


Resistencia a la ivermectina en *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) en el noreste de México y factores de riesgo asociados



Samantha Abigail Moreno-Linares ^a

Romario García-Ponce ^b

Jesús Jaime Hernández-Escareño ^a

Heidi Giselle Rodríguez-Ramírez ^a

José Pablo Villarreal-Villarreal ^{a*}

^a Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Campus de ciencias agropecuarias, C. Francisco Villa 20, Colonia Ex-Hacienda el Canadá 66054, General Escobedo, Nuevo León, México.

^b Universidad Autónoma de Nuevo León. Facultad de Ciencias Biológicas. San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México.

*Autor de correspondencia: pablov_v@hotmail.com

Resumen:

Rhipicephalus microplus, es la especie parasitaria que más daño genera a la ganadería mexicana y global debido a las pérdidas directas e indirectas, como lo es el incremento de la multirresistencia y la resistencia cruzada. En la actualidad, son pocos los estudios que se tienen sobre la resistencia a lactonas macrocíclicas en México, siendo su mayoría en el sur. El presente estudio tuvo como objetivo evaluar el estado de la resistencia a ivermectina en *R. microplus*, en el noreste de México y factores de riesgo asociados a ésta. Se colectaron 20 poblaciones de *Rhipicephalus microplus*, en los estados de Veracruz, Nuevo León, Tamaulipas y San Luis Potosí, y se analizaron con la prueba de inmersión de larvas. Los datos de mortalidad se sometieron a un análisis Probit, estimándose las concentraciones letales (CL) del 50% y 99% y sus respectivos intervalos de confianza del 95% (IC95%) y

para la determinación de los posibles factores de riesgo se realizó un análisis multivariado y tablas de contingencia de 2 x 2 para las variables de exposición, con un intervalo de confianza del 95%, y un modelo de regresión logística binomial para aquellas variables con una $P \leq 0.05$. El 80 % de las poblaciones analizadas presentaron resistencia con rangos de RR50= 2.07-11.14 y RR99= 3.03-47.93 ($P \leq 0.05$) y mediante la regresión logística binomial, se pudo observar que la variable frecuencia de tratamientos obtuvo una $P \leq 0.0134$, resultado que mostró ser significativo.

Palabras clave: Garrapata del ganado, Epidemiología veterinaria, Dosis-respuesta, Acaricidas.

Recibido: 26/06/2023

Aceptado: 08/02/2024

Introducción

Las garrapatas son ectoparásitos hematófagos importantes en la salud humana y animal, dado al daño que causan al transmitir patógenos y al alimentarse⁽¹⁾. *Rhipicephalus microplus*, es la especie con mayor importancia en la ganadería bovina debido a que es el principal vector de hemoparásitos como *Babesia* spp. y *Anaplasma* spp., aunado a esto las pérdidas económicas que origina a nivel productivo en México ascienden a más de 573.6 millones de dólares al año⁽²⁾. Dicha especie se encuentra dispersa en las regiones tropicales, subtropicales y semiáridas de todos los continentes a excepción de Europa⁽³⁾. La distribución geográfica de *R. microplus* en el país, está registrada por la SENASICA, quien declara que el 30.60 % del país se encuentra libre de la garrapata, el 3.44 % está en erradicación y el 65.96 % son zonas libres naturales y zonas en control⁽⁴⁾.

Desde hace años se utilizan ixodicidas para el control de *R. microplus*, tales como: organofosforados, amidinas, piretroides sintéticos, reguladores del crecimiento, fenilpirazolonas y lactonas macrocíclicas (LM); estos últimos son una familia de amplio espectro (endectocida) y actúan al unirse a los dominios transmembrana (TM) de los receptores Cys- loop, como el canal de cloro dependiente de glutamato (GluCl) mismos que se expresan en los sistemas motores y sensoriales de artrópodos y nematodos, causando hiperpolarización y finalmente la muerte^(5,6,7).

Todos estos fármacos tienen en común, que han generado resistencia debido a factores operacionales como el uso inadecuado y continuo⁽⁸⁾. En México, en el 2010, se reportó por primera vez la resistencia a la ivermectina en poblaciones de *R. microplus*⁽⁹⁾, siendo que ésta se utiliza desde inicios del siglo XXI y en la actualidad son pocos los estudios que se tienen sobre la resistencia a LM en México, los cuales, son escasos en el noreste del país. Es por esto que, el objetivo de la presente investigación fue determinar el estado de la resistencia a ivermectina en *R. microplus* en ranchos ganaderos del noreste de México, así como, los posibles factores de riesgo asociados a dicha resistencia.

Material y métodos

Área y lugar de estudio

El estudio se desarrolló en el laboratorio de Bacteriología y en el Laboratorio Multidisciplinario de Investigación (LMI) de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (F.M.V.Z.) de la Universidad Autónoma de Nuevo León (U.A.N.L.).

Durante los meses de septiembre de 2021 a octubre de 2022, se colectaron 20 poblaciones de garrapatas pertenecientes a la especie *R. microplus*, ubicadas en 20 ranchos ganaderos distintos pertenecientes a los cuatro estados de la región noreste de México: Veracruz (Ver.), Nuevo León (N.L.), Tamaulipas (Tamps.) y San Luis Potosí (S.L.P.). Para determinar el tamaño de muestra, se utilizó un modelo simple al azar, basado en los datos del SIAP-SADER⁽¹⁰⁾.

