la doctora Minerva y al doctor Max de la UACM por ayudarme con las pruebas de PCR en tiempo real.

A la Universidad Autónoma de Querétaro por ser una institución de calidad en la cual pude desarrollar mi nivel académico y profesional.

Al CONACYT por otorgarme la beca durante el curso de mi maestría.

Al CONACYT Ciencia Básica por el financiamiento para presionar y hacer una cepa resistente.

ÍNDICE

	Página
Resumen	i
Summary	ii
Dedicatorias	iii
Agradecimientos	iv
Índice	v
Índice de cuadros	vii
Índice de figuras	viii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISION DE LITERATURA	3
2.1 Garrapata <i>R.microplus</i>	3
2.1.1 Importancia Económica	4
2.1.2 Distribución geográfica	5
2.1.3 Ciclo de vida	7
2.2 Babesiosis bovina	8
2.2.1 Distribución geográfica	9
2.2.2 Ciclo de vida	10
2.2.3 Signos de la babesiosis bovina	12
2.2.4 Diagnóstico	14
2.3 Resistencia	15
2.3.1 Efecto de la resistencia a ivermectina en la malaria	15
III. OBJETIVOS	16
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	17
4.1 Prueba de inmersión de larvas modificadas (ivermectina)	18
4.2 Infección de <i>B. bigemina</i> en larvas resistentes y susceptibles a ivermectina.	20

4.3 Diagnóstico de <i>B. bigemina</i> .	20
4.4 Colecta de garrapatas	20
4.5 Peso de huevos	20
4.6 Conteo de larvas	20
4.7 Extracción de DNA	20
4.8 Cuantificación de <i>Babesia bigemina</i> por PCR en tiempo real (qRT- PCR)	21
4.9 Análisis estadísticos	21
4.10 Análisis de efectos de resistencia a ivermectina	21
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	23
5.1 Presión de la cepa <i>R. microplus</i> susceptible a ivermectina	24
5.2 Infección con <i>B. bigemina</i> en garrapatas <i>R. microplus</i> resistentes y susceptibles a ivermectina.	28
5.3 Análisis estadísticos	28
5.3.1 Número de garrapatas	29
5.3.2 Peso de garrapatas	30
5.3.3 Ovoposición	30
5.3.4 Fertilidad en huevos y efecto de la resistencia	31
5.4 Extracción de DNA	33
5.5 qRT-PCR de larvas	34
VI. CONCLUSIÓN	35
VII.LITERATURA CITADA	36
V III Apéndice	40

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página.
1	Taxonomía de <i>R.microplus</i> .	3
2	Resultados del conteo del primer bioensayo cepa media joya susceptible con 21 días de edad al 28 de diciembre del 2016.	24
3	Resultados conteo del bioensayo primera generación 14 días de edad al 10 abril del 2017.	25
4	Resultados del conteo del bioensayo segunda generación con 14 días de edad al 5 de agosto del 2017.	25
5	Resultados del conteo del bioensayo tercera generación con 14 días de edad al 28 de octubre del 2017.	26
6	Resultados del conteo del bioensayo cuarta generación con 14 días de edad al 2 de febrero del 2018.	26
7	Índices de resistencia de las generaciones obtenidas.	27
8	Monitoreo de parasitemia en el bovino.	28
9	Análisis ANOVA de los valores de CT obtenidos.	34
10	Valores de CT entre la cepa de <i>R. microplus</i> resistente y susceptible infectadas con <i>B. bigemina</i> .	34

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página.
1	Situación actual del control de la garrapata <i>Rhipicephalus (Boophilus) spp.</i>	6
2	Ciclo biológico de la garrapata <i>Rhipicephalus microplus.</i>	7
3	Distribución de la prevalencia de <i>B. bigemina</i> en hatos muestreados de las cuencas lecheras en México.	9
4	Ciclo biológico de <i>B. bovis.</i>	10
5	Número total de garrapatas colectadas de la cepa de <i>R. microplus</i> resistente y susceptible a ivermectina infectada con <i>B. bigemina.</i>	29
6	Peso total de garrapatas colectadas de la cepa de <i>R. microplus</i> resistente y susceptible a ivermectina infectada con <i>B. bigemina.</i>	30
7	Ovoposición de la cepa de <i>R. microplus</i> resistente y susceptible a ivermectina infectada con <i>B. bigemina.</i>	31
8	Número de larvas de la cepa de <i>R. microplus</i> resistente y susceptible a ivermectina infectada con <i>B. bigemina.</i>	32
9	Número de huevos de la cepa de <i>R. microplus</i> resistente y susceptible a ivermectina infectada con <i>B. bigemina.</i>	33
10	Gel de integridad de DNA de larvas	34
11	Parasitemia entre cepas de <i>R. microplus</i> resistentes y susceptibles a ivermectina.	35

I. INTRODUCCIÓN

Rhipicephalus microplus (*R. microplus*) es una garrapata endémica del ganado en las regiones tropicales y subtropicales del mundo que causa grandes pérdidas económicas a los productores de ganado. El uso de acaricidas químicos han desempeñado un papel fundamental en el control de *R. microplus*; sin embargo, como consecuencia de su uso extensivo, esta especie ha desarrollado resistencia a todas las clases principales de acaricidas en todo el mundo (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012).

La resistencia de las garrapatas a los acaricidas es principalmente debido al incremento de uso de todas las familias de los ixodicidas. Metabólicamente aún no se han descrito los aspectos moleculares de la resistencia en *R. microplus*, pero la resistencia metabólica hacia estos productos generalmente se les atribuye a enzimas como el citocromo P450 (P450), a las esterasas y al glutatión S-transferasas (GST) (Bellgard *et al.*, 2012).

Se han llevado a cabo estudios de bioensayos y sinergistas para proporcionar evidencia sobre los mecanismos de resistencia a los organofosforados y carbamatos, sin lograr identificar mecanismos específicos, por lo que se ha dicho que la resistencia a estos compuestos puede ser compleja y multigénica (Guerrero *et al.*, 2012).

Se sabe muy poco acerca de los mecanismos involucrados en la resistencia al amitraz, fipronil y a las ivermectinas. Las ivermectinas son cada vez más utilizadas para el control de garrapatas y como parasiticidas en general; su sitio de acción es el canal de cloro dependiente de glutamato el cual se encuentra presente en las células musculares y nerviosas de los invertebrados. Existen reportes sobre la resistencia a ivermectina en la cucaracha común (*Blattella germanica*), la polilla de la col (*Plutella xylostella*) y el escarabajo de la papa (*Leptinotarsa decemlineata*) atribuyendo la resistencia al aumento del metabolismo oxidativo por P450s, conjugados por GST y esterasas (Guerrero *et al.*, 2012).

La resistencia a ivermectina ha sido reportada en Brasil (Klafke *et al.*, 2010) y en México, (Pérez-Cogollo *et al.* 2010), estos últimos reportados por primera vez la resistencia a ivermectinas en cepas de campo en el estado de Yucatán, pero aun los mecanismos que participan molecularmente no se han establecido.

Las enfermedades emergentes y reemergentes son importantes, ya que constituyen uno de los problemas de salud que más interés ha despertado en diferentes países, y muchas de ellas son consideradas catástrofes nacionales por la alta morbilidad que generan, además del costo que éstos representan desde el punto de vista económico para el país (Riverón, 2002).

Actualmente los cambios climáticos han influido sobre la distribución temporal y espacial de las enfermedades, así como la dinámica estacional e interanual de patógenos, vectores, hospederos y reservorios. Ante estos cambios, la epidemiología de enfermedades como la babesiosis, anaplasmosis y ehrlichiosis transmitidas por ixodidos han modificado su distribución geográfica, incidencia y patogenicidad (Rodríguez *et al.*, 2013).

La babesiosis bovina es una enfermedad que se presenta en el ganado bovino, es transmitida por garrapatas y es causada por parásitos protozoarios *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* entre otras. La enfermedad se encuentra distribuida ampliamente en países con climas tropicales y subtropicales donde se encuentran los vectores como son *Ixodes ricinus* y *Rhipicephalus* spp. Es un protozooario del género *Babesia*, orden Piroplasmida, Phylum Apicomplexa. El vector de *Babesia bovis* y *B. bigemina* son las garrapatas del genero *R. microplus* (OIE, 2004). La babesiosis bovina se caracteriza por ocasionar lisis eritrocítica que provoca en los bovinos anemia, ictericia, hemoglobinuria y hasta la muerte. Las pérdidas económicas que causa en la ganadería son significativas, ya que provocan una disminución en la producción del ganado y tiene una mortalidad variable dependiendo de la especie y cepa del parásito (Bravo, 2012).

II. REVISION DE LITERATURA.

2.1 Garrapata *R.microplus*

Rhipicephalus microplus es una plaga endémica de ganado en las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012). Es denominada como “Garrapata Común del Ganado”, se considera el género de mayor importancia en el ámbito veterinario por su impacto en la salud bovina, debido a su papel como vector de hemoparásitos como *Babesia* spp. (Cortéz *et al.*, 2010).

Se clasifica taxonómicamente de la siguiente manera (Cordero de Campillo *et al.*, 1999):

Cuadro 1: Clasificación taxonómica de *R. microplus*

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	
Reino	Animal
Phylum	Artropoda
Sub-Phylum	Chelicera
Clase	Aracnida
Grupo	Parasitiforme
Orden	Acarina
Sub-orden	Ixodoidea (garrapatas duras)
Familia	Ixodidae
Género.	<i>Rhipicephalus</i>

R. microplus (anteriormente conocida como *Boophilus microplus*) es considerada la garrapata más importante del ganado bovino a nivel mundial. Es una garrapata dura que se puede encontrar en diferentes especies como bovinos, búfalos, así como algunos animales silvestres. Una alta carga de garrapatas en los animales puede disminuir la producción y dañar los cueros. *R. microplus* también puede transmitir la babesiosis causada por los parásitos protozoarios *B. bigemina* y *B. bovis* y la anaplasmosis causada por *Anaplasma marginale*. Se ha logrado

erradicar en EE.UU., pero esporádicamente se puede encontrar en Texas o California en la zona de cuarentena que sirve como área de amortiguamiento en la frontera con México (CFSPH, 2007).

La garrapata *R. microplus* que es originaria de la India, fue introducida en América junto con el ganado traído por los conquistadores en siglo XVI al XVIII. Posteriormente el ganado se expandió rápidamente por toda América y encontró un ambiente favorable para su desarrollo en casi todas las regiones ganaderas del mundo ubicadas dentro de zonas templadas, subtropicales y tropicales (Cetra, 2001).

Las mordeduras por garrapata causan un daño directamente a animales, causando irritación, inflamación o hipersensibilidad, y cuando se presentan las garrapatas en gran cantidad hay anemia y pérdidas en la producción. Los métodos actuales para su control implican el uso de métodos químicos y no químicos, y la aplicación sistemática de dos o más métodos (manejo integrado de garrapatas). El desarrollo de resistencia en artrópodos depende de la frecuencia de aplicación de los insecticidas, así como ciclos de vida de los insectos (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012).

2.1.1 Importancia Económica.

A nivel mundial las pérdidas económicas causadas por la garrapata del género *Rhipicephalus* y las enfermedades que transmiten en el ganado bovino se estiman entre 13.9 y los 18.7 billones de dólares por año. En México el 40% del territorio nacional lo cubren pastizales los cuales son aprovechados para criar el ganado principalmente bovinos de carne y doble propósito esto en sistemas de producción extensivos, las condiciones de estos pastizales que favorecen la producción, desafortunadamente también propicia el desarrollo de las garrapatas entre ellas *R. microplus* la cual constituye un obstáculo en el desarrollo de la industria pecuaria (Quiroz *et al.*, 2011).

