

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 PARA *RHIPICEPHALUS (BOOPHILUS) MICROPLUS* DE LA FORMAMIDINA (AMITRAZ) EN DIFERENTES POBLACIONES DE LA ARGENTINA

CASTELLI, M. E.¹; MANGOLD, A. J.¹; NAVA, S.¹ & GUGLIELMONE, A. A.¹

RESUMEN

Se determinó la concentración letal 50 (CL 50) para el amitraz (Az) en poblaciones susceptibles de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (*R. (B) microplus*) utilizando tela de nylon (Type 2320, Cerex Advanced Fabrics, Pensacola, FL) impregnados con concentraciones crecientes de Az: 0,0005; 0,0010; 0,0020; 0,0039; 0,0078; 0,0156; 0,0313 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. En ocho poblaciones de *R. (B) microplus* se estimó las CL 50 y los intervalos de confianza del 95% derivados de la mortalidad de la poblaciones susceptibles de *R. (B) microplus* en relación a la dosis del acaricida, por medio del análisis "probit". El valor de la CL 50 y CL90 y los desvíos estandar correspondientes fueron: 0,00106 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 0,00038$ y 0,00397 $\mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 0,00144$, respectivamente. El valor obtenido se utilizó para evaluar la susceptibilidad/resistencia de poblaciones de otras procedencias, probando su eficacia como valor de referencia para monitorear "in vitro" poblaciones de *R. (B) microplus*.

Palabras clave: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, amitraz, concentración letal 50.

SUMMARY

Determination of lethal concentration 50 for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* of formamidine (amitraz) in different populations of Argentina.

The 50% lethal concentration (LC 50) of amitraz (Az) for *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (*R. (B) microplus*) susceptible population was determined using. Nylon fabric (Type 2320, Ceres Advanced Fabrics Pensacola, FL), impregnated with different concentrations of Az. The following

1.- INTA EEA Rafaela. C.C. 22. (2300) Rafaela, provincia de Santa Fe.

Email: mirtacastelli@wilnet.com.ar

Manuscrito recibido el 25 de octubre de 2012 y aceptado para su publicación el 8 de abril de 2013.

insecticide concentrations were utilized: 0.0005; 0.0010; 0.0020; 0.0039; 0.0078; 0.0156; 0.0313 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. The LC 50 was determined for Az in eight susceptible populations of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. The LC 50, LC 90 and standard deviation were: $0.00106 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 0.00038$ and $0.00397 \mu\text{g}/\text{cm}^2 \pm 0.00144$, respectively. The value obtained was used to evaluate the susceptibility / resistance of populations from other sources, testing its effectiveness as a benchmark for “in vivo” monitoring susceptibility in populations of *R. (B) microplus*.

Key words: *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, amitraz, lethal concentration 50.

INTRODUCCIÓN

Rhipicephalus (Boophilus) microplus (*R. (B) microplus*), la garrapata común del bovino, ocasiona perjuicios económicos directos e indirectos de gran magnitud a la ganadería, especialmente en zonas tropicales y subtropicales húmedas. Entre ellos se pueden mencionar las pérdidas en la ganancia de peso, de la producción láctea, importantes daños en los cueros que llegan hasta el descarte y los gastos que genera la aplicación de métodos de control (garrapaticidas, mano de obra e infraestructura, entre otros). Además *R. (B) microplus* es el vector de los agentes causales de la babesiosis bovina (*Babesia bovis* y *Babesia bigemina*) y está involucrado en la transmisión de *Anaplasma marginale*, agente causal de la anaplasmosis bovina.

En Argentina se utilizan actualmente varios principios activos para el control de *R. (B) microplus*, como piretroides, formamidinas, avermectinas, fenilpirazol y fluazuron. El 42,5% de los productores ganaderos usa piretroides, en tanto las formamidinas son aplicadas en un porcentaje menor (24,7%). Sólo el 3,7% emplea avermectinas para el control de las garrapatas; pero se incrementa el porcentaje cuando este principio activo se combina con piretroides (17,8%). El método de aplicación más utilizado es el baño de inmersión, el cuál supera en frecuencia de uso a los que emplean la vía tópica o las

combinaciones de inyectables con tópicos o con inmersión (Guglielmone *et al.*, 2007). Sin embargo, el amplio uso de los piretroides como método de control se encuentra limitado por la aparición de poblaciones de *R. (B) microplus* resistentes a este principio activo en Corrientes, Santa Fe, Salta, Chaco, Santiago del Estero y norte de Córdoba (Caracostantógolo *et al.*, 1996; Mangold *et al.*, 2000; Mangold *et al.*, 2004). Esta situación devino en la intensificación del uso del amitraz (Az) para los baños de inmersión.