Colecta e identificación de garrapatas

Por la mañana, se colectaron de manera manual 20 a 30 hembras ingurgitadas (teleóginas) pertenecientes a la especie *R. microplus*, ubicadas en las zonas corporales del bovino siguiendo las recomendaciones de la FAO⁽¹¹⁾. La identificación de los especímenes se llevó a cabo mediante un análisis observacional morfológico, con el uso de claves dicotómicas⁽¹²⁾ y un microscopio estereoscópico Carl Zeiss™ Stemi™ DV4 (Göttingen, Alemania), esto con el fin de discernir entre otras especies de garrapata que también parasitan bovinos.

Producción de larvas infestantes

Para llevar a cabo la ovoposición, las teleóginas se lavaron con agua destilada y secadas con toallas de papel; se colocaron en grupos de 10 en una caja Petri (100 x 15 mm) de manera dorsoventral, y se incubaron en una incubadora BOD-250 de la marca ECOSHEL a una temperatura de 27 ± 2 °C y una humedad relativa entre el 80 y 90 %. Después de la ovoposición (14 a 18 días), se colectaron los huevos y transferidos a tubos de vidrio de 10 ml sellados con una tela y una liga en espera de la eclosión de las larvas; pasados otros 14 días se esperó a la maduración de las larvas, y una vez que se observó la característica del geotropismo negativo, entonces fue llevada a cabo la prueba de inmersión de larvas modificada para ivermectina^(8,9,13).

Prueba de inmersión de larvas modificada para ivermectina (PIL)

Se preparó una solución madre de IVM al 1% (Sigma-Aldrich, USA) en etanol absoluto y 2% de Tritón X-100 (Sigma-Aldrich, USA). A partir de esta solución, se elaboró la dosis máxima de IVM al 0.01% (100 ppm). Posteriormente, se prepararon 11 diluciones en serie al 30 %: 0.01 %, 0.007 %, 0.0049 %, 0.00343 %, 0.0024 %, 0.00168 %, 0.00117 %, 0.00082 %, 0.00057 %, 0.0004 % y 0.00028 %. Como diluyente se usó una solución de etanol al 1% y Tritón X-100 al 0.02% en agua destilada. En tubos Eppendorf de 2.0 ml se añadieron 500 µl de cada dilución por triplicado y se colocó una cantidad de entre 100 y 150 larvas infestantes, se sumergieron durante 10 min y después, se transfirieron a papeles Walkman de 8.5 x 7.5 cm cerrados con pinzas sujeta papeles. Pasadas 24 h, se llevó a cabo el conteo de las larvas vivas y el número inicial de larvas paquete^(8,13,14).

Análisis estadístico

Se realizó un análisis de dosis-respuesta PROBIT, se calcularon las concentraciones letales (CL) del 50 % y 99 % con sus respectivos límites de confianza del 95 % (LC 95 %) utilizando el software SPSS V.24. Se probó la hipótesis de normalidad e igualdad de la varianza con una prueba de Ji-cuadrada ($P \leq 0.05$).

Se determinó la razón de resistencia (RR) de cada población y se comparó con los datos obtenidos previamente de la cepa de referencia susceptible Deutch (USDA, Cattle Fever Tick

Research Laboratory, Edinburg, TX, EE.UU.)⁽¹³⁾. Para determinar la susceptibilidad y resistencia se siguió la clasificación: $RR50 \leq 1$: susceptible; $RR50 > 1 < 2$ resistencia incipiente e $RR50 \geq 2$ resistente⁽¹²⁾. La fórmula para el cálculo de la RR fue:

Cuestionario epidemiológico

Se aplicó un cuestionario epidemiológico a cada uno de los propietarios o encargados de los ranchos ganaderos estudiados con la finalidad de determinar las prácticas en el uso y manejo de LM, así como del control de *R. microplus*. Se incluyó información relacionada a la producción, instalaciones, razas, presencia de garrapata y otros parásitos, historial del uso de lactonas macrocíclicas (LM) e ixodicidas, frecuencia de aplicaciones, rotación de ixodicidas y de pasturas, entre otros.

El grupo con resistencia incipiente ($RR50 > 1 < 2$) fue considerado como susceptible y se realizó un análisis descriptivo para calcular las frecuencias de las variables encontradas, así como un análisis multivariado utilizando tablas de contingencia 2 x 2 para evaluar la interacción entre las variables de exposición, con un intervalo de confianza del 95 % utilizando el software Epi Info V.7.2. Se utilizó la prueba de Exacto de Fisher para determinar el nivel de significancia de cada asociación y se incluyeron en el modelo de regresión logística binomial aquellas asociaciones con un valor de $P \leq 0.20$. Se consideró un valor de $P \leq 0.05$ como estadísticamente significativo en el análisis de regresión binomial^(8,9,15).

Resultados

Lugar de colecta de las poblaciones

$$RR50 = \frac{CL50 \text{ población}}{CL50 \text{ cepa referencia}}$$

Los datos de colecta de las poblaciones de *R. microplus* pertenecientes a la región noreste de México se muestran en el Cuadro 1, mismos que fueron distribuidos de la siguiente manera: cuatro de Tamaulipas., siete de Veracruz., cinco de Nuevo León y cuatro de San Luis Potosí.