Cerca de mil millones de cabezas de ganado que se encuentran en los trópicos, están expuestos a diferentes especies de garrapatas, así como enfermedades que transmiten. Entre los efectos más importantes que producen las garrapatas al ganado bovino destacan la disminución en el consumo de alimento, pérdida de peso, anemias, irritación por picaduras y depreciación de las pieles afectadas. Esto da como consecuencia enfermedades agudas, crónicas o incluso, la muerte de los animales. Un bovino parasitado por garrapatas del género *Rhipicephalus* pierde peso a un cálculo de 0.26 kg/garrapata/año, lo que representa pérdidas de varios miles de millones de dólares en la economía pecuaria mundial (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012).

Las pérdidas atribuibles a las garrapatas son causadas, ya sea directamente a través de la irritabilidad del animal, la pérdida de sangre, los daños a los cueros y las ubres, la inyección de toxinas, o a través de la mortalidad causada por las enfermedades transmitidas o asociadas con las garrapatas. La suma del impacto económico de las garrapatas y las enfermedades que transmiten se expresa en pérdidas en gramos de peso vivo (g p.v) de los bovinos afectados y en la producción de leche. Se estima una pérdida de 0,7 g p.v / garrapata y en términos del total de pérdida económica promedio (incluyendo pérdidas de producción más gastos de control) por animal por año, se estima unos 7,3 USD /animal/ año. Se estima que el 80 % del ganado bovino del mundo está infestado con garrapatas, y esto provoca pérdidas de 2000 a 3000 millones de USD, hay regiones del mundo donde la industria ganadera no ha podido establecerse debido al problema de las garrapatas y las enfermedades asociadas (FAO, 2004).

2.1.2 Distribución geográfica.

La garrapata *R. microplus*, es originaria del continente asiático de la Isla de Java, pudo ser introducida en la mayoría de los países tropicales y subtropicales a través de la importación de ganado. Tiene una distribución mundial. Esta especie está distribuida desde el norte de Argentina hasta México, incluyendo las islas del Caribe y las Antillas (Pereira y Labruna, 2008).

La distribución y la situación actual de control en México se observa en la figura 1, la superficie libre comprende 599,367.84 km², 30.60% del territorio nacional, en erradicación abarca 67,472.76 km², el 3.44%, y en control comprende 1, 292, 407.02 km², el 65.96% del territorio nacional. Se reconoce a los estados de Sonora, Tlaxcala, Aguascalientes, Baja California y Chihuahua (con excepción de los municipios de Morelos y Guadalupe y Calvo) y el Norte de Baja California Sur como libres del ectoparásito. En fase de erradicación se encuentran los Municipios de Los Cabos y la parte sur de La Paz en Baja California Sur; los municipios de Ahome, El Fuerte y Choix en el norte de Sinaloa, en su margen derecha del río El Fuerte; los municipios de la zona Desierto del estado de Coahuila: Cuatro Ciénegas, Ocampo y Sierra Mojada.

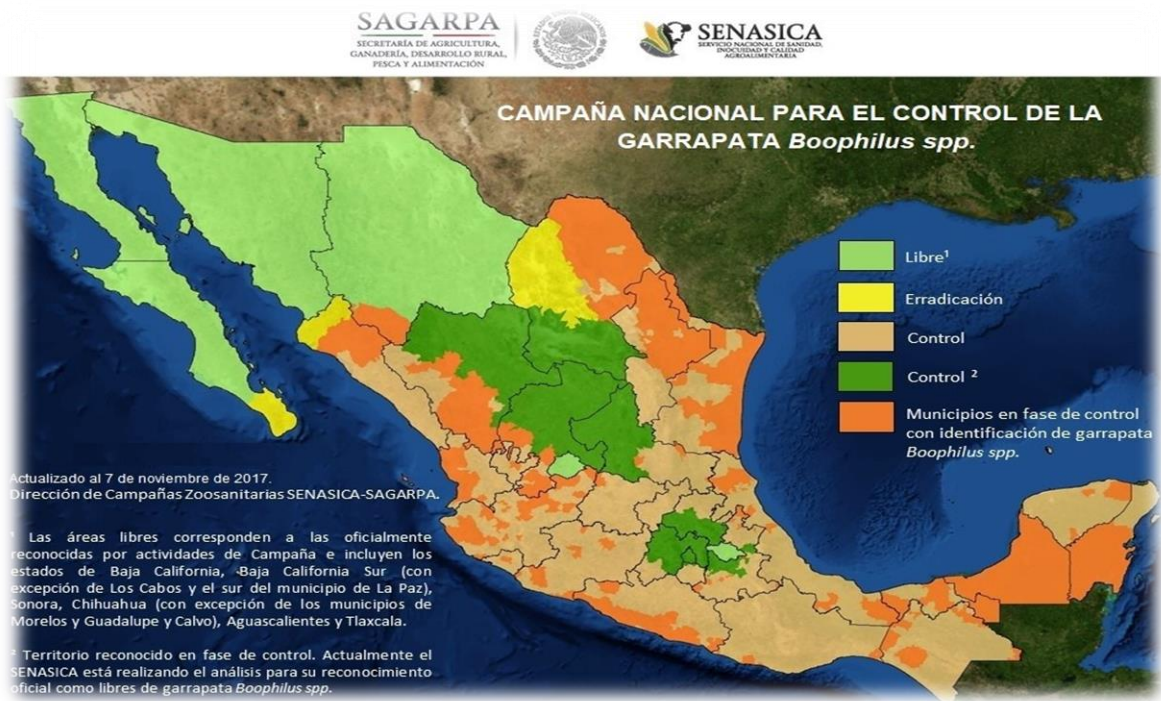


Figura 1: Situación actual del control de la garrapata *Boophilus spp.* (SENASICA, 2017).

2.1.3 Ciclo de vida.

El ciclo biológico de *R. microplus* (Figura 2) cuenta de dos fases una fuera del hospedador (huevo, larvas) y otra dentro del hospedador o de forma parasitaria (larva, ninfa y adulta teleogina).

- Primero las larvas están esperando en el suelo en el pasto al hospedador.
- Suben al bovino se alimentan de sangre y mudan a ninfas a los 8 días.
- Las ninfas se alimentan y mudan a los 4 días a adultos gonandros (machos) y hembras (parteneoginas).
- Los machos buscan a las hembras y se aparean.
- Las adultas se alimentan por 12 días hasta repletarse y se sueltan para caer al suelo.
- En el suelo las hembras repletas ovopositan y después mueren.

El ciclo de vida parásita dura de 20-23 días este va depender de la temperatura del ambiente y la humedad pudiéndose extender más días. Las hembras repletas una vez en el suelo pueden poner de 3000 a 4000 huevos, el pico máximo de ovoposición se alcanza a los 5 días y posteriormente disminuye progresivamente, al día 13 se alcanza el 90% de la ovoposición total, la incubación y eclosión de estos puede durar de 30 a 33 días (Cetrá, 2001; Quiroz *et al.*, 2011; León-Clavijo y Hernández-Rojas, 2012).



Figura 2: Ciclo biológico de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Quiroz *et al.*, 2012).

2.2 Babesiosis bovina.

La babesiosis es una enfermedad que se presenta en el ganado bovino, es transmitida por garrapatas y es causada por parásitos protozoarios *Babesia bovis*, *B. bigemina*, *B. divergens* entre otras. La enfermedad se encuentra distribuida

ampliamente en países con climas tropicales y subtropicales donde se encuentran los vectores como son *Ixodes ricinus* y *Rhipicephalus* spp. Es un protozoo del género *Babesia*, orden Piroplasmida, Phylum Apicomplexa. El vector de *Babesia bovis* y *B. bigemina* son las garrapatas del género *R. microplus* (OIE, 2004). La babesiosis bovina se caracteriza por ocasionar lisis eritrocítica que nos va ocasionar anemia, ictericia, hemoglobinuria y hasta la muerte. Las pérdidas económicas que causa en la ganadería son significativas, ya que provocan una disminución en la producción del ganado y tiene una mortalidad variable dependiendo de la especie y cepa del parásito (Bravo, 2012).

Como antecedentes, la babesiosis fue reportada por primera vez en Rumania en el año de 1888, Víctor Babes, al estudiar una enfermedad en el ganado bovino de esta región vio presencia de brotes y observó también sangre en la orina. Describió microorganismos similares a cocos en pares, en el interior de los eritrocitos y al teñirlos con violeta de genciana pudo apreciar que estaban en forma de pera y sostenidos por un filamento en la región angular entre ambos. Se le identificó en aquel entonces como una bacteria que causaba la enfermedad y se le denominó *Haematococcus bovis* (Babes, 1888).

Datos obtenidos en 1990 ya estimaban que cerca de 300 millones de bovinos a nivel mundial corrían riesgo de infectarse con *B. bovis* y *B. bigemina* reflejando el impacto económico que la babesiosis tenía en la ganadería (Wright, 1990).

2.2.1 Distribución geográfica.

Babesia se encuentra ampliamente distribuida en el ganado a nivel mundial, y está presente en cualquier lugar en el que este la garrapata *R. microplus* (Gasque, 2008; Bravo, 2012). Se encuentra en países con climas tropicales y subtropicales, de las especies que afectan al ganado bovino *B. bovis* y *B. bigemina* se encuentran ampliamente distribuidas y son de gran importancia en África, Asia, Australia y América Central (OIE, 2004). En México la presencia de las garrapatas *R. annulatus* y *R. microplus*, es un factor importante en la presencia de *B. bovis* y *B. bigemina* (Callow 2007).

La babesiosis bovina tiene alta prevalencia en zonas endémicas, y se ha observado en zonas templadas también, en México se puede observar su prevalencia (Figura 3) en los estados de Veracruz, Tamaulipas, Tabasco, Hidalgo, Chiapas, Puebla, Querétaro, Jalisco, Sinaloa, Chihuahua (Lozano, 2014).

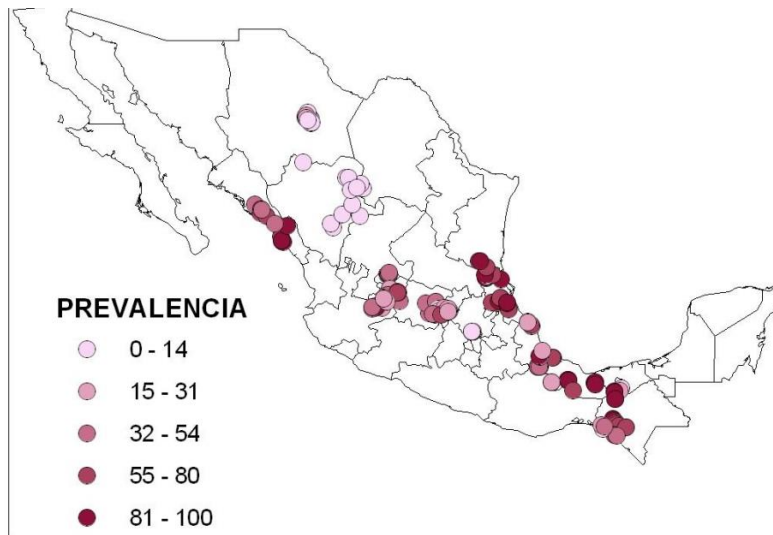


Figura 3. Distribución de la prevalencia de *B. bigemina* en hatos muestreados de las cuencas lecheras en México (Lozano, 2014).