El Az es una formamidina que pertenece a la familia química de las amidinas. Esta droga es más soluble en solventes orgánicos que en agua y se hidroliza fácilmente en medio ácido (Corta *et al.*, 1998; de Villiers *et al.*, 2004).

El Az actúa como agonista de la octopamina tanto a nivel central como periférico, inhibiendo la monoaminoxidasa (MAO). La octopamina es una amina adrenérgica natural de los invertebrados. Se encuentra en el ganglio cerebral y en otros sitios tales como el ganglio cardíaco. El acceso a la hemolinfa la convierte en una posible hormona moduladora de la actividad neuromuscular. En el sistema periférico, el Az puede imitar la acción de la octopamina, cumpliendo una función similar: modula la transmisión neuromuscular actuando por aumento de la liberación del neurotransmisor excitatorio (Evans & Gee, 1980). Debido

a la gran afinidad que posee el Az por los receptores octopaminérgicos (Hiripi *et al.*, 1999), el fármaco ejerce una estimulación continua mucho mayor a la que se da con la octopamina, provocando incoordinación muscular, parálisis y muerte del parásito. A esta acción letal se suma otra subletal, que consiste en modificación del comportamiento, hiperexcitación con desprendimiento del hospedador, disminución del consumo de alimentos y perturbación de los hábitos sexuales, menor cantidad de huevos por postura, menor viabilidad de las larvas (Anziani & Guglielmo, 2007). El Az es utilizado en medicina veterinaria y en agricultura. Actúa fundamentalmente por contacto sobre parásitos externos. La formamidina no es eficaz contra los dípteros, lo que origina la necesidad de un doble tratamiento al presentarse ambos tipos de parásitos. El uso prudente y adecuado de los garrapaticidas es la clave fundamental para dilatar todo lo posible la aparición de resistencia, teniendo en cuenta que ésta es irreversible.

El incremento de uso de Az y quizás un manejo poco conveniente del mismo produjo, recientemente, la aparición de una población de garrapatas resistentes al Az en el departamento Santo Tomé, provincia de Corrientes, con evidencia de falta de eficacia del principio activo a campo y por la confirmación mediante el test de Drumond (SENASA <http://www.senasa.gov.ar>). Esto evidencia la necesidad de desarrollar métodos precisos de diagnóstico de resistencia al Az para conocer el estado actual y la evolución de esta problemática en Argentina. El objetivo del presente trabajo es obtener la Concentración Letal 50 (CL 50) de Az para una población de *R. (B) microplus* aún susceptible al mismo, utilizando el Test de Paquetes de Larvas (LPT) modificado (Miller *et al.*, 2002), como prueba tamiz válida (Jonsson & Hope 2007). El resultado

se comparó con CL 50 de poblaciones *R. (B) microplus* de distintos orígenes para evaluar la susceptibilidad/resistencia al Az de cada una.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el desarrollo de la técnica se utilizaron especímenes de *R. (B) microplus* de la cepa Formosa (mantenida en INTA EEA Salta) susceptible a la cipermetrina y sin contacto previo con Az. En base a esta característica se la tomó como población de referencia para determinar la CL 50 para Az de cepas susceptibles. En concordancia con Miller *et al.* (2007), se eligió esta técnica porque junto a la de Soberanes (Soberanes-Céspedes *et al.*, 2002), serían las mejores para el estudio y evaluación de la magnitud y de los mecanismos de resistencia. Además, en el laboratorio se tiene amplia experiencia en la realización de la técnica del paquete de larvas, porque está implementada como prueba de rutina para diagnóstico de resistencia de *R. (B) microplus* a la cipermetrina.