Cuadro 1: Localización geográfica de cada población de *R. microplus* colectada en la región noreste de México

Población	Localización	Coordenadas geográficas
ETHM	Tantoyuquita, Tamps.	22°31'05.5"N 98°31'26.5"W
JCG4	Ciudad del Maíz, S.L.P.	22°25'01.6"N 99°35'20.7"W
JAM5	Tantoyuca, Ver.	21°12'38.7"N 98°08'33.5"W
DALC	Cadereyta, N.L.	25°33'43.4"N 99°49'11.4"W
RAMT	Soto la Marina, Tamps.	23°48'30.3"N 98°08'24.9"W
JNSE	Santa Engracia, Tamps.	24°04'05.5"N 99°14'07.7"W
JVML	Los Ramones, N.L.	25°42'24.6"N 99°37'27.9"W
SNTM	General Bravo, N.L.	25°50'17.0"N 99°15'56.4"W
VMA1	General Terán, N.L.	25°10'06.4"N 99°32'55.3"W
PRVA	Aramberri, N.L.	24°06'19.8"N 99°55'20.1"W
MRNA	Hidalgo, Tamps.	24°04'41.0"N 99°14'28.8"W
ANGS	Tantoyuca, Ver.	21°23'42.1"N 98°08'32.3"W
LEX15	Tantoyuca, Ver.	21°18'06.0"N 98°15'42.4"W
ESHP	Tantoyuca, Ver.	21°19'42.7"N 98°20'44.0"W
JHE2	Tantoyuca, Ver.	21°24'05.1"N 98°11'15.5"W
JPN1	Tantoyuca, Ver.	21°17'15.3"N 98°15'57.3"W
VIHM	Tantoyuca, Ver.	21°27'41.4"N 98°18'30.5"W
KML1	Ciudad Valles, S.L.P.	22°01'19.9"N 99°04'23.5"W
EBEV	Casas Viejas, S.L.P.	22°11'22.2"N 99°05'53.2"W
ISALI	El Naranjo, S.L.P.	22°30'58.1"N 99°21'05.0"W

Ranchos ganaderos con poblaciones de *R. microplus* resistentes a ivermectina y la razón de resistencia

Utilizando la tasa de mortalidad y la metodología PROBIT, se calculó la concentración letal en % (CL50 y CL99) y la razón de resistencia (RR50 y RR99) (Cuadro 2). La población VMA1 fue susceptible a la IVM (RR50= 0.73; RR99= 3.94) y las poblaciones JCG4, JAM5 y JNSE, mostraron una resistencia incipiente (RR50 del 1.20. 1.55 y 1.61 respectivamente). Por otro lado, las 16 poblaciones restantes, mostraron resistencia a IVM (RR50= 2.07- 11.14; RR99= 3.03-47.93) y de éstas, las poblaciones JVML y LEX15 fueron altamente resistente al ixodicida (RR50= 6.98; RR99= 11.11; RR50= 11.14; RR99= 47.93).

Cuadro 2: Análisis de dosis-respuesta a IVM en poblaciones de *R. microplus*, concentración letal al 50 % y 99 % y razón de resistencia 50 y 99 (RR₅₀ y RR₉₉)

Población	Pendiente	CL ₅₀	IC 95 %	RR ₅₀	CL ₉₉	IC 95%	RR ₉₉
JCG4	4.77	0.00067	0.00123- 0.00135-	1.20	0.00203	0.00114- 0.00491-	1.20
ETHM	3.82	0.00154	0.00174- 0.00074-	2.75	0.00626	0.00874- 0.00362-	3.68
JAM5	3.10	0.00087	0.00102- 0.00200-	1.55	0.00490	0.00758- 0.00820-	2.88
DALC	3.46	0.00230	0.00264- 0.00133-	4.11	0.01083	0.01616- 0.00418-	6.37
RAMT	4.29	0.00148	0.00164- 0.00072-	2.64	0.00515	0.00684- 0.00410-	3.03
JNSE	2.82	0.00090	0.00110- 0.00313-	1.61	0.00602	0.01090- 0.01173-	3.54
JVML	3.40	0.00391	0.00513- 0.00191-	6.98	0.01889	0.04563- 0.00695-	11.11
SNTM	3.83	0.00226	0.00269- 0.00027-	4.03	0.00913	0.01362- 0.00403-	5.37
VMA1	1.91	0.00041	0.00053- 0.00188-	0.73	0.00669	0.01585- 0.00883-	3.94
PRVA	3.26	0.00206	0.00225- 0.00265-	3.68	0.01067	0.01346- 0.01014-	6.28
MRNA	3.62	0.00303	0.00346- 0.00202-	5.40	0.01326	0.01927- 0.00948-	7.80
ANGS	3.32	0.00213	0.00224- 0.00547-	3.80	0.01068	0.01220- 0.05465-	6.28
LEX15	2.09	0.00624	0.00727- 0.00163-	11.14	0.08148	0.13760- 0.00741-	47.93
ESHP	3.32	0.00177	0.00192- 0.00138-	3.16	0.00889	0.01110- 0.0088-	5.23
JHE2	2.70	0.00156	0.00174- 0.00198-	2.78	0.01136	0.01572- 0.01526-	6.68
JPN1	2.38	0.00225	0.00256- 0.00222-	4.02	0.02138	0.03357- 0.01036-	12.58
VIHM	3.10	0.00255	0.00293- 0.00134-	4.56	0.01435	0.02122- 0.00947-	8.44
KML1	2.53	0.00149	0.00166	2.66	0.01242	0.01750	7.31

			0.00101-			0.00513-	
ISALI	3.03	0.00116	0.00132	2.07	0.00679	0.00995	4.00
			0.00095-			0.00522-	
EBEV	2.87	0.00116	0.00139	2.07	0.00750	0.0129	4.41
			0.00052-			0.00150-	
DEUTCH^a	4.72	0.00056	0.00060	NA	0.0017	0.00210	NA

a Cepa de referencia susceptible de USDA, Cattle Fever Tick Research Laboratory, Edinburg, TX, USA.
 CL= concentración letal; IC= intervalo de confianza; RR= razón de resistencia; NA= no aplica.