2.2.2 Ciclo de vida de *B. bovis*.

Después de que la garrapata ingiere sangre infectada de un bovino, se produce una destrucción rápida de los eritrocitos y se liberan las formas intracelulares de *Babesia* en lumen del intestino (Smith, 1978). En la figura 4 se describe el ciclo de vida en la garrapata y en el bovino.

Babesia bovis life cycle

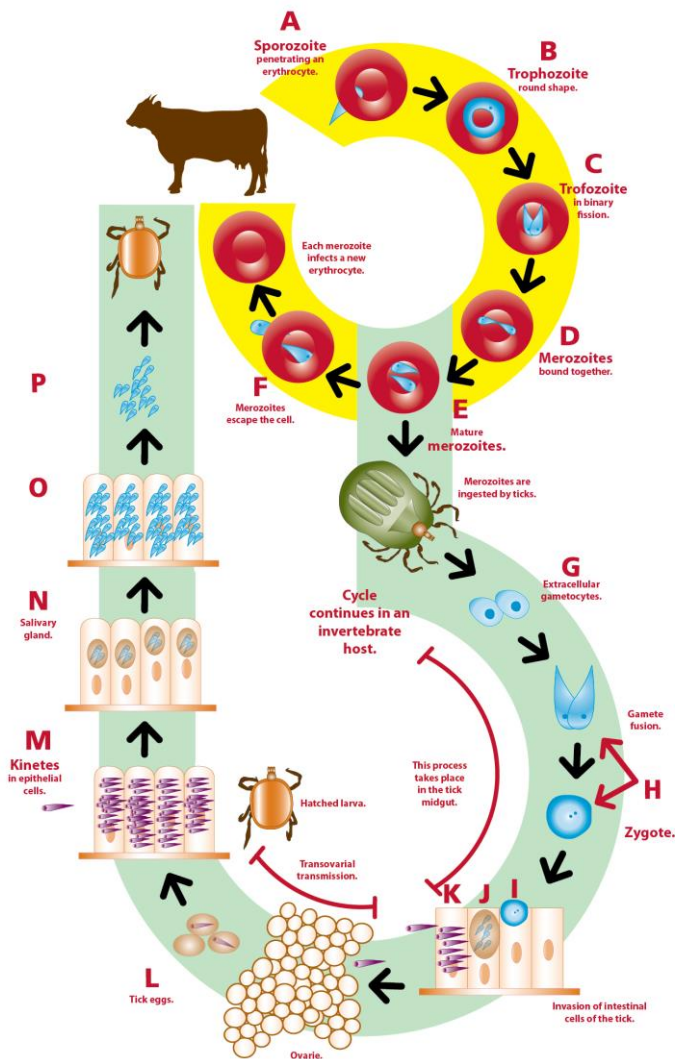


Figura 4. Ciclo Biológico de *Babesia bovis* (Mosqueda et al., 2012).

- A. Esporozoitos invaden el eritrocito y se transforman dentro en trofozoitos.
- B. Trofozoito en forma redonda.

- C. Se generan dos merozoitos a partir del trofozoito por fisión binaria.
- D. Merozoitos están ligados y asemejan a dos peras.
- E. Los merozoitos maduros se separan antes de salir del eritrocito.
- F. Los merozoitos son liberados del eritrocito. Algunos invaden un nuevo eritrocito y se convierten en trofozoito, mientras otros serán ingeridos por las garrapatas adultas para continuar el ciclo en el hospedador invertebrado.
- G. Estadios sexuales son liberados de las células rojas en el lumen intestinal de la garrapata y se desarrollan a gametocitos.
- H. Los gametocitos se transforman en gametos masculinos y femeninos que forman un cigoto después de la fusión.
- I. El cigoto se desarrolla en una fase infectante y penetra en las células intestinales de garrapatas.
- J. Cuerpos de fisión y de ellos forman quinetos móviles
- K. Quinetos destruyen las células intestinales, escapan en la hemolinfa y se distribuyen en los diferentes tipos de células y tejidos, incluyendo los ovarios.
- L. En el ovario, las células embrionarias están infectados por quinetos (transmisión transovarica).
- M. Cuando las hembras ponen sus huevos estos ya vienen infectados.
- N. Larvas infectadas se pegan al bovino y los quinetos migran de las glándulas salivales de la larva, donde se forman esporoblastos.
- O. Cientos de esporozoitos se desarrollan de cada esporoblasto.
- P. Larvas se alimentan de sangre del bovino y los esporozoitos son liberados por la saliva hacia el sistema circulatorio del animal.

2.2.3 Signos de la babesiosis bovina.

Generalmente *B. bovis* se considera más patógena que *B. bigemina* las infecciones ocasionan fiebre alta, ataxia, anorexia, y shock, y a veces también signos nerviosos como resultado del secuestro de eritrocitos infectados en los capilares cerebrales. Cuando se presenta de forma aguda, la parasitemia máxima es menor del 1%, en el caso de *B. bigemina* la parasitemia puede llegar al 10% o 30% (Friedhoff *et al.*, 1989).

Los terneros normalmente son resistentes a la *Babesia* y a la infección. Los parásitos de *B. bovis* son infecciosos 2 a 3 días después que las larvas se prenden y en *R. microplus*, *B. bigemina* madura en promedio 9 días después de que la larva se prende y se transmite cuando ya es ninfa o adulta (Gasque, 2008; Bravo 2004).

Los signos van a variar dependiendo si es *Babesia bovis* o *B. bigemina*. *B. bigemina* generalmente es fiebre alta con temperaturas arriba de los 41 grados centígrados, anorexia, debilidad, depresión, frecuencia cardiaca alta, frecuencia respiratoria elevada, hemoglobinemia, hemoglobinuria, mucosas pálidas, aborto en hembras gestantes. En machos se observa una baja temporal de la fertilidad (Barros y Figuera, 2008).

El bovino se presenta con el lomo arqueado y pelo hirsuto, hay disnea y taquicardia, primeramente, las mucosas se ven inyectadas, pero conforme avanza la anemia se ven pálidas. La anemia puede presentarse en pocos días con la destrucción del 75% o más de los eritrocitos, se asocia con hemoglobinemia y hemoglobinuria severa, la mortalidad es variable, pero puede llegar al 50% o más (Gasque, 2008).

Las infecciones con *B. bovis* suelen ser parecidas, pero estas infecciones son más graves. En este caso, la hemoglobinuria y la hemoglobinemia son menos frecuentes que en los animales infectados con *B. bigemina*. Además, los eritrocitos infectados pueden quedar secuestrados en los capilares cerebrales, lo que deriva en signos neurológicos como falta de coordinación, rechinar de los dientes y

delirio. Parte del ganado bovino puede aparecer echado con movimientos involuntarios en las piernas; la mayoría de los animales con signos nerviosos, muere (Bock *et al.*, 2004).

2.2.3 Diagnóstico.

El diagnóstico de babesiosis en el bovino es una herramienta importante para el control, prevención y diseminación de la enfermedad, en el transcurso de la enfermedad cuando el número de parásitos dentro de los eritrocitos incrementa estos se pueden detectar microscópicamente (Mosqueda *et al.*, 2012).

Se debe sospechar la existencia de babesiosis en bovinos que presentan fiebre, anemia, ictericia y hemoglobinuria en zonas de presencia de enfermedad endémica (Gasque, 2008). Tradicionalmente se identifica al agente en animales infectados realizando un examen microscópico de frotis fino y grueso teñidos con Giemsa, esta técnica tiene una sensibilidad para detectar parasitemias bajas como un parásito por 10^7 glóbulos rojos (OIE, 2004).

La babesiosis se asemeja a otras enfermedades que pueden tener como signos fiebre y anemia hemolítica. Para su diagnóstico diferencial se incluyen anaplasmosis, tripanosomiasis, teileriosis, hemoglobinuria bacilar, leptospirosis, eperitrozoonosis, intoxicación por col e intoxicación crónica por cobre (Jubb *et al.*, 1991).

Cuando el animal cursa la enfermedad de una manera crónica y de manera subclínica, se puede identificar en la sangre o en los tejidos por medio de PCR, por pruebas serológicas o por métodos experimentales, si se utiliza PCR esta prueba puede detectar y diferenciar las especies de *Babesia*, se puede realizar mediante serología para detectar anticuerpos, aquí se detectan mediante la prueba de inmunofluorescencia directa o ELISA, se pueden usar frotis de cerebro en animales muertos cuando se sospecha de babesiosis como causa de la muerte, frotis de hemolinfa para detectar *Babesia* en los tejidos de garrapata, prueba inmunocromatografica como dispositivo de diagnóstico rápido. Se puede detectar mediante la detección de DNA de la sangre parasitada, se utiliza un ADN

monocatenario para hibridar con DNA presente en un tejido, la alta especificidad permite el reconocimiento de la secuencia deseada y es un diagnóstico muy específico (Lozano, 2014; Mosqueda *et al.*, 20012).

2.3 Resistencia.

Los acaricidas químicos desempeñan un papel importante sobre el control de *R. microplus*, sin embargo, por el uso extensivo, el artrópodo ha desarrollado resistencia a todos los acaricidas a nivel mundial. La resistencia hacia acaricidas como organofosforados, piretroides y amitraz se ha observado en Australia y Latinoamérica. Esta resistencia se da por dos mecanismos fisiológicos importantes que son sensibilidad del sitio y desintoxicación metabólica tales como esterasas, oxidasas y glutatión-S-tranferasas, por estos mecanismos es como la garrapata adquiere resistencia a los acaricida. En México Perez-Cogollo *et al* (2010) informaron por primera vez resistencia a la ivermectina en la garrapata *R. microplus* en estado de Yucatán, cabe mencionar que los mecanismos de resistencia hacia la ivermectina aún no han sido esclarecidos. El uso de Lactonas Macrocíclicas como método de control de endo y ecto parásitos es preocupante pues el caso de resistencia emergente en *R. microplus* en algunos países de América latina que ya tienen resistencia, por lo que se debe emplear estrategias control (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2012).

Cuando un insecticida se utiliza intensivamente ocasiona una presión de selección en las garrapatas que elimina aquellos individuos susceptibles y solo quedan los más aptos (Alonso-Díaz *et al.*, 2006; Quiroz *et al.*, 2011). La resistencia cruzada (RC) es el mecanismo que utilizan diferentes especies que han sido resistentes para sobrevivir usando un patrón de detoxificación genérico, y la resistencia múltiple (RM) es la utilización de varios mecanismos para evadir la acción de varios insecticidas no relacionados químicamente. Estos tipos de resistencia nos conllevan a un problema por la disminución de insecticidas efectivos y el elevado costo para el desarrollo de nuevo insecticidas La resistencia puede ocurrir por detoxificación metabólica o modificación del sitio blanco, la resistencia metabólica es la que más predomina causada por la actividad elevada

de enzimas tales como citocromo p450, glutatión-s-transferas y carboxilesterasas, estas actúan degradando o secuestrando las moléculas de los ixodicidas dependiendo como actúen estos (Metcalf, 1989).

Se ha documentado la sustitución de la fenilalanina por una isoleucina en el gen que codifica el canal de sodio en cepas de México en el dominio 3 del segmento 6 y esto es lo que confiere resistencia a la familia de los piretroides (He *et al.*, 1999). En un estudio se consideró que la presencia de la sustitución F I en el canal de sodio de *R. microplus* se puede asociar a la resistencia a flumethrina, deltametrina y cipermetrina (Rosario Cruz *et al.*, 2005).