La elección de las concentraciones para obtener un gradiente de mortalidad que permitieran un análisis "probit" se hizo en un ensayo preliminar con la población Formosa y la metodología del LPT modificado. Una vez definido que la menor dilución tendría una concentración de $0.0005\mu\text{g}/\text{cm}^2$, se procesaron garrapatas de la misma población obteniéndose CL50 y CL90 con un LC 95% para la cepa Formosa, susceptible al Az. Además, se evaluaron muestras de otras poblaciones de garrapatas remitidas por Médicos Veterinarios de dieciséis establecimientos con sospecha de resistencia a piretroides y de cuatro campos que habitualmente utilizaban Az para el control de la garrapata. Se colectaron entre 30 y 40 teleoginas de *R. (B)*

microplus, siendo cinco el número máximo colectado por animal. Las garrapatas se colocaron en estufa a 26° y 27° C y una humedad relativa entre 80 y 92 % para lograr la ovoposición y luego el nacimientos de larvas. Para el test de paquete de larvas modificado (LPT - modificado) se usaron larvas de 16-20 días de vida, siguiendo los procedimientos descriptos por Miller *et al.* (2002), y se utilizó como soporte tela de nylon (Type 2320, Cerex Advanced Fabrics, Pensa-cola, FL). Para el desarrollo de la prueba se preparó una solución con la concentración más alta de Az (0.0625 µg/cm²) y luego se hicieron una serie de diluciones al medio hasta la menor concentración (0.0005 µg/cm²). Se utilizó [N-metilbis (2,4 xililiminometil)amina] Az Técnico 98 % de pureza donado por Laboratorios OVER. Se usó como solvente tricloroetileno y aceite de oliva (2:1). Para realizar los controles se usaron los soportes de tela de nylon impregnados solamente con la mezcla de solventes. Se colocó 0,67 ml de cada dilución de Az o del solvente sobre una porción de 7,5 cm x 8,5 cm de tela de nylon. Después se expusieron por 2 horas a temperatura ambiente y extracción forzada de aire para la evaporación del tricloroetileno. Luego los soportes de tela de nylon se doblaron por la mitad y colocándose a los costados las pinzas sujetapapeles. Seguidamente se introdujeron alrededor de 100 larvas de *R. (B) microplus* y se selló la parte superior con otra pinza. Para cada concentración y los controles se utilizaron 3 papeles de nylon. Los “paquetes” conteniendo larvas se colocan en una incubadora a 27° C y 85 - 90% de humedad relativa. A las 24 horas se retiraron de la estufa, se abrieron y se contaron las larvas vivas y muertas.

Los análisis para estimar la concentración letal 50 (CL50) y concentración letal 90 (CL90) y los límites de confianza del 95% (LC95), se llevaron a cabo con el programa

Polo PC (Copyright 1987 Le Ora Software), por medio del análisis “probit” (Russell *et al.*, 1977).

Una vez determinada la CL 50 y CL90 de cada población se establece la Relación de Resistencia (RR) comparándola con la CL de la cepa susceptible (RR50/90 = CL 50/90 población en estudio/ CL50/90 población susceptible), que dimensionaría el grado de resistencia determinado por el test “in vitro” que podría tener la cepa en estudio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los valores de Los valores de CL50 y CL90 con un LC 95% para la cepa Formosa, susceptible al Az, se muestran en el Cuadro 1.

La CL 50 y CL 90 obtenida en estas condiciones permite establecer un valor de referencia para estudios posteriores de resistencia. Se observa que la CL50 obtenida con la cepa Formosa es menor que la CL50 de las cepa susceptibles: González (CL50 0,0070) y Muñoz (CL50 es 0.0024) de Texas de EEUU (Li *et al.*, 2004, 2005) y la cepa susceptible Nassandou de Nueva Caledonia (CL50 de 0.0070) (Ducornez *et al.*, 2005). En nuestro caso, la CL 50 de la cepa de referencia Formosa fue menor a los valores de las cepas susceptibles de EEUU y Nueva Caledonia. Esto resalta la importancia de la determinación de la CL 50 para cepas de referencia susceptibles de *R. (B) microplus* en el territorio donde se van a hacer las determinaciones de la resistencia al Az. Estandarizada la prueba y establecido el valor de la CL50 para Az de la cepa susceptible, se procedió a determinar, con el mismo procedimiento, la CL50 de poblaciones de garrapatas colectadas en los otros establecimientos. Los resultados de CL50 y CL 90 con el LC 95% y la RR 50 y RR

90 de las restantes poblaciones estudiadas se presentan en el Cuadro 2.