Separando las poblaciones por estado, se encontró que la resistencia a IVM supera al 70 % en cada uno de estos. En el estado de San Luis Potosí se tuvieron tres poblaciones resistentes (75 %) y una población presentó resistencia incipiente (25 %), en Tamaulipas se obtuvieron valores similares a los encontrados en el estado de San Luis Potosí: 75 % resistentes, 25 % con resistencia incipiente. Por otro lado, en Nuevo León se encontró que el 80 % de las poblaciones presentan resistencia, mientras que una población (20 %) mostró susceptibilidad, resaltando que fue la única del presente estudio. Por último, el 86 % de las poblaciones analizadas en Veracruz, presentó resistencia, mientras que el 14 % mostró resistencia incipiente.

Factores de riesgo asociados a poblaciones resistentes

Se analizaron 14 variables independientes como posibles factores de riesgo asociados a la resistencia a IVM (Cuadro 3). Por un lado, el sistema de explotación principal es el agostadero; poco más de la mitad de los ranchos cuentan con instalaciones semitecnificadas y con razas criollas entre cebuínas y europeas. La densidad de animales por rancho es menor de 50 cabezas por hato, con una proximidad de menos de 5 km entre ranchos. La mitad de los ranchos muestreados presenta garrapatas todo el año.

En cuanto al historial de manejo de ixodicidas y LM, se observó que todos los ranchos implementan la rotación de ixodicidas utilizando diversas familias de productos, como organofosforados, amidinas, piretroides sintéticos, fenilpirazolonas e inhibidores del desarrollo. Además, todos los ranchos aplican IVM y otras LM, como doramectina, siendo la mitad de ellos utilizadas para el tratamiento de ectoparásitos. Más del 50 % de los ganaderos encuestados mencionaron utilizar formulaciones de IVM con concentraciones superiores al 1 %, aplicándolas más de cinco veces al año y ajustando la dosis según el peso del bovino. Además, la mayoría de los ranchos cuentan con asistencia veterinaria y llevan a cabo la rotación de pasturas.

Las variables de exposición "frecuencia de tratamientos" ($P=0.026$) y "formulación administrada" ($P=0.1531$) mostraron una significancia estadística según la prueba del exacto

de Fisher (Cuadro 4). Por lo tanto, ambas variables se incluyeron en el modelo de regresión logística binomial (Cuadro 3), donde se obtuvieron estimaciones de regresión, intervalos de confianza del 95 % (IC 95 %), odds ratio (OR), valores de P y error estándar del coeficiente de regresión. Se consideró un valor de $P \leq 0.05$ como significativo, lo que indica una asociación estadística positiva entre las variables.

Cuadro 3: Análisis de frecuencias de las variables independientes de exposición como posibles factores de riesgo asociados a la resistencia a IVM por *R. microplus*

Variable	Análisis	Frecuencia (%)	P (exacto de Fisher)
Sistema de explotación	Estabulado	6/20= 30	0.6573 ^a
	Agostadero	14/20= 70	
Tipo de instalación	Semitecnificado	11/20= 55	0.6253 ^a
	Familiar	9/20= 45	
Razas	Pura	2/20= 10	0.3684 ^a
	Criollas	18/20= 90	
Densidad de animales (número de cabezas)	> 50	8/20= 40	0.5345 ^a
	< 50	12/20= 60	
Proximidad a otro rancho	> 10 km	5/20= 25	0.2487 ^a
	< 10 km	15/20= 75	
Temporada con garrapata	Estacionalidad	10/20= 50	0.7089 ^a
	Todo el año	10/20= 50	
Parásito (s) blanco (s)	Ectoparásitos	10/20= 50	0.7089 ^a
	Endo y ectoparásitos	10/20= 50	
Frecuencia de tratamientos (año)	1- 3	9/20= 45	0.026 ^{b*}
	4- > 5	11/20= 55	
Aplicación de tratamientos	Prevención	7/20= 35	0.5607 ^a
	Presencia	13/20= 65	
Formulación administrada	1	8/20= 40	0.1531 ^{b*}
	3.15 - 4 %	12/20= 60	
Aplicación de acuerdo con el peso	Sí	17/20= 85	0.5087 ^a
	No	3/20= 15	
Asistencia veterinaria	Sí	15/20= 75	0.2817 ^a
	No	5/20= 25	
Rotación de ixodicidas	Sí	20/20= 100	0.4738 ^a
	No	0/20	
Rotación de pastura	Sí	14/20= 70	0.3426 ^a
	No	6/20= 30	

a= no significativo; b*= significativo ($P \leq 0.20$).

Cuadro 4: Análisis de regresión logística binomial en variables significativas como posibles factores de riesgo asociados a la resistencia de *R. microplus* a la IVM

Variable	OR	IC 95 %	SE (β)	$P \leq 0.05$
Frecuencia de tratamientos	No definido	0.0	291.26	0.0134
Formulación administrada	6.59	0.5428	1.27	0.1101

OR= razón de momios; IC= intervalo de confianza; SE (β)= error estándar.

