

09-21-94 NORMA Oficial Mexicana NOM-006-ZOO-1993, Requisitos de efectividad biológica para los ixodicidas de uso en bovinos y método de prueba.

Al margen un sello con el Escudo Nacional, que dice: Estados Unidos Mexicanos.- Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-006-ZOO-1993, REQUISITOS DE EFECTIVIDAD BIOLOGICA PARA LOS IXODICIDAS DE USO EN BOVINOS Y METODO DE PRUEBA.

La Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, por conducto de la Dirección General Jurídica, con fundamento en los artículos 1o., 3o., 4o. fracción III, 12, 13, 16, 21 y 34 de la Ley Federal de Sanidad Animal; 38 fracción II, 40, 41, 43 y 47 fracción IV de la Ley Federal sobre Metrología y Normalización; 26 y 35 de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal; 10 fracción V del Reglamento Interior de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, y

CONSIDERANDO

Que es atribución de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos administrar los servicios de defensa y vigilancia de sanidad pecuaria.

Que entre los servicios de vigilancia se contempla la correcta aplicación de medidas de control químico para la operación de la Campaña Nacional contra la garrapata *Boophilus* spp.

Que los ixodicidas son productos químicos que pertenecen al grupo de los plaguicidas y por sus características de uso y aplicación son objeto de vigilancia por parte de diversas autoridades, a fin de garantizar al usuario su calidad y efectividad, dada su naturaleza tóxica, para prevenir los riesgos a la salud pública y los efectos adversos al medio ambiente.

Que en 1975 el Gobierno Federal creó el Fideicomiso Campaña Nacional contra la Garrapata, con la finalidad de establecer la lucha organizada contra la garrapata en todo el territorio nacional.

Que a partir del establecimiento de la campaña nacional se decidió establecer como elemento principal de control la utilización de baños de inmersión por periodos de 14 a 21 días, de acuerdo con la zona geográfica. Los ixodicidas autorizados fueron los organofosforados.

Que en 1981 se detectó el primer caso de resistencia de garrapata *Boophilus* a organofosforados, y en 1985 se conoció la distribución de la resistencia en diversas regiones de la República Mexicana.

Que en 1987, a efecto de regular el ingreso de nuevos ixodicidas en el mercado nacional y determinar su efectividad para el control de garrapatas *Boophilus*, se publicó el manual de procedimientos para el registro de nuevos ixodicidas para apoyar las acciones de campaña.

Que la utilización de productos ixodicidas en la industria pecuaria hace necesario definir las características de efectividad biológica para combatir a la garrapata mediante una campaña permanente e identificar la resistencia a los ixodicidas en diversas regiones del país.

Que para conseguir los propósitos enunciados he tenido a bien expedir la Norma Oficial Mexicana que establece los requisitos de efectividad biológica para los ixodicidas de uso en Bovinos y Métodos de prueba.

INDICE

1. Objetivo y Campo de Aplicación
2. Referencias
3. Definiciones

4. Consideraciones Generales
5. Procedimientos para el Inicio de las Pruebas
6. Requisitos de Efectividad Biológica
7. Metodo de Evaluación Biológica
8. Sanciones
9. Concordancia con Normas Internacionales
10. Bibliografía
11. Disposiciones Transitorias

1. Objetivo y Campo de Aplicación.

1.1. La presente Norma es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto establecer los métodos de prueba y los parámetros de efectividad biológica que deben cumplir los productos ixodicidas para uso en bovinos.

Los ixodicidas de uso en medicina veterinaria, cuya finalidad sea el control de la garrapata *Boophilus* spp. y/o *Amblyomma* spp. en ganado bovino, que pretendan la aprobación oficial ante la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, serán objeto de esta Norma, independientemente de su presentación, familia química y formulación.

Los productos mosquicidas de uso pecuario, en cuya formulación se utiliza un principio activo con efecto garrapaticida, deberán sujetarse a lo establecido en la presente Norma.

1.2. La vigilancia de esta Norma corresponde a la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, así como a los gobiernos de los estados, en el ámbito de sus respectivas circunscripciones territoriales, de conformidad con los acuerdos de coordinación respectivos.

1.3. La aplicación de las disposiciones previstas en esta Norma compete a la Dirección General de Salud Animal, así como a las Delegaciones de la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos, en el ámbito de sus respectivas circunscripciones territoriales.

2. Referencias.

Para la correcta aplicación de esta Norma deberán consultarse las siguientes normas oficiales mexicanas:

NOM-Y-295-1988 Plaguicidas-productos para uso agrícola, forestal, pecuario, de jardinería y urbano-etiquetado.

NOM-Y-302-1988 Plaguicidas clasificación toxicológica.

NOM-Y-308-1988 Plaguicidas-almacenamiento-medidas de seguridad, higiene y de protección al ambiente.