Desde el 2008 al 2011 se realizaron en el INTA Rafaela pruebas de resistencia a distintas muestras de garrapatas provenientes de varias localidades de la república Argentina, recogidas por profesionales de la actividad privada y por nuestro equipo de trabajo.

Coincidentemente con lo hallado por Guglielmone *et al.* (2007), en la mayoría de los establecimientos la droga más utilizada fue la cipermetrina y en algunos establecimientos el Az fue el garrapaticida de elección.

La mayoría de las poblaciones mostraron CL50 similares o incluso, inferiores a la cepa Formosa. Sin embargo, en cuatro establecimientos (Jesús María, Villa Ángela, Ñandubay y Curupí Porá), que habitualmente utilizaban Az, la CL50 fue superior e indicaría que las poblaciones de garrapatas

serían resistentes. Los establecimientos de Salta utilizaban acaricidas en base a piretroides y no había sospecha de resistencia. No obstante, una de las poblaciones de garrapatas (El Tunal) sería resistente al Az (CL50 0,0150). No se pudo recabar información respecto al uso de Az con anterioridad a la toma de la muestra; pero una causa probable podría haber sido la procedencia de los bovinos de otra región del país.

La RR de la CL50 (RR CL 50) y CL90 (RR CL 90) de cada población con la de referencia (cepa Formosa) permite evaluar la susceptibilidad/resistencia de cada una de las poblaciones. Los valores obtenidos se muestran en el Cuadro 2. En las poblaciones sometidas a tratamientos con piretroides, las RR fueron inferiores a 1,5, pero en las poblaciones en las cuáles se utilizaba habitualmente el Az, las RR fueron superiores a 2 en zonas menos favorables para el desarrollo de *R. (B.) microplus* y de baja intensidad de

Cuadro 1: Concentración letal 50 (CL 50) y concentración letal 90 (CL 90) (en $\mu\text{g}/\text{cm}^2$) y límite de confianza LC 95 para el Az, para la población susceptible de *R. (B.) microplus* (cepa Formosa).

Origen	CL50	LC 95	CL90	LC 95
INTA (EEA Salta)	0,00129	0,00056 - 0,00213	0,00504	0,00302 - 0,01336
INTA (EEA Salta)	0,00123	0,00043 - 0,00226	0,00618	0,00340 - 0,01679
INTA (EEA Salta)	0,00120	0,00090 - 0,00160	0,00401	0,00300 - 0,00500
INTA (EEA Salta)	0,00100	0,00004- 0,00130	0,00411	0,00225 - 0,01578
INTA (EEA Salta)	0,00100	0,00017- 0,00184	0,00194	0,00148 - 0,00316
INTA (EEA Salta)	0,00164	0,00092 – 0,00239	0,00482	0,00337 - 0,00779
INTA (EEA Salta)	0,00070	0,00019 – 0,00131	0,00355	0,00200 - 0,00812
INTA (EEA Salta)	0,00040	0,00007 - 0,00071	0,00213	0,00134 - 0,00403
Promedio	0,00106		0,00397	
Desvío Estándar	0,00038		0,00144	

tratamientos garrapaticidas. En la zona más propicia para el desarrollo de la garrapata, donde los tratamientos acaricidas son más frecuentes, los valores fueron superiores a 10. Este mayor contacto con el biocida incrementa el riesgo de la pérdida de eficacia del mismo, aumentando las posibilidades de selección de poblaciones de garrapatas resistentes a las formamidinas (Guglielmo-*ne, et al.* 2007).

CONCLUSIONES

La obtención de la CL 50 de referencia para nuestro país, mediante el Test de Paquetes de Larvas (LPT) modificado por Miller, es una herramienta efectiva para monitorear “in vitro” las variaciones de susceptibilidad / resistencia de diferentes poblaciones de *R. (B) microplus*.

Cuadro 2: CL 50 , CL 90 (en µg/cm2), LC 95% y RR 50 y 90 para Az en poblaciones de R. (B) microplus de diferentes establecimientos ganaderos. (En negrita se resaltan los establecimientos con poblaciones con sospecha de resistencia al Az).