Discusión

El control químico de la garrapata en México y el mundo se ha vuelto ineficaz, dado a la aparición de poblaciones resistentes y multirresistentes a los ixodicidas^(16,17,18). Desde su introducción, en la década de los 80, la IVM ha sido el producto de salud animal con mayor importancia a nivel mundial⁽¹⁹⁾. Pocos son los estudios del estado de la resistencia a IVM en *R. microplus* en México^(8,9,15). Lo anterior destaca la importancia de realizar estudios sobre la evaluación y diagnóstico de resistencia de este fármaco en el noreste del país.

Aplicando la PIL y siguiendo la metodología Probit, se determinaron las CL50 y CL99 de las poblaciones de estudio. En los resultados obtenidos se encontró diferencia significativa con la cepa de referencia Deutch, con una población susceptible (5 %) (RR50= 0.73), tres poblaciones con resistencia incipiente (15 %) (RR50= 1.20-1.61) y el resto (80 %) con resistencia (RR50= 2.07-11.14). Estos resultados coinciden con aquellos reportados por primera vez en México⁽⁹⁾, en donde el 100 % de las poblaciones analizadas mostraron resistencia a la IVM con RR50= 2.04-8.59 y RR99= 2.67-87.86, además de un crecimiento exponencial en diferentes épocas de muestreo. La importancia de utilizar una cepa susceptible de referencia radica en que, es un parámetro referente para la realización de estudios bioquímicos y moleculares de resistencia⁽²⁰⁾. Además, éstas se encuentran reguladas por organismos internacionales. En el estudio realizado en 2006⁽⁹⁾, se hace una comparación entre los resultados obtenidos en su investigación utilizando la cepa Deutch y otro estudio⁽¹⁵⁾, quien utiliza la cepa Porto Alegre. Dicho estudio⁽⁹⁾, resalta que el resultado obtenido por este equipo es superior a los del segundo, aun así, se obtuvieron valores de RR50 ligeramente más altos o iguales. En la presente investigación, se encontraron resultados similares al analizar las cepas Porto alegre, Mozo y Deutch^(9,13,21) como posibles candidatos para la cepa de referencia, de modo que se optó por seleccionar la cepa Deutch debido a que, al analizar los resultados de las tres, no hubo significancia al momento de determinar la clasificación ya

estipulada, y se ajustó más a lo deseado. Por otro lado, la cepa mexicana Media Joya solo es susceptible a organofosforados, piretroides sintéticos y amidinas, y no se tiene una caracterización toxicológica de susceptibilidad a ivermectina⁽²²⁾.

Autores⁽²³⁾, mencionan que la resistencia está dada por factores bioquímicos/genéticos, factores operativos y factores ecológicos; estos últimos incluyen rasgos intrínsecos e interacciones de las poblaciones con su entorno y medio ambiente. Además, el desarrollo de individuos resistentes es dependiente de la frecuencia de ocurrencia de estos y de la presión de selección^(9,24,25). Asimismo, en diferentes estudios de países latinoamericanos, se obtuvieron poblaciones resistentes de entre el 40 al 100 % de las poblaciones analizadas^(26,27,28).

La respuesta de las poblaciones al aumento de la dosis (pendiente) es un indicativo importante de la resistencia. Una pendiente baja ≤ 2 y una CL alta (superior a la cepa de referencia) es común en poblaciones resistentes, mientras que, una pendiente elevada ≥ 2 y CL baja es común en poblaciones susceptibles con respuesta heterogénea^(13,29). En el presente estudio se encontraron poblaciones que respetan dicho anuncio: JCG4 (S.L.P.), JAM5 (Ver), JNSE (Tamps), VMA1 (N.L.) y la población JPN1 (Ver), mientras que, sorprendentemente tres poblaciones provenientes de Tamaulipas (ETHM, RAMT y MRNA), cuatro de Nuevo León (JVML, SNTM, PRVA y DALC), cinco de Veracruz (ANGS, LEX15, ESHP, VIHM y JHE2) y tres de San Luis Potosí (KML1, EBEV e ISALI), mostraron CL y pendientes altas. A la fecha, no existen reportes que determinen una cepa de *R. microplus* altamente resistente a la IVM⁽²⁸⁾; de acuerdo con estos enunciados, las poblaciones descritas han sufrido una pérdida de la heterogeneidad y de los genes susceptibles, demostrando por primera vez en la presente investigación que los alelos resistentes se encuentran fijados en la población y presentan una respuesta homogénea de resistencia. Otros estudios, mencionan que la heterogeneidad de alelos resistentes llevaría a la pérdida de poblaciones susceptibles y a la aparición de poblaciones resistentes con alelos homogéneos^(9,30,31).

De las poblaciones resistentes obtenidas en este estudio, dos se catalogaron como altamente resistentes (RR50= 6.98 y RR50= 11.14), resultados que son similares a aquellos que mostraron los valores más altos de resistencia (RR50= 6.84, 7.37 y 10.23) y RR50= 5.89, 6.25 y 8.21^(8,9,15). Aun así, son necesarios estudios moleculares para analizar todas las frecuencias de los alelos resistentes de las poblaciones.

Por otro lado, se analizaron las frecuencias en base a las respuestas obtenidas en el cuestionario epidemiológico (Cuadro 3). Los municipios incluidos en el presente estudio se encuentran ubicados entre los paralelos 26° N a 21° N, humedades relativas entre el 65-79 %, temperaturas medias de 21° C y un promedio de evaporación del agua entre 1,200-1,400 mm, condiciones óptimas para el desarrollo, distribución y supervivencia de la

garrapata, así como para el aumento de generaciones por año^(32,33,34). Algunos autores mencionan que la ubicación geográfica y el nicho abiótico, son factores que promueven el mayor desarrollo de las garrapatas^(3,35).