2.3.1 Efecto de la ivermectina en malaria.

Tomando en cuenta que *Babesia* está estrechamente relacionado con *Plasmodium*, que también prolifera dentro de los eritrocitos, es que algunos fármacos pueden ser útiles para ambos parásitos (Vial y Gorenflot, 2006). El uso de la ivermectina se ha identificado como estrategia de control de vectores de transmisión de enfermedades, es un endectocida eficaz que fue aprobado para el uso en humanos hace más de 25 años, estudios recientes sugieren que puede llegar a ser una estrategia de complemento eficaz para la eliminación y erradicación de la malaria (Chaccour *et al.*, 2013).

Igualmente, un estudio reciente demostró que concentraciones subletales de ivermectina afectan la transmisión de *Plasmodium* mediante la inhibición de la esporogonia en mosquitos *Anopheles* (Kobylinski *et al.*, 2012).

HIPOTESIS.

Las garrapatas *R. microplus* resistentes a ivermectina, presentan menor grado de infección con *B. bigemina* en comparación con garrapatas susceptibles.

III. OBJETIVOS.

3.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el grado de infección por *B. bigemina* en larvas de garrapata *R. microplus* resistentes y susceptibles a ivermectina.

3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Obtener una cepa de garrapatas *R. microplus* resistentes a Ivermectina a partir de una cepa susceptible.
2. Obtener garrapatas de *R. microplus* resistentes y susceptibles infectadas con *B. bigemina*.
3. Determinar la carga parasitaria de *B. bigemina* en garrapatas *R. microplus* resistentes y susceptibles a ivermectina.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS.

Se utilizó la cepa de *R.microplus* Media Joya la cual es una cepa de referencia susceptible a ixodicidas proporcionada por el Laboratorio de Artropodología del CENID-PAVET del INIFAP en Jiutepec, Morelos, México Se presionó continuamente a una dosis de 50µg/kg de peso del animal (Klafke *et al.*, 2006).

El trabajo se realizó con bovinos alojados en la Nave de Infectómica Animal (NINFA) la cual se localiza en el Campus Amazcala de la Universidad Autónoma de Querétaro (Domicilio conocido S/N, San Miguel Amazcala, C.P 76262, El Marques, Querétaro.), en el laboratorio de microbiología de la Facultad de Ciencias Naturales de la UAQ y el laboratorio de Inmunología y Vacunas (LINVAS) en Campus Aeropuerto de la UAQ. La NINFA es una unidad de investigación que cuenta con espacios para contener especies animales; está diseñada para alojar animales infestados con garrapatas.

Se utilizaron bovinos de 7 a 8 meses de edad, de aproximadamente 170-180 kg los cuales fueron infestados con 0.5 gramos de larvas de *R. microplus* susceptibles de 15 días de edad.

A uno de los bovinos infestados se le aplicó un tratamiento con ivermectina al momento de infestarlo con las larvas. Se le inyectó 50µg/kg del producto Ivomec al 1% de Boehringer (subdosis). Posteriormente, se colectaron las hembras ingurgitadas a los 21-23 días, una vez completado su ciclo biológico. De estas se realizaron bioensayos con ivermectina a larvas de 14 días de edad y otra parte de esta población fue utilizada para mantener la cepa, las larvas obtenidas se usaron para infestar otro bovino y se aumentó la dosis 50µg en cada generación.

4.1 Prueba de inmersión de larvas modificada (ivermectina).

Esta prueba modificada por Klafke *et al.*, (2010) es para determinar si una cepa presenta o no resistencia, para lo que se realizaron bioensayos para determinar si las cepas presentan resistencia a ivermectina para ello se utilizaron larvas de 14 a 21 días de edad y se colocaron en viales eppendorf (1.5 ml) esto en diluciones de ivermectina (Ivermectin Sigma-Aldrich), por 10 minutos, después se retiran y se colocan en sobres de papel filtro, incubándose a 26-28 °C con humedad ambiental del 80-90%. La lectura de los resultados se realizó 24 horas posterior al tratamiento. El diseño de esta prueba es para obtener porcentajes de mortalidad a diferentes diluciones y con ello poder determinar el grado de susceptibilidad o resistencia al analizar los resultados con la metodología Probit y obtener los IR con base en las CL50 y CL99 de la cepa evaluada con respecto a la cepa de referencia. La técnica se describe en el (Anexo 1).

Lectura de resultados.

Las larvas vivas y muertas se contaron a las 24 h. solo aquellas larvas capaces de caminar se consideraron vivas, se esperó un promedio de 5 minutos por paquete para realizar el conteo y dando un estímulo de dióxido de carbono para que las larvas vivas se movieran. Los resultados se anotaron en un cuadro y se evaluaron en el programa Polo Plus 1.0.

Posteriormente se colectaron las larvas que lograron sobrevivir a la prueba y se toman como generación 1 y se colocaron en un parche en un bovino para su infestación, colección e incubación para volver a repetir las pruebas de probit y volver a realizar otro pase. Se realizaron un total de 4 pases de la cepa presionada con ivermectina.

Para poder determinar si una generación de garrapatas fue resistente, se calculó la DL 50 de la cepa susceptible Media Joya (INIFAP, México) con un

intervalo de confianza del 95% y se comparó con la DL 50 de generación a evaluar.

Se consideró una generación de garrapatas como resistente si el índice de resistencia 50 (IR50) de la generación se encontraba igual o mayor a 2, Con resistencia incipiente si el IR50 es mayor a 1 y menor de 2, cuando el IR50 es menor o igual a 1 es considerada una muestra de campo susceptible. El IR50 se calcula de la siguiente forma

$$IR50 = \frac{DL50 \text{ muestra de campo}}{DL50 \text{ cepa susceptible}}$$

Donde:

DL50: Concentración Letal 50

IR50: Índice de Resistencia 50

4.2 Infección de *Babesia bigemina* en larvas resistentes y susceptibles a ivermectina.

Para la obtención de larvas susceptibles y resistentes infectadas con *Babesia bigemina*. Se utilizaron dos bovinos (se muestra estrategia en anexo 2). El bovino 1 se infestó con larvas de *R. microplus* infectadas con *Babesia bigemina*, el día 9 post- infestación se esplenectomizó para lograr inmunosuprimirlo, se monitoreo todos los días y cuando se obtuvo una parasitemia del 1.5% el día 19 post infección, se sangro con matraz un litro de sangre obtenida de la vena yugular y se lavó con VYM (15 mg de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 100 mg de KCl, 1415.4 mg de KH_2PO_4 , 154 mg de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1450 mg de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 707 mg de NaCl, 20.5 mg de dextrosa, 0.25 mM de adenina, 0.50 mM de guanosina y agua destilada, pH 7.4) para preparar las dosis de 1×10^8 de eritrocitos infectados con *B. bigemina* y esto se inoculó en el segundo bovino vía intravenosa, el cual fue infestado con las cepas de *R. microplus* susceptible y resistente a ivermectina previamente(14 días antes se infestó al bovino con ambas cepas en infestaciones salteadas una cada tercer día) con parches cutáneos de tela por separado en los flancos del bovino. Se colocaron 0.25 gramos de larvas tanto susceptibles como resistentes a

ivermectina por infestación las cuales al alimentarse de sangre infectada del bovino adquieren la infección por *Babesia*.

Se colectaron las garrapatas adultas repletas a los 23 días y se incubaron a 28 grados con humedad relativa de 80% para su ovoposición (Paredes, 2015; Hernández, 1990).

4.3 Diagnóstico de *Babesia bigemina*.

Para diagnosticar los bovinos infectados con *B. bigemina* se utilizó la microscopia, se tomó una muestra de sangre de la vena coccígea de los bovinos a partir del día 1 post-infección para realizar frotis sanguíneos, se fijaron con metanol y se tiñeron con giemsa, fueron observados al microscopio con el objetivo 100X, se contaron el número total de células y parásitos observados en 10 campos por muestra para poder determinar el porcentaje de eritrocitos infectados.

4.4 Colecta de garrapatas.

Se colectaron las garrapatas repletas de los días 10 al 15 post-infección con *Babesia bigemina* las cuales terminaron su ciclo, se colectaron la cepa resistente y la cepa susceptible de cada parche cutáneo, se lavaron con benzal al 10%, se pesaron individualmente y colocaron en cajas Petri, fueron incubadas a 26 °C con humedad relativa del 80%.

4.5 Peso de huevos.

Una vez que se cumplió el periodo de ovoposición de 14 días, se pesaron los huevos de 10 garrapatas de cada grupo por triplicado, al finalizar se colocaron los huevos de cada grupo en viales por triplicado la cantidad de 0.20 gramos por vial.

4.6 conteo de larvas.

Para realizar el conteo de larvas se utilizó un estereoscopio y se contó por triplicado de cada grupo 0.20 gramos de larvas de cada vial, tomando en cuenta y contando también el número de huevos sin eclosionar.

Extracción de DNA.

Se realizó una extracción de DNA seleccionando 100 larvas de cada día que presentó parasitemia el bovino por grupo tanto de resistentes como susceptibles, los grupos de larvas fueron introducidos 5 minutos en nitrógeno líquido y después macerados con pistilos, se utilizó el protocolo del kit de extracción (QIAGEN DNeasy Blood & Tissue). Una vez obtenido el DNA se realizó un gel de integridad de DNA por electroforesis en gel de agarosa al 1% a 80 V por 45 minutos, y se midió la concentración de las muestras utilizando un Nanodrop.

4.7 Cuantificación de *Babesia bigemina* por PCR en tiempo real (qRT-PCR).

Se realizó una curva estándar del gen GADPH utilizando diluciones de 1×10^{10} a 1×10^2 a partir de la amplificación de GADPH en PCR punto final. Con un Nanodrop se determinó la concentración del producto de PCR, posteriormente con el software en línea OlicgoCalc se determinó el volumen necesario para tener una concentración de 1×10^{10} . Se utilizó el kit Power SYBR Green PCR Master Mix de applied biosystems Thermo Fisher Scientific para la curva estándar bajo las mismas condiciones de amplificación utilizadas en el PCR punto final. Utilizando el mismo procedimiento se realizó la curva estándar para el gen de Esterasa que se utilizó para normalizar la prueba. Para las muestras de DNA de los grupos de larvas resistentes y susceptibles se utilizó una concentración de 200 ng, se evaluaron en total 6 muestras por triplicado de larvas resistentes y 6 muestras por triplicado de larvas susceptibles.

4.8 Análisis estadísticos.

Se realizó un análisis estadístico aplicando una prueba de T aplicando un valor de confianza del 95%, sacando desviación estándar y media con el programa IBM SPSS Statistics 23.0, la prueba se aplicó para comparar los resultados obtenidos entre la cepa resistente y susceptible a ivermectina infectados con *Babesia bigemina* en los siguientes valores: Peso de hembras repletas, Ovoposición, número de larvas, número de huevos sin eclosionar.

Con los resultados del qRT-PCR fueron analizados aplicando una prueba de T de igual manera comparando los resultados obtenidos entre la cepa resistente y susceptible a ivermectina.

4.9 Análisis de efectos de la resistencia a ivermectina.

Se midió el efecto que tiene la resistencia a ivermectina en comparación con la cepa susceptible, ambas cepas infectadas con *Babesia bigemina* para lo que se aplicaron las siguientes ecuaciones.