Origen	CL 50	LC 95%	RR 50	CL 90	LC 95%
Jesús María (Córdoba)	0,00340	0,00150- 0,05700	3.20	0,02168	0,01287 – 0,05224
Guaycolec (Formosa)	0,00077	0,0006 - 0,00192	0.72	0,01338	0,00549 – 0,3746
Gato Colorado (Santa Fe)	0,00006	0,000 - 0,00028	0.06	0,00230	0,00074 – 0,00567
Gato Colorado (Santa Fe)	0,00033	0,00001 - 0,00100	0.31	0,00717	0,00296 – 0,05114
Villa Ángela (Chaco)	0,00066	0,00040 - 0,00092	0.62	0,00370	0,00261 – 0,00640
Chavarría (Corrientes)	0,00015	0,0002 - 0,00039	0.14	0,00712	0,00376- 0,01943
Estab. Caridad (Corrientes)	0,00010	0,00001 - 0,00023	0.09	0,00075	0,00039 – 0,00115
Estab. Porajú (Corrientes)	0,00012	0,00002 - 0,00033	0.11	0,00274	0,00147 – 0,00504
Villa Ángela (Chaco)	0,00220	0,00162 - 0,00491	2.07	0,03070	0,01130 – 0,64100
Curuzú Cuatiá (Corrientes)	0,00007	0,00000-0,00024	0.06	0,00148	0,00061-0,000337
J. V. González (Salta)	0,00140	0,00085 - 0,00210	1.32	0,00630	0,00410 – 0,01340
Villa Minetti (Santa Fe)	0,00000	0,0000 - 0,00005	-	0,00057	0,00007 – 0,00210
Puerto Irigoyen (Formosa)	0,00002	0,00000-0,00012	0.02	0,00084	0,01400-0,00120
Puesto Pacará (Salta)	0,00071	0,00009-0,00152	0.67	0,00411	0,00192-0,03935
El Galpón (Salta)	0,00018	0,00002 -0,00035	0.17	0,00087	0,00055 – 0,00150
Pampa del Infierno (Santiago del Estero)	0,00027	0,0003 - 0,00057	0.25	0,00246	0,00142 – 0,00622
El Tunal (Salta)	0,01500	0,01000 - 0,02200	14.1	0,02300	0,01800 – 0,05800
Ñandubay (Corrientes)	0,026000,0	0,01900 - 0,06900	24.5	0,06000	0,03400 – 0,60900
Reconquista (Santa Fe)	0,00076	0,00008-0,00182	0.71	0,00513	0,00219-0,02239
Curupí Porá (Corrientes)	0,02727	0,02100-0,03300	25.7	0,04323	0,03420-0,10380

AGRADECIMIENTOS

Se agradece a la señorita Estefanía Ugarte y al señor Fernando Seguro por su colaboración en la realización de los test de resistencia; a los Médicos Veterinarios Alberto Abeyá, Daniel Aguirre, Claudio Angelino, Augusto Daffner, Omar Ferrero, Analía Gaido, Mariano Lovisa, Oscar Nagel, Roberto Neumann, Horacio Obregón, Julio Reggi, Federico Sarmiento por el envío de garrapatas para su estudio y a Laboratorio OVER y a la señora Milena Aguirre de Laboratorios OVER por el envío de amitraz técnico 98% de pureza.