De las 14 variables estudiadas, dos mostraron tener significancia de $P \leq 0.20$: frecuencia de tratamientos ($P=0.026$) y formulación administrada ($P=0.1531$), mismas que fueron incluidas en el modelo de regresión logística binomial.

Los sistemas de manejo de animales, así como el número de tratamientos anuales, son considerados factores que influyen en la eficacia de los fármacos, desempeñando un papel importante en el desarrollo de la resistencia⁽⁴⁾. En el 55 % de los ranchos, se aplica el tratamiento con IVM de 4 a más de 5 veces por año, similar a lo obtenido por Fernández-Salas *et al*⁽³⁶⁾, donde ranchos ganaderos que aplican LM 4 o más de 5 veces al año, tienen hasta 13 veces más probabilidad de desarrollar resistencia⁽⁸⁾. La IVM presenta un período de disminución de la concentración posterior a la aplicación, pero debido a su alta afinidad a la grasa y su persistencia en tejidos, no se elimina por completo, de modo que la exposición prolongada a dosis terapéuticas favorece a la aparición de organismos resistentes^(9,15,36). Dicho supuesto es conocido como “efecto de cola”; si existen organismos presentes durante dicho período la selección de organismos resistentes a IVM es posible^(37,38). *R. microplus* reacciona rápidamente a la presión de selección y a mayor concentración de ixodidas⁽³⁹⁾, por tanto, la aplicación del químico debe realizarse con menor frecuencia en intervalos de 30 días con la intención de disminuir dicha presión, no solo para la garrapata, sino también para organismos no objetivo como helmintos^(40,41).

Aplicando la regresión logística binomial se pudo observar que para la variable frecuencia de tratamientos, se obtuvo una $P \leq 0.0134$, resultado que mostró ser significativo, sin embargo, con un OR no definido, debido a que en uno de los grupos de la tabla de contingencia de 2 x 2, hubo una casilla en la que no se presentó una población que fuese susceptible y que se aplicara la IVM 4 o más de 5 veces al año, lo que se tuvo que computar como un cero; ya que el OR es el cociente de dos relaciones⁽⁴²⁾. El hecho de incluir un cero dentro de la división genera un resultado incalculable. Se determinó que la administración del tratamiento de 4 o más de 5 veces al año puede ser un factor de riesgo, ya que, por una parte, las medidas de frecuencia calculadas resultaron en valores mayores a 1; el riesgo relativo obtenido fue de 1.8 y los OR se encuentran en un rango desde 1.27 hacia el infinito. Por lo cual, el aumento de la frecuencia en el grupo expuesto se puede considerar que es debido al efecto de la variable independiente. Un modo para solucionar el hecho de que el OR sea incalculable es aumentar proporcionalmente los valores de cada casilla⁽⁴³⁾, por lo que al realizarlo se obtuvo un valor de: OR= 11.14 y $P=0.032$; si bien, no se puede tomar como confiable este resultado, deja abierta la posibilidad de que, en estudios posteriores, incluyendo una mayor cantidad de

explotaciones estudiadas, se pueda comprobar el aumento de los OR para las explotaciones que aplican tratamientos 4 o más de 5 veces al año.

En cuanto a la variable independiente formulación administrada, se observó que más de la mitad de los ganaderos utiliza formulaciones de IVM-LA del 3.15 % al 4 %, debido a falta de eficacia de la formulación al 1 %. Las formulaciones de IVM-LA tienen un mayor riesgo de generar poblaciones resistentes cuando se aplican con alta frecuencia en comparación con las formulaciones de acción corta al 1%⁽¹⁾. Esto se debe a diversos factores, como una concentración más alta del principio activo en las formulaciones de IVM-LA, una dosis aplicada que es tres veces mayor (630 µg/kg), un período de retiro prolongado, una disminución de la inmunidad natural y una selección de parásitos resistentes más rápida^(41,44,45). El análisis de regresión logística binomial demostró que para la variable formulación administrada, se obtuvo una $P \leq 0.1101$ (OR= 6.59, IC 95 % = 0.5428 y S.E.= 1.27) mismo que resultó no ser significativo como posible factor de riesgo, pero con una asociación positiva. Con estos datos, se relacionó a la única población susceptible (VMA1), con los posibles factores de riesgo asociados, debido a que, en ésta, se encontró una frecuencia de tratamientos menor: de 1-3 al año y una formulación administrada menor: IVM al 1%.

Conclusiones e implicaciones

Con base a los resultados obtenidos se demostró que, en los estados de Veracruz, San Luis Potosí y Tamaulipas, no hay poblaciones susceptibles a IVM y del 14 al 25 % de éstas, presentan resistencia incipiente. Por otra parte, en el estado de Nuevo León, solo se encontró una población susceptible. *R. microplus* es resistente a la IVM en el noreste de México (80 %). En la actualidad, la frecuencia de aplicaciones de 4 o más de 5 veces al año es el único factor de riesgo que pudiera estar asociado a la presencia de poblaciones resistentes. Por tanto, es necesario migrar a nuevos métodos de control, como incluir diversas familias de ixodicidas, llevar un control integrado, un manejo responsable y una cultura de diagnóstico para así disminuir la presión de selección a la que las poblaciones son expuestas.