4.10.1 Efecto en el número de hembras repletas.

$$=100 \times [1 - (NGT/NGC)]$$

Dónde:

NGT es el número de garrapatas repletas que terminaron su ciclo de vida en bovinos de la cepa resistente.

NGC es el número de garrapatas repletas que terminaron su ciclo de vida en bovinos de la cepa susceptible.

4.10.2 Efecto en el peso de las garrapatas.

$$=100 \times [1 - (PGV/PGC)]$$

Dónde:

PGV es el peso de las garrapatas repletas que terminaron su ciclo de vida en bovinos de la cepa resistente.

PGC es el peso de las garrapatas repletas que terminaron su ciclo de vida en bovinos de la cepa susceptible.

4.10.3 Efecto en la ovoposición.

$$=100 \times [1 - (PPGV/PPGC)]$$

Dónde:

PPGV es el promedio del peso de los huevos ovopositados por garrapatas repletas recolectadas de bovinos de la cepa resistente.

PPGC es el promedio del peso de los huevos ovopositados por garrapatas repletas recolectadas de bovinos de la cepa susceptible.

4.10.4 Efecto en la fertilidad de los huevos.

$$= 100 \times [(HC-HT) / HC]$$

Dónde:

HC es índice de viabilidad en la cepa susceptible.

HT es índice de viabilidad en la cepa resistente.

4.10.5 Eficacia de la resistencia.

$$= 100 - [1 - (RGA \times RGO \times RGF)]$$

Dónde:

RGA es la reducción en el número de hembras repletas.

RGO es la reducción en la ovoposición.

RGF es la reducción en la fertilidad de los huevos de garrapatas alimentadas en los bovinos de la cepa resistente comparado con la cepa susceptible.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

5.1 Presión de la cepa *R. microplus* susceptible a ivermectina.

Se obtuvieron en total cuatro generaciones de *R. microplus* presionadas con ivermectina, a cada generación se le aplicó la técnica de inmersión de larvas modificada a ivermectina y mediante análisis probit en el programa Polo Plus 1.0 para obtener la LD 50 y poder determinar el índice de resistencia (I.R) de cada generación.

Se obtuvo como resultados del primer bioensayo realizado mediante la técnica de inmersión de larvas modificada para ivermectina a las larvas de media joya susceptibles, una LD 50 de 2.6 ppm analizado en el programa Polo Plus 1.0. Esta LD 50 de la cepa susceptible se tomó como base para poder determinar el I.R de las generaciones obtenidas.

Cuadro 2. Resultados del conteo del primer bioensayo cepa media joya susceptible con 21 días de edad al 28 de diciembre del 2016.

Dosis ppm	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3	
	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas
0	97	3	154	7	110	9
100	0	101	0	140	0	169
70	3	120	2	137	0	105
50	3	116	3	147	6	64
35	2	149	4	160	1	126
25	4	94	10	162	5	170
15	7	131	11	186	27	5
10	15	144	21	173	7	154
8	19	93	14	145	7	98
6	25	106	19	80	20	103
4	21	82	33	72	34	115
2	97	28	92	23	101	61

La primera generación de *R. microplus* se presionó con una subdosis de 50 µg/kg de la cual el la LD 50 fue de 2.97 ppm.

Cuadro 3. Resultados conteo del bioensayo primera generación 14 días de edad al 10 abril del 2017.

Dosis ppm	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3	
	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas
0	221	12	153	12	101	17
100	0	145	0	155	1	133
70	0	109	0	167	0	64
50	0	86	0	101	0	88
35	0	85	0	106	0	102
25	0	155	0	130	0	132
15	0	235	11	141	4	254
10	4	93	5	140	10	83
8	20	93	5	84	18	118
6	24	73	32	172	19	131
4	43	132	63	86	49	180
2	139	62	111	107	69	58

La segunda generación de *R. microplus* se presionó con 100 µg/kg y se obtuvo una LD 50 de 5.89 ppm.

Cuadro 4. Resultados del conteo del bioensayo segunda generación con 14 días de edad al 5 de agosto del 2017

Dosis ppm	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3	
	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas
0	34	0	39	0	36	2
100	0	100	0	100	0	57
70	8	48	7	62	6	40
50	6	52	13	66	14	85
35	10	59	8	51	10	51
25	15	30	10	47	14	32
15	20	35	17	43	15	37
10	14	52	13	60	15	50
8	19	24	23	37	10	32
6	23	30	23	19	20	21
4	26	14	28	17	44	15
2	31	9	40	9	53	17

La tercera generación fue presionada con una subdosis de 150 µg/kg de ivermectina y se obtuvo una LD 50 de 5.94 ppm.

Cuadro 5. Resultados del conteo del bioensayo tercera generación con 14 días de edad al 28 de octubre del 2017.

Dosis ppm	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3	
	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas
0	100	1	89	0	99	1
100	0	106	0	109	0	88
70	0	130	1	98	0	103
50	0	100	3	101	1	100
35	4	122	3	120	3	88
25	4	48	3	39	8	101
15	11	66	16	69	18	45
10	22	44	18	42	17	51
8	24	34	23	34	22	18
6	16	20	33	26	19	24
4	24	14	26	20	33	17
2	37	5	29	16	35	2

La cuarta generación de *R. microplus* se presionó con la dosis comercial recomendada de 200 µg/kg y se obtuvo una LD 50 de 6.33.

Cuadro 6. Resultados del conteo del bioensayo cuarta generación con 14 días de edad al 2 de febrero del 2018.

Dosis ppm	Repetición 1		Repetición 2		Repetición 3	
	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas	Vivas	Muertas
0	68	1	78	2	52	1
100	0	39	0	93	0	55
70	2	83	7	125	2	80
50	1	81	6	70	5	41
35	6	92	5	76	4	89
25	3	97	7	44	3	54
15	12	33	13	32	14	33
10	38	40	37	40	8	40
8	38	42	38	40	53	25
6	50	35	53	33	54	36
4	42	21	44	22	40	21
2	34	22	62	36	64	15

Tomando en cuenta las LD 50 Obtenidas de los bioensayos y los parámetros de resistencia (Castro-Janer *et al.*, 2011) se determinó el índice de resistencia lo podemos observar en el cuadro 8, dando como resultado un I.R de la primera generación de 1.12 considerándose aun susceptible, pero a partir de la segunda y la tercera generación ya arrojo un I. R: 2.2 y en la cuarta generación se obtuvo un ligero aumento de I.R 2.4, por lo que se puede considerar presencia de resistencia hasta esta cuarta generación. La cuarta generación de *R. microplus* ya presenta resistencia e incluso las garrapatas sobreviven a la dosis comercial recomendada de 200 µg/kg en el bovino, comparando la cepa resistente obtenida con los índices de resistencia que se han reportado en el sur del país (Pérez-Cogollo *et. al*, 2010), donde reportan I.R de 2.04-8.59, en la cual utilizan la cepa Deutch como cepa de referencia con una LD 50 de 5.6ppm, se recomienda seguir presionando la cepa para aumentar el I.R.

Cuadro 7. Índices de resistencia de las generaciones obtenidas.

Cepa	Tendencia ± DS	LD 50 (ppm)	LC 95%	I.R 50
Media Joya	1.870+-0.074	2.63	1.414- 3.862	NA
Primera generación	2.765+-0.114	2.97	2.557- 3.266	1.12
Segunda generación	1.381+-0.069	5.89	4.511 - 7.336	2.2
Tercera generación	1.401+-0.070	5.94	5.304- 6.568	2.2
Cuarta generación	1.802+-0.071	6.33	5.267- 7.455	2.4
Cuarta generación (<i>B. bigemina</i>)	3.029+-0.110	6.69	5.697- 7.737	2.5

5.2 Infección con *B. bigemina* en garrapatas *R. microplus* resistentes y susceptibles a ivermectina.

Una vez obtenida la cepa de *R. microplus* resistente a ivermectina a partir de la cepa susceptible, ambas cepas fueron infestadas en un bovino e infectadas con *B. bigemina*. El bovino que se infectó fue monitoreado todos los días post-infección como se ve en el cuadro 9, se revisó hematocrito, temperatura y porcentaje de parásitos en eritrocitos por microscopía, se obtuvieron 6 días con parasitemia en el bovino de los días 6 al 11 post-infección, donde podemos observar que el día 6 fue el porcentaje más bajo con 0.10% y el día 8 el más alto con 0.43%. De esta manera ambas cepas al alimentarse de la sangre del bovino infectado adquirieron la infección.

Cuadro 8. Monitoreo de parasitemia en el bovino.

Fecha	Día post-infección	Hematocrito	Temperatura	% de parásitos.
09/03/2018	0	36%	38.6 °C	N
14/03/2018	5	34%	39.3 °C	N
15/03/2018	6	32%	39.4 °C	0.10%
16/03/2018	7	26%	38.8 °C	0.33%
17/03/2018	8	26%	39.5 °C	0.43%
18/03/2018	9	26%	38.8 °C	0.30%
19/03/2018	10	24%	38.5 °C	0.30%
20/03/2018	11	22%	38.0 °C	0.20%

5.3 Análisis estadísticos.

De las hembras repletas colectadas de ambas cepas y puestas a incubar para su ovoposición y eclosión de larvas se hizo un comparativo por medio de prueba de T entre la cepa resistente y susceptible a ivermectina infectada con *B. bigemina*.

5.3.1 Número de garrapatas.

Se colectó el número total de hembras repletas de ambas cepas como se puede ver en la figura 5, donde el número total de garrapatas repletas colectadas de la cepa resistente fue menor de 685 en comparación con 938 de la susceptible, al ser infestado un solo bovino no se obtuvo datos suficientes para hacerlo por triplicado y comparar los grupos, y se obtuvo un efecto de reducción en el número de garrapatas resistentes en comparación con las susceptibles del 26.97%

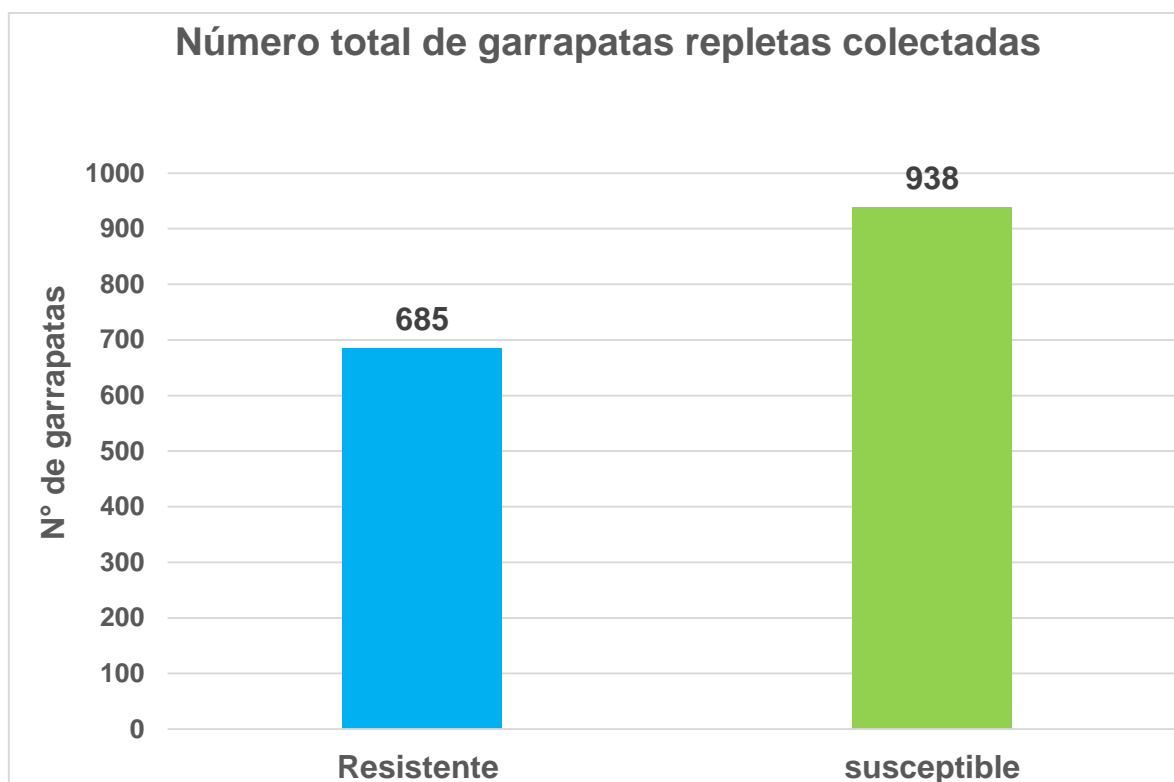


Figura 5. Número total de garrapatas colectadas de la cepa de *R. microplus* resistente y susceptible a ivermectina infectada con *B. bigemina*.