BIBLIOGRAFÍA

- ANZIANI, O. S. & GUGLIELMONE, A.A.** 2007. Resistencia a los antiparasitarios. En: Antimicrobianos y Antiparasitarios en Medicina Veterinaria. M San Andres Larrea y J.C. Boggio Ed. Inter.-Médica, Buenos Aires, Argentina, 749 pp.
- CARACOSTANTÓGOLO, J.; MUÑOZ COBEÑAS, M. E.; EDDI, C.; AMBRÚSTOLO, R. R.; BULMAN, G. M. & MARRANGUNICH, L.** 1996. Primera determinación en la República Argentina de una población de *Boophilus microplus* (Can.) resistente al piretroide sintético alfacipermetrina caracterizada mediante pruebas preliminares. *Vet. Arg.*, 13: 575-582.
- CORTA, E.; BAKKALI, A.; BERRUETA, L.A.; GALLO, B. & VICENTE, F.** 1999. Kinetics and mechanism of amitraz hydrolysis in aqueous media by HPLC and GC-MS *Talanta* 48:189 - 199 .
- DE VILLIERS, M.; VAN EEDEN, C.; LIEBERBERG, W.; SONG, M.; KOLLING, W. & CAIRA, M.** 2004. Structural characterization, physicochemical properties, suspension stability, and adsorption properties of four solid forms of amitraz. *J. Agric. Food Chem.* Vol 52 N°24:7362 - 7369.
- DUCORNEZ, S.; BARRÉ, N.; MILLER, R. J.; GARINE-WICHATITSKY.** 2005. Diagnosis of amitraz resistance in *Boophilus microplus* in New Caledonia with the modified Larval Packet Test. *Veterinary Parasitology* 130 : 285 - 292.
- EVANS, P. & GEE, J.** 1980. Action of formamide pesticides on octopamine receptors. *Nature* 287:60-62.
- GUGLIELMONE, A. A.; CASTELLI, M. E.; MANGOLD, A. J.; AGUIRRE, D.H.; ALCARAZ, E.; CAFRUNE, M. M.; CETRÁ, B.; LUCIANI, C. A. & SUÁREZ, V. H.** 2007. El uso de acaricidas para el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Carnestrini) (Acari :Ixodidae) en la Argentina *RIA*, 36 (1): 155-167.
- HIRIPI, L.; NAGY, L. & HOLLINGWORTH, R. M.** 1999. In vitro and in vivo effects of formamidines in locust (*Locusta migratoria migratorioides*). *Acta Biol Hung* 50 (1-3):81-87.
- JONSSON, N. N. & HOPE, M.** 2007. Progress in the epidemiology and diagnosis of amitraz resistance in the cattle tick *Boophilus microplus* *Vet. Parasitology* 146: 193-198.
- LI, A. Y.; DAVEY, R. B.; MILLER, R. J. & GEORGE, J. E.** 2004. Detection and characterization of Amitraz Resistance in the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae) *J. Med. Entomol.* 41 (2):193 - 200.
- LI, A. Y.; DAVEY, R. B.; MILLER, R.J. & GEORGE, J. E.** 2005. Mode of inheritance of amitraz resistance in Brazilian strain of the southern cattle tick, *Boophilus microplus* (Acari:Ixodidae). (2005) *Experimental and Applied Acarology* 37: 183 - 198.

- MANGOLD, A. J.; MUÑOZ COBEÑAS, M. E.; CASTELLI, M. E.; SCHERLING, N. J.; DELFINO, M. R. & GUGLIELMONE, A. A.** 2000. Resistencia a la cipermetrina en una población de *Boophilus microplus* Acari: Ixodidae) del norte de Santa Fe, Argentina. Rev. Med. Vet. (BsAs) 81: 259 - 261.
- MANGOLD, A. J.; CASTELLI, M. E.; NAVA, S.; AGUIRRE, D. H. & GUGLIELMONE, A. A.** 2004. Poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* resistentes a los piretroides en Córdoba y Salta Argentina. Revista FAVE Ciencias Veterinarias. 3:1 - 2.
- MILLER, R.; DAVEY, R. & GEORGE, J.** 2002. Modification of Food Agriculture Organization Larval Packet Test to measure amitraz susceptibility against Ixodidae. J Med Entomol. 39 (4):645-651
- MILLER, R.; DAVEY, R.; WHITE, H. & GEORGE, J.** 2007. A comparison of three bioassay techniques to determine amitraz susceptibility in *Boophilus microplus* J Med Entomol 44(2):283-294.
- RUSSELL, R. M.; ROBERTSON, J. L. & SAVIN, N. E.** 1977. Polo: a new computer program for probit analysis. Bull. Entomol. Soc. Am. 23: 209 - 213
- SENASA.** Foco de garrapatas del ganado bovino resistentes a los ectoparasiticidas cuya droga genérica es el amitraz Versión 16-12-2010. <http://www.senasa.gov.ar>
- SOBERANES-CÉSPEDES, N.; SANTAMARÍA-VARGAS, M.; FRAGOSO-SÁNCHEZ, H. & GARCÍA-VÁZQUEZ, Z.** 2002. Primer caso de resistencia al amitraz en la garrapata del ganado *Boophilus microplus* en México Téc Pecu Méx 40; 81-92.