Agradecimientos y conflictos de interés

Al CONAHCYT- México por la manutención y el apoyo económico para la maestría de Samantha Abigail Moreno Linares, a la FMVZ de la UANL, y a los ganaderos quienes

generosamente prestaron su tiempo e instalaciones. Los autores no presentan conflictos de interés.

Literatura citada:

1. Rodríguez-Vivas RI, Castillo-Chab CG, Rosado-Aguilar JA, Ojeda-Chi, MM. Evaluación de la eficacia y persistencia de la moxidectina (10%) e ivermectina (3.15%) contra infecciones naturales de nematodos gastrointestinales en bovinos del trópico mexicano. Arch Med Vet 2014;46(1).
2. Rodríguez-Vivas RI, Laerte G, Pérez de León A, Silva-Villela H, Torres-Acosta JFJ, Fragoso-Sánchez H, *et al.* Potential economic impact assessment for cattle parasites in Mexico. Review. Rev Mex Cien Pecu 2017;8(1):61-74.
3. Estrada-Peña A, Bouattour A, Camicas JL, Guglielmone A, Horak I, Jongejan F, *et al.* The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. Exp Appl Acarol 2006;38(2-3):219-235.
4. SENASICA. Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria. Situación actual Campaña Nacional para el control de la garrapata *Boophilus* spp. México. 2023.
5. Laing R, Gillan V, Devaney E. Ivermectin - Old Drug, New Tricks? Trends Parasitol 2017;33(6):463-472.
6. Ashour DS. Ivermectin: From theory to clinical application. Int J Antimicrob Agents 2019;54(2):134-142.
7. Chen IS, Kubo Y. Ivermectin and its target molecules: shared and unique modulation mechanisms of ion channels and receptors by ivermectin. J Physiol 2018;596(10):1833-1845.
8. Fernández-Salas A, Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA, Basurto-Camberos H. Ivermectin resistance status and factors associated in *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) populations from Veracruz, Mexico. Vet Parasitol 2012;190(1-2):210-215.
9. Pérez-Cogollo LC, Rodríguez-Vivas RI, Ramírez-Cruz GT, Miller RJ. First report of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* resistant to ivermectin in Mexico. Vet Parasitol 2010;168(1-2):165-169.
10. SIAP. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Secretaría de Agricultura. Información sobre el número de animales que se crían en el país con fines de producción. México. 2021.

11. FAO. Food and Agriculture Organization of United Nation. Resistance management and integrated parasite control in ruminants. Guidelines, animal production and health division. 2004:25-77.
12. Dantas-Torres F, Fernandes-Martins T, Muñoz-Leal S, Castilho-Onofrio V, Barros-Battesti DM. Ticks (Ixodida: Argasidae, Ixodidae) of Brazil: Updated species checklist and taxonomic keys. *Ticks Borne Dis* 2019;10(6):101-126.
13. Klafke GM, Sabatini GA, de Albuquerque TA, Martins JR, Kemp DH, Miller RJ, *et al.* Larval immersion tests with ivermectin in populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. *Vet Parasitol* 2006;142(3-4):386-390.
14. Torres-Acosta F, Chan-Pérez J, López-Arellano M, Rosado-Aguilar J, Soberanes N, Orantes-Neri S, *et al.* Capítulo: 12 Diagnóstico de resistencia a los antiparasitarios en rumiantes. En: *Técnicas para el diagnóstico de parásitos con importancia en salud pública y veterinaria*. AMPAVE-CONASA. México. 2015:387-389.
15. Pérez-Cogollo LC, Rodríguez-Vivas RI, Ramírez-Cruz GT, Rosado-Aguilar JA. Survey of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin at cattle farms with history of macrocyclic lactones use in Yucatan, Mexico. *Vet Parasitol* 2010;172(1-2):109-113.
16. Lovis L, Reggi J, Berggoetz M, Betschart B, Sager H. Determination of acaricide resistance in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) populations of Argentina, South Africa, and Australia with the larval tarsal test. *J Med Entomol* 2013;50(2):326-335.
17. Vudriko P, Okwee-Acai J, Tayebwa DS, Byaruhanga J, Kakooza S, Wampande E, *et al.* Emergence of multi-acaricide resistant *Rhipicephalus* ticks and its implication on chemical tick control in Uganda. *Parasit Vectors* 2016;9(4).
18. Sagar SV, Saini K, Sharma AK, Kumar S, Kumar R, Fular A, *et al.* Acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus* collected from selected districts of Madhya Pradesh, Uttar Pradesh and Punjab states of India. *Trop Anim Health Prod* 2020;52(2):611-618.
19. Laing R, Gillan V, Devaney, E. Ivermectin - Old Drug, New Tricks? *Trends Parasitol* 2017;33(6):463- 472.
20. Bisset JA, Rodríguez MM, Piedra L, Fuentes I, Martínez Y, Gutiérrez G, Hernández N, García-García I. Selection of a strain sensitive to insecticides of *Aedes albopictus* as a reference to resistance studies in this species. *Rev Cubana Med Trop* 2018;70(3):61-69.