5.3.2 Peso de garrapatas.

En la figura 6 se puede observar el promedio del peso de las garrapatas, siendo menor el peso de las garrapatas de la cepa resistente a ivermectina en comparación con la susceptible presentando una diferencia estadística $p= 0.030$ y también presentó un efecto de diferencia del peso de 2.60%.

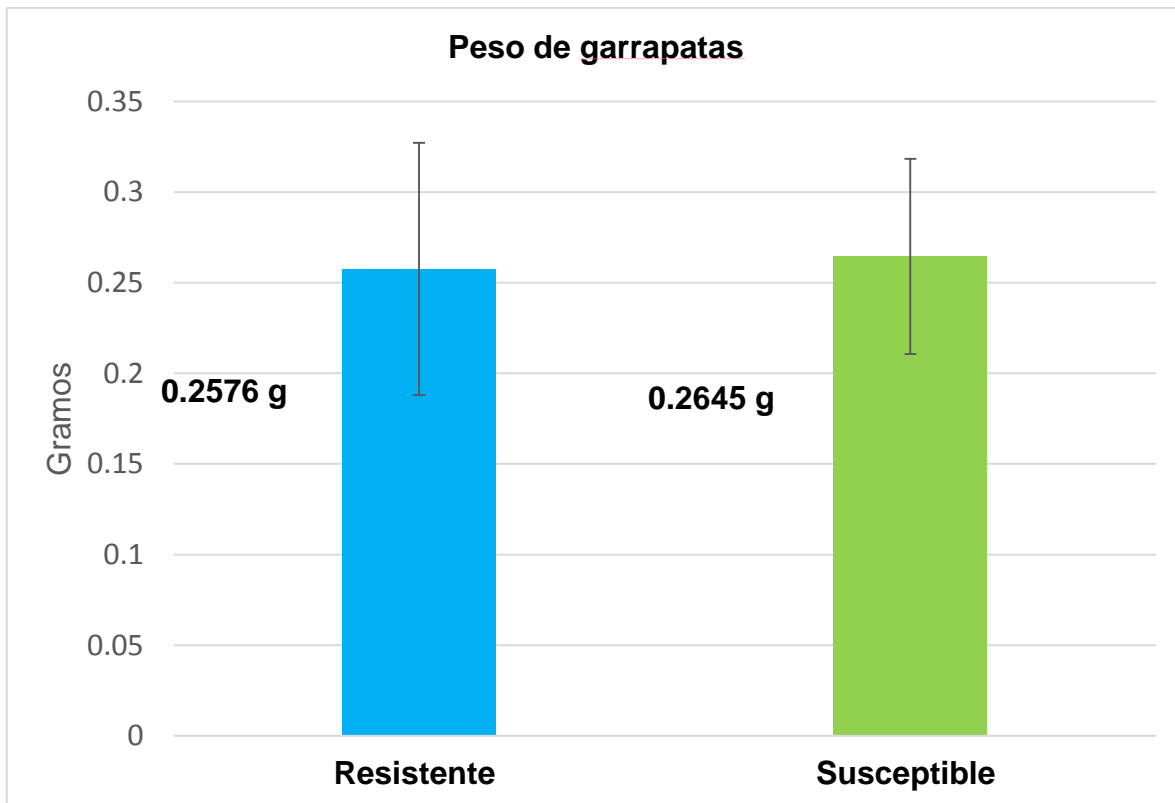


Figura 6. Peso total de garrapatas colectadas de la cepa de *R. microplus* resistente y susceptible a ivermectina infectada con *B. bigemina*.

5.3.3 Ovoposición.

Para medir la ovoposición de las cepas, se tomó en cuenta la ovoposición de cada cepa de 10 garrapatas por triplicado por día en que se presentó parasitemia, se contó el total de huevos y cómo podemos observar en la figura 7 no hubo diferencia estadística $p=0.615$.

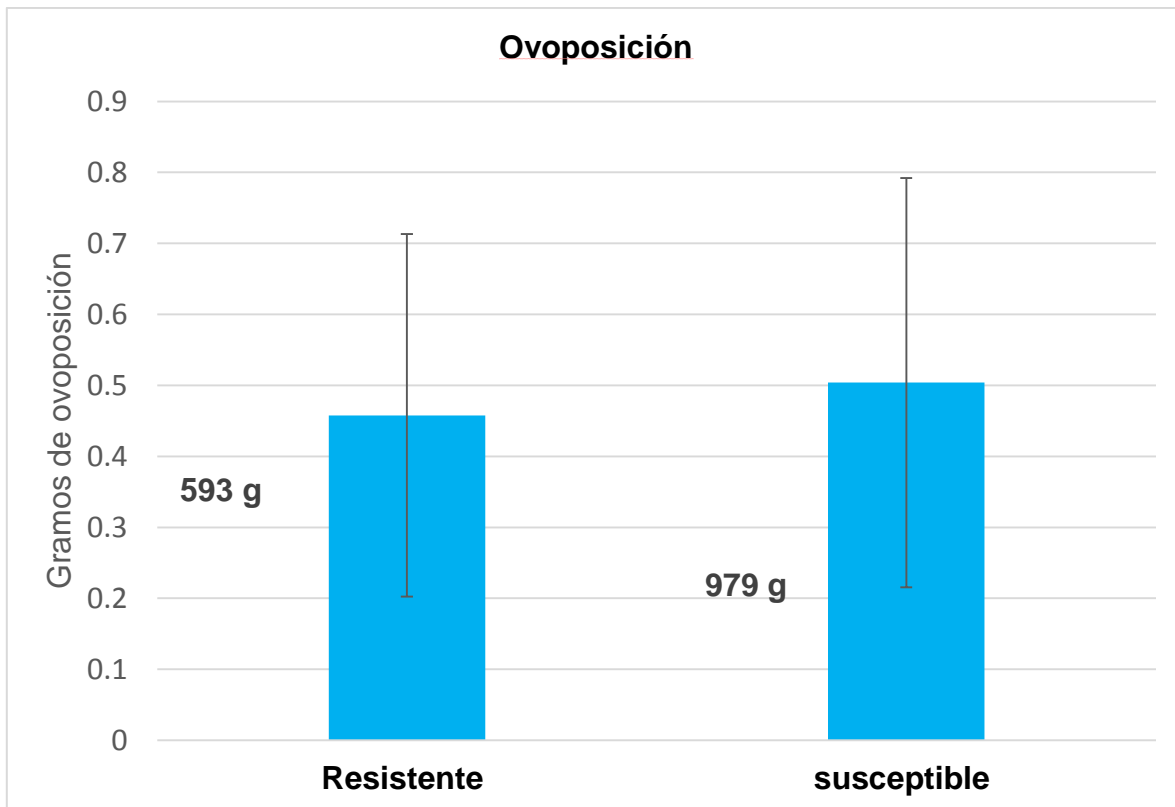


Figura 7. Ovoposición de la cepa de *R. microplus* resistente y susceptible a ivermectina infectada con *B. bigemina*.

5.3.4 Fertilidad en huevos y efecto de la resistencia

Se realizó un conteo de larvas y huevos sin eclosionar para determinar la fertilidad comparando la cepa resistente con la susceptible. En cuanto al número de larvas se pudo observar que fue menor la cantidad de larvas que presentó la cepa resistente de 593 en comparación con la cepa susceptible de 979 se observa una diferencia estadística $p= 0.001$ y presentó un efecto de reducción de 39.43%.

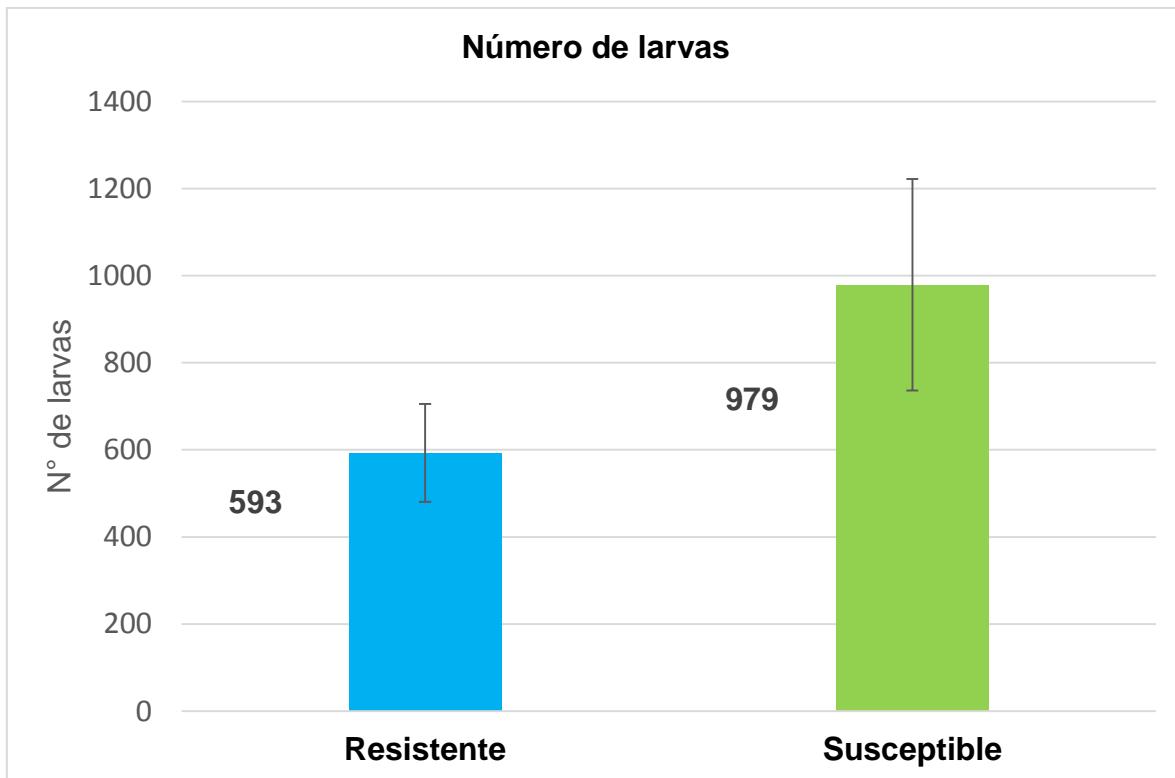


Figura 8. Número de larvas de la cepa de *R. microplus* resistente y susceptible a ivermectina infectada con *B. bigemina*.