21. Castro-Janer E, Rifran L, Gonzáles P, Niell C, Piaggio J, Gil A, Shumaker TTS. Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval immersion Test (LIT) in Uruguay. *Vet Parasitol* 2011;178(1-2):148-155.
22. Gaxiola-Camacho S, García-Vázquez Z, Cruz-Vázquez C, Portillo-Loera J, Vázquez-Peláez C, Quintero-Martínez MT, Rosario-Cruz R. Comparison of efficiency and reproductive aptitude indexes between a reference and field strains of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, in Sinaloa, Mexico. *Rev Bras Parasitol Vet* 2009;18(4):9-13.
23. Walsh TK, Hecke DG, Wu Y, Downes S, Gordon KHJ, Oakeshott JG. Determinants of insecticide resistance evolution: Comparative analysis among Heliothines. *Annual Rev Entomol* 2022;67:387-406.
24. Aguilar G, Olvera AM, Carvajal BI, Mosqueda J. SNPs and other polymorphisms associated with acaricide resistance in *Rhipicephalus microplus*. *Front Biosci Landmrk Ed* 2018;23(1):65-82.
25. Alonso-Díaz MA, Rodríguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H, Rosario-Cruz R. Resistencia de la garrapata *Boophilus microplus* a los ixodicidas. *Arch Med Vet* 2006;38(2):105-113.
26. Torrents J, Sarli M, Rossner MV, Toffaletti JR, Morel N, Martínez NC, *et al.* Resistance of the Cattle Tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* to ivermectin in Argentina. *Res Vet Sci* 2020;132: 332-337.
27. Valsoni LM, Green de Freitas M, Lino-Borges DG, de Almeida F. Status of *Rhipicephalus microplus* resistance to ivermectin, fipronil and fluazuron in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Rev Bras Parasitol Vet* 2021;30(1):e025220.
28. Villar D, Puerta J, López A, Chaparro JJ. Ivermectin resistance of three *Rhipicephalus microplus* populations. *Rev Colomb Cienc Pecu* 2016;29(1):51-57.
29. Robertson JL, Savin NE, Savin NE, Preisler HK. *Bioassays with Arthropods*. CRC Press. 2da ed. 2007.
30. Domínguez-García DI, Rosario-Cruz R, Almazán-García C, Saltijeral-Oaxaca J, De la Fuente J. *Boophilus microplus*: aspectos biológicos y moleculares de la resistencia a los acaricidas y su impacto en la salud animal. *Trop Subtrop Agroec* 2010;12(2):181-192.
31. Esparza-Rentería JA, Esparza-Sevilla EL. Susceptibility of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) to seven ixodicidas in Nuevo Leon, Mexico. *Rev Iberoam Cien Biol Agrop* 2015;4(8).

32. Estrada-Peña A, Rodríguez-Mallón A, Bermúdez S, de la Fuente J, Domingos A, Estrada-García MP, *et al.* One health approach to identify research needs on *Rhipicephalus microplus* ticks in the Americas. *Pathogenes* 2022;11(10):1180.
33. CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. Servicio Metrológico Nacional (SMN). Mapas de climatología 1981-2010. Evaporación promedio. México. 2023a.
34. CONAGUA. Comisión Nacional del Agua. Servicio Metrológico Nacional (SMN). Resúmenes Mensuales de Temperaturas y Lluvia. México. 2023b.
35. Furlong J, de Souza J. Carrapato: problemas e soluções. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite 1a Ed. Brasil. 2005.
36. Fernández-Salas A, Rodríguez-Vivas RI, Alonso-Díaz MA. First report of a *Rhipicephalus microplus* tick population multi-resistant to acaricides and ivermectin in the Mexican tropics. *Vet Parasitol* 2012;183(3-4):338-342.
37. Rodríguez-Vivas RI, Arieta-Román RJ, Pérez-Cogollo LC, Rosado-Aguilar JA, Ramírez-Cruz GT, Basto-Estrella G. Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* en el ganado bovino. *Arch Med Vet* 2010;42(3):115-123.
38. Yazwinski TA, Williams JC, Smith LL, Tucker C, Loyacano AF, Derosa A, Peterson P, Bruer DJ, Delay RL. Dose determination of the persistent activity of moxidectin long-acting injectable formulations against various nematode species in cattle. *Vet Parasitol* 2006;137(3-4):273-285.
39. Burger TD, Shao R, Barker SC. Phylogenetic analysis of mitochondrial genome sequences indicates that the cattle tick, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, contains a cryptic species. *Rev Molecular Phylogenetics Evolution* 2014;76:241-253.
40. Andreotti R, Koller WW, García MV. Carrapatos: protocolos e técnicas para estudo. Embrapa gado de corte. 1a ed. Brasília, DF. 2016.
41. Davey RB, Pound JM, Miller JA, Klavons JA. Therapeutic and persistent efficacy of a long-acting (LA) formulation of ivermectin against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and sera concentration through time in treated cattle. *Vet Parasitol* 2010;169(1-2):149-156.
42. Domínguez-Lara SA. El odds ratio y su interpretación como magnitud del efecto en investigación. *Ed Med* 2018;19(1):65-66.
43. Valenzuela, C. 2 solutions for estimating odds ratios with zeros. *Rev Med Chil* 1993; 121(12):1441-1444.

44. Lifschitz A, Virkel G, Ballent M, Sallovitz J, Imperiale F, Pis A, *et al.* Ivermectin (3.15%) long-acting formulations in cattle: Absorption pattern and pharmacokinetic considerations. *Vet Parasitol* 2007;147(3-4):303-310.
45. Yazwinski TA, Featherston H, Tucker C, Johnson Z. Residual nematocidal effectiveness of ivermectin in cattle. *Am J Vet Res* 1994;55(10):1416-1420.