Se puede observar en el número de huevos sin eclosionar en la figura 9 que la cepa resistente presentó mayor número de 1320 en comparación con la cepa susceptible de 984 hay una diferencia estadística $p=0.001$ y se presentó una diferencia en el efecto de 34.14%.

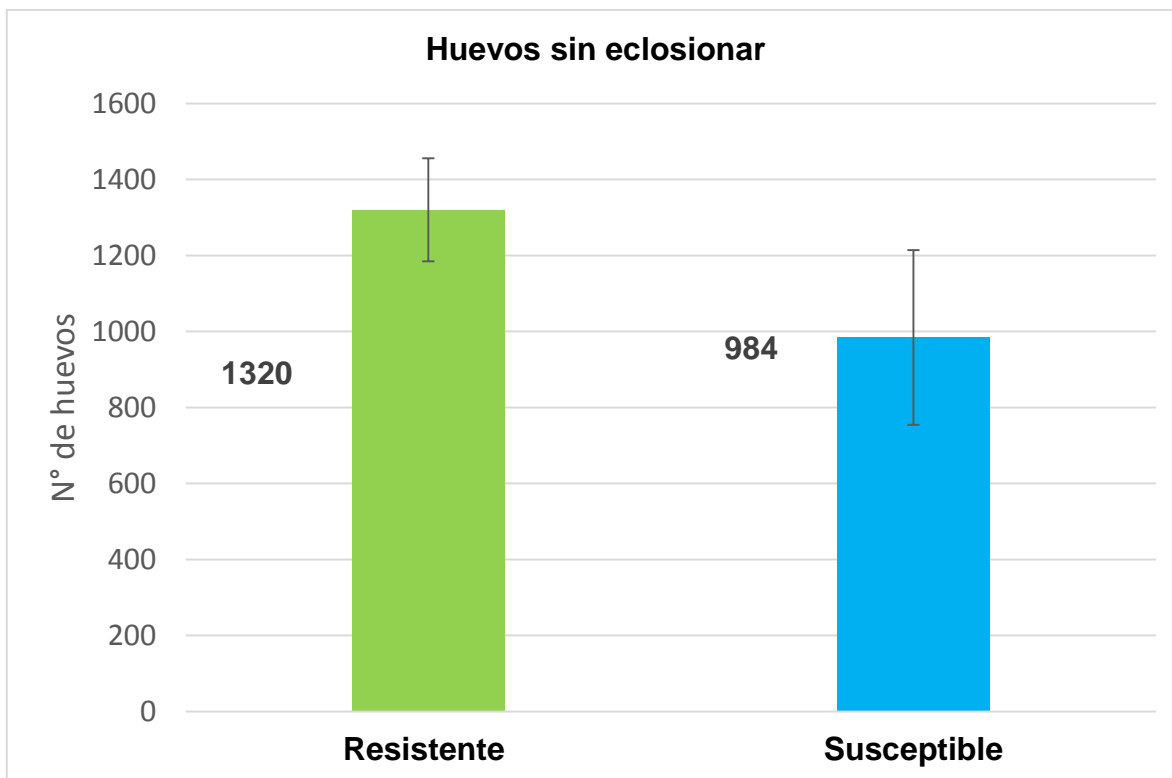


Figura 9. Número de huevos de la cepa de *R. microplus* resistente y susceptible a ivermectina infectada con *B. bigemina*.

Con los datos anteriores se puede observar que hay una reducción en la fertilidad de huevos del 23.29% en la cepa resistente en comparación con la cepa susceptible, y el efecto que tiene el factor de resistencia en la cepa es del 51% en comparación con la cepa susceptible.

5.4 Extracción de DNA

Se extrajo DNA por grupo de 100 garrapatas de la cepa resistente y la susceptible por cada día que se presentó parasitemia en el bovino, dando un total de 6 muestras de DNA de larvas resistentes y 6 muestras de larvas susceptibles y se hizo un gel de integridad de agarosa al 1% figura 10.

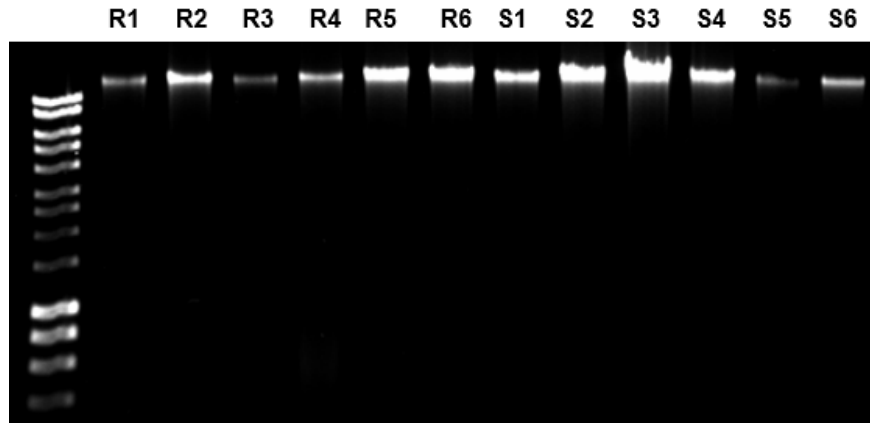


Figura 10. Gel de integridad de DNA de larvas. 6 muestras de larvas resistentes (R) y 6 muestras de larvas susceptibles (S) infectadas con *B. bigemina*.

5.5 qRT-PCR de larvas.

Las muestras de DNA del grupo resistente y susceptible a ivermectina infectadas con *B. bigemina* fueron procesadas por medio de la técnica de PCR en tiempo real para poder determinar el grado de infección de las muestras, se obtuvieron valores de CT como se observa en el cuadro 9, y en la gráfica

Cuadro 9. Valores de CT entre la cepa de *R. microplus* resistente y susceptible infectadas con *B. bigemina*.

Día de parasitemia	Resistente	Susceptible
1	4.20	0.02
2	0.22	0.02
3	0.38	0.04
4	0.18	0.36
5	0.02	0.03
6	0.15	0.20

de la figura se puede observar que en el día 1 de parasitemia los valores inversamente proporcionales a la cantidad de DNA de la cepa resistente son menores en comparación con la cepa susceptible, en el día 2 y 3 gráficamente se logra ver una ligera diferencia

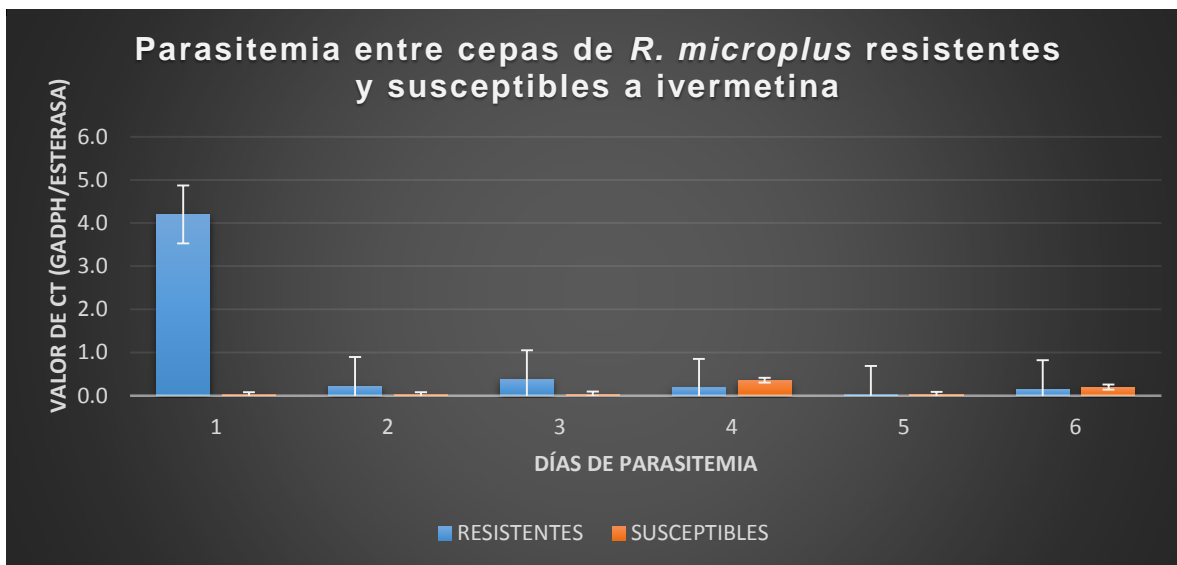


Figura 11. Parasitemia entre cepas de *R. microplus* resistentes y susceptibles a ivermectina.

Sin embargo, se realizó un análisis ANOVA como se ve en el cuadro 10 y se puede observar que no hubo diferencia estadística entre los grupos $p=0.29$

Cuadro 10. Análisis ANOVA de los valores de CT obtenidos.

Origen de las variaciones	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Promedio de los cuadrados	F	Probabilidad
Entre grupos	1.681696751	1	1.68169675	1.24128402	0.291284842
Dentro de los grupos	13.54804159	10	1.35480416		

VI. CONCLUSIÓN.

Se logró obtener una cepa de *R. microplus* resistente a ivermectina con un I.R 50: 2.4 a partir de la cepa susceptible Media Joya. Se obtuvo que al comparar la cepa resistente a ivermectina con la susceptible infectada con *B. bigemina*, hay un efecto de reducción en la tasa de reproducción exitosa de la cepa resistente pues se obtuvo disminución del número de garrapatas obtenidas, peso de garrapatas repletas, reducción en la fertilidad de los huevos, teniendo como resultado un efecto de eficacia de la resistencia en esta cepa del 51%. En cuanto al grado de infección por *B. bigemina* no hubo diferencia estadística entre la cepa resistente y susceptible.

VII. LITERATURA CITADA.

Alonso-Diaz, M. A., Rodriguez-Vivas, R. I., Fragoso-Sanchez, H., Rosario-Cruz, R. (2006). Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Arc. Med. Vet.* 38, 2:105-114.

Babes, M. V. (1888). *Physiologie Pathologique: Sur L' Hémoglobinurie Bactérienne Du Boeuf. Des Comptes Rendus Des Séances De L'académie Des Sciences.* 700: 692-694.

Barros, C.S.L., Figuera, R. (2008). Babesiosis. In: *Foreign Animal Diseases.* 7ma Edición. Boca Raton, FL. United States Animal Health Association :147-158.

Bellgard, M. I., Moolhuijzen, P.M., Guerrero, F.D., Schibeci, D., Rodriguez-Valle, M., Peterson, D.G. (2012). CattleTickBase: An integrated Internet-based bioinformatics resource for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Int J Parasitol.*42(2): 161-169.

Bock, R., Jackson, L., de Vos, A., Jorgensen, W. (2004). Babesiosis of Cattle. *Parasitology.* 129: 247-249.

Bravo, S. (2012). Babesiosis bovina. Monografía Facultad de Ciencias Agropecuarias Medicina Veterinaria y Zootecnia. Ecuador. 15-64.

Callow, L. L., Dalgliesh, R. J. Y De Vos, A. J. (2007). Development Of Effective Living Vaccines Against Bovine Babesiosis The Longest Field Trial *Int Parasitol.* 27(7)

Castro-Janer, E., Rifran, I., González, P., Niell, C., Piaggio, J., Gil, A., Schumaker, T.T. (2011). Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by the Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. *Veterinary Parasitology.* 178:148-155.

Cetrá, B. (2001). Garrapata común del bovino. E.E.A. INTA Mercedes, Corrientes, Noticias y Comentarios N° 352. Disponible en www.produccion-animal.com.ar consultado el [13/09/16].

Cetrá, B. (2001). Garrapata común del bovino. E.E.A. INTA Mercedes, Corrientes. Sitio Argentino de Producción Animal 352:1-6. Disponible en www.produccion-animal.com.ar consultado el [5/11/16].

Chaccour, C. J., Kobylinsk, K. C., Bassat, Q., Bousema, T., Drakeley, C., Alonso, P., Foy, B. D. (2013). Ivermectin to reduce malaria transmission: a research agenda for a promising new tool for elimination. *Malaria Journal* 12:153:2-8.

Cordero de Campillo, M., Rojo, V. F., Martínez F. A., Sánchez, A. M. Hernández, R.S., Navarrete, L. I., Diez, B. P., Quiroz, R. H., Carvalho, V. M. (1999). *Parasitología Veterinaria*. 1a ed. en español. Madrid, ES. S.A.U. Interamericana McGraw-Hill. 420-425.

Cortés, J. A., Betancourt, J. A., Argüelles, J., Pulido, L.A. (2010). Distribución de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia) Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 11:73-84.

FAO. (2004). Guideline resistance management and integrated parasite control in ruminants. Agriculture Department. Module 1. Ticks: Acaricide resistance, diagnosis, management and prevention. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Animal Production and Health Division, Rome. 1: 32

Friedhoff, K.T., Ganse-Dumrath, D., Weber C., Muller, I. (1989). Epidemiology and control of *Babesia divergens* infections in northern Germany. In: Proceedings of Eighth National Veterinary Haemoparasite Disease Conference, Hidalgo R.J., ed. Louisiana State University, Baton Rouge, USA, 441–449.

Gasque, G.R. (2008). Babesiosis Bovina. En: Enciclopedia Bovina. México. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Primera Edición: 97-101.

Guerrero, F.D., Lovis, L., Martins, J.R. (2012). Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Rev. Bras. Parasitol. Vet.*, Jaboticabal 21:1, 1-6.

He, H., Chen, A.C., Davey, R.D., Ivie, G.W., George, J.E. (1999). Identification of a point mutation in the para-type sodium channel gene from a pyrethroid-resistant cattle tick. *Biochem Biophys Res Commun*. 261, 558-561.

Hernandez, R. (1990). Estudios sobre el efecto de cuatro aislamientos de *Babesia bigemina* en bovinos y garrapatas. (Tesis de Maestría en Ciencias). Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Cuernavaca, Morelos.

Jubb, K.V., Kennedy F.; Peter C., Palmer, N. (1991). Patología de los animales domésticos. Montevideo: Editorial Agropecuaria Hemisferio Sur S.R.L. Vol. III. 167, 170.

Klafke, M.G., Aguiar de A.T., Miller, R.J., Tizu, S.T. (2010). Selection of an ivermectinresistant strain of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in Brazil. *Vet.Parasitol* 168: 97–104.

Kobylinski, K. C., Foy, B. D., Richardson, J. H. (2012). Ivermectin inhibits the sporogony of *Plasmodium falciparum* in *Anopheles gambiae*. *Malar J* 2012, 11:381.

León-Clavijo, M. A., Edith C Hernandez-Rojas, E. C. (2012). Descripción de la proteína bm86, su polimorfismo y su papel como inmunógeno en el ganado bovino infestado por garrapatas. *ISSN: 1794-2470 ed: Imprenta Nacional de Colombia vol. 10, 17: 113-115.*

Lozano, M. E. (2014). Situación sanitaria de la babesiosis y anaplasmosis en la ganadería lechera en tres sistemas de producción. (Tesis de Maestría en Salud y Producción Animal Sustentable). Universidad Autónoma de Querétaro, México. 32-36.

Metcalf R L. (1989). Insect resistance to insecticides. *Pesticide Sci* 26, 333-358.

Mosqueda, J., Olvera-Ramírez, A., Aguilar-Tipacamú, G., Cantó, G.J. (2012). Current Advances in Detection and Treatment of Babesiosis. *Current Medicinal Chemistry*, 19, 1504-1518.

OIE. (2004). Manual de la OIE sobre animales terrestres 2004. Capítulo 2.3.8, babesiosis bovina. 548-547 Disponible en http://web.oie.int/esp/normes/mmanual/pdf_es/2.3.08_Babesiosis_bovina.pdf Consultado el [2/11/16].

Paredes, M. E. (2015). Determinación de la participación de la proteína HAP2 en la fusión de fases sexuales de *Babesia bigemina*. (Tesis de Maestría en Ciencias Genómicas). Universidad Autónoma de la Ciudad de México, México, D.F. 30-32.

Pereira, M.C., Labruna, M.B. (2008). *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Biologia, Controle e Resistência*. São Paulo (Brasil). *Med Vet* p. 161. Citado por: Cortés, J. A., Betancourt, J. A., Argüelles, J., Pulido, L.A. (2010). Distribución de garrapatas *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en bovinos y fincas del Altiplano cundiboyacense (Colombia) Corpoica. *Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 11:73-84.

Perez-Cogollo, L. C., Rodriguez-Vivas, R. I., Ramirez-Cruz, G.T., Miller, R.J. (2010). First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. *Vet Parasitol*. 168:165-169.

Quiroz, H., Figueroa, J. A., Ibarra, C. F., López, M. E. (2011). Epidemiología de enfermedades parasitarias en animales domésticos. 1ª ed. 477-495.

Riverón, C.R. (2002). Enfermedades emergentes y reemergentes: un reto al siglo XXI. *Rev Cuban Pediatr* 74(1):7-22.

Rodríguez, D., Olivares, J.L., Sánchez, C.Y., Alemán, Y., Arece, J. (2013). Cambios climáticos y su efecto sobre algunos grupos de parásitos. *Rev. Salud Anim.* Vol. 35: 3. 145-150.

Rodríguez-Vivas, R.I., Hodgkinson, J. E., J.Trees, A. (2012). Acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: Current status and mechanisms of resistance. *Rev mex de cien pecu.* 3: 9-24

Rosario-Cruz, R., Guerrero, F.D., Miller, R.J., Rodríguez-Vivas, R. I., Dominguez-Garcia, D.I., Cornel, A.J., HernándezOrtiz, R., George, E. J. (2005). Roles played by esterase activity and by a sodium channel mutation involved in pyrethroid resistance in populations of *Boophilus microplus* (Canestrini) (Acari: Ixodidae) collected from Yucatan, Mexico. *J Med Entomol.* 42(6):1020-1025. 45

SENASICA. (2016). Situación actual del control de la garrapata *boophilus* spp. Disponible en <http://www.gob.mx/senasica/documentos/34495> Consultado el [2/11/16].

Smith, R. D. (1978). Ciclo Biológico de *Babesia* en la garrapata. Departamento de hemoprotosarios. Instituto Nacional de Investigaciones Pecuarias. México, D. F. *Ciencia Veterinaria* 2:236-249

The Center for Food Security & Public Health. (2007). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* 1-3. Disponible en www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/boophilus_microplus-es.pdf consultado el [5/09/16].

The Center for Food Security & Public Health. (2008). Babesiosis Bovina. 1-6. Disponible en www.cfsph.iastate.edu/Factsheets/es/babesiosis_bovina.pdf consultado el [12/09/16].

Vial, H.J., Gorenflot, A. (2006). Chemotherapy against babesiosis. *Veterinary parasitology*, 2006, 138, (1-2), 147-160.

Wright, I. G. (1990). Immunodiagnosis Of And Immunoprophylaxis Against Haemoparasites *Babesia* Sp And *Anaplasma* Sp In Domestic Animals. *rev. sci. tech. off. int. epiz.* 19:345-35.

V III APÉNDICE.

Anexo 1. PRUEBA DE INMERSION DE LARVAS MODIFICADAS (IVERMECTINA).

Preparar las siguientes soluciones:

Sol I: Preparación de una solución de Tritón-X 100 al 2% disuelto en etanol absoluto (Alcohol anhidro marca JT Baker) . (9.8 ml de etanol y agregar 200µl de Triton-X 100).

Diluyente: Preparar en agua destilada una solución de etanol al 1% con 0.02% de Tritón-X 100. En un vaso de precipitado colocar 39.6ml. de agua destilada y adicionar 400µl de la **Sol I** (Mezclar por pipeteo)

Preparación de solución stock: Para una solución stock de ivm al 1% a partir del producto ivermectin de Sigma Aldrich considerando una pureza de 94%

Pesar en una balanza analítica 0.0106g. de ivm técnica ,
disolver en 1ml de **Sol I** .

Almacenar a 4°C por un máximo de una semana

Preparación del test:

- 1) Identificación en tubos falcon 15 ml con las siguientes concentraciones (en ppm): 100, 70, 50, 35, 25, 15, 10, 8, 6, 4, 2 y 0 (control).
- 2) Retirar de la gradilla o tubo la solución stock 1% Ivm.
- 3) Preparar una solución inicial de Ivm a 100 ppm en un tubo falcon de 50 ml:
 - Colocar 40 ml de agua destilada (pv).

- Retirar con una pipeta de 1000, 400 μ l de agua destilada
- Cambiar de punta y adicionar con una pipeta de 1000 μ l, 400 μ l de la solución de stock ivm 1%.

4) Las soluciones de inmersión serán preparados individualmente en tubos falcon de 15 ml de acuerdo a la tabla de abajo:

TUBO	Con. Ppm	Vol de dluyente. (1%Eth+0.02%%TX)(ml)	Vol solucon inicial (ml)
TESTiGO	0 CONTROL	2	0
A	100	0	2
B	70	.6	1.4
C	50	1	1
D	35	1.3	.7
E	25	1.5	.5
F	15	1.7	.3
G	10	1.8	.2
H	8	1.84	.16
I	6	1.88	.12
J	4	1.92	.08
K	2	1.96	.04

5) Colocar en los tubos eppendorf identificados (p1000), 500 μ l de cada dilución comenzando por la más diluida a la más concentrada.

- Usar un pincel solo para el control, o sea, diferente a los otros pinceles. Cada dilución será hecha con un pincel.
- Colocar aproximadamente 100 larvas para cada dilución.
- Comenzar a colocar las larvas primero con el control tubo (0) depositar las de menor concentración (tubo K) a las de mayor tubo (A).

- 6) Dejar las larvas en inmersión durante 10 min. Iniciar el tiempo después de colocar las larvas del grupo control. Retirar el líquido con cuidado, tomar las larvas con un pincel. Secar el pincel con un papel de toalla, colocar las larvas en los paquetes. Incubar a 28°C/80% HR.
- 7) Realizar la lectura posterior a las 24 hrs.
- 8) Se tomaran en cuenta como vivas solo aquellas larvas capaces de caminar.

Para paquetes larvarios:

Utilizar papel whatman no.1 por pliego cortar en medida de 7.5cm x 8.5cm y doblar por la mitad sellar con broches marca Baco tipo bulldog de 5.5cm. (Rotular cada paquete con la unidad de producción y dilución correspondiente).