NOM-003-ZOO-1993 Criterios para la operación de laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria.

NOM-EM-004-SARH/1994 Campaña Nacional contra la Garrapata *Boophilus* spp.

3. Definiciones.

Para efectos de esta Norma, se entiende por:

3.1. Análisis Probit: Metodología estadística que permite calcular los parámetros de las curvas dosis mortalidad 50, 90 y 99%, así como estandarizar los experimentos y los análisis que se lleven a cabo en cualquier lugar del mundo.

3.2. C.I.O.: Significa la concentración de inhibición de la oviposición, y es un parámetro utilizado para estimar el porcentaje de huevos ovipositados en un lote tratado, con respecto al lote control.

3.3. C.I.E.: Significa la concentración de inhibición de la eclosión, y es un parámetro utilizado para estimar el porcentaje de emergencia de larvas en un lote tratado, con respecto al lote control.

3.4. Dirección: La Dirección General de Salud Animal.

3.5. Ingrediente activo: Componente químico que confiere a cualquier compuesto el carácter plaguicida específico del mismo.

3.6. Ixodicida: Plaguicida destinado a prevenir, controlar o combatir las infestaciones debidas a las garrapatas.

3.7. Ixodicida formulado: Producto resultante de la combinación del plaguicida técnico con otros ingredientes, que por sus características físicas, químicas y, en su caso, biológicas, está listo para su dilución y/o aplicación por el consumidor.

3.8. Laboratorio aprobado: Laboratorio reconocido por la Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos para realizar servicios de constatación en materia zoonosanitaria.

3.9. Material biológico: Organismos y microorganismos vivos que son utilizados para la ejecución de los ensayos a que se refiere la prueba biológica.

3.10. Muestreo de bandera: Metodología utilizada para estimar la densidad poblacional de las fases de vida libre de los ixodicidas en su hábitat natural.

3.11. Norma: La Norma Oficial Mexicana que establece los Requisitos de efectividad biológica para los ixodicidas de uso en bovinos y método de prueba.

3.12. Plaguicida: Es una sustancia o compuesto que se destina a prevenir, controlar o combatir cualquier plaga, incluidos los vectores.

3.13. Plaguicida técnico: Es la máxima concentración del ingrediente activo, obtenida como resultado final de su fabricación, a partir de la cual se inicia la preparación de una fórmula plaguicida. Por su estado físico, puede ser sólido, líquido o gaseoso.

3.14. Prueba biológica: Examen o constatación a la que es sometido un producto químico farmacéutico o biológico, que mediante un diseño experimental que involucra organismos vivos, se confirma la eficacia o efectividad del producto para el control de la plaga o agente causante de la enfermedad.

3.15. Prueba de campo: Modalidad de la prueba biológica realizada bajo condiciones en que se encuentran naturalmente los animales, que implica una infección natural de los mismos.

3.16. Prueba de establo: Modalidad de la prueba biológica, que es realizada en su totalidad bajo condiciones controladas, tanto de manejo de los animales, como de exposición al agente productor de la enfermedad.

3.17. Prueba de laboratorio: Modalidad de la prueba biológica, en que el ensayo es realizado en su totalidad bajo condiciones de laboratorio.

3.18. Secretaría: La Secretaría de Agricultura y Recursos Hidráulicos.

4. Disposiciones generales.

4.1. Las pruebas biológicas a las que estarán sujetos los productos a evaluar serán de laboratorio, establo y campo; sin embargo, dependiendo del grupo químico y de la presentación farmacéutica del producto, las pruebas sólo podrán ser de establo y campo.

4.2. Todos los ixodicidas cuya formulación sea para uso en baños de inmersión estarán sujetos a pruebas de estabilidad físico-química, independientemente de la familia o grupo al que pertenezcan.

Si el laboratorio solicitante de la regulación ha realizado previamente este tipo de ensayos, deberá presentar la documentación que demuestre haber realizado las determinaciones de estabilidad en un laboratorio de pruebas aprobado.

La empresa solicitante de la regulación, previo a la ejecución de las pruebas de estabilidad, deberá presentar documentación técnica que demuestre haber realizado pruebas de estabilidad en sus laboratorios de control interno. Una vez cubierto este punto, se preparará un protocolo adecuado al tipo de producto a evaluar, para ello, el laboratorio solicitante de la regulación ofrecerá la metodología analítica y proporcionará los estándares de referencia para establecer la técnica de análisis.

Las pruebas que deberán realizarse son las de estabilidad acelerada en el laboratorio y la de estabilidad en baño de inmersión, del cual deberán tomarse muestras durante un lapso mínimo de 6 meses.

4.3. Las pruebas de evaluación biológica serán necesarias para demostrar la efectividad en el control de la garrapata *Boophilus* spp; sin embargo, si el laboratorio solicitante desea que en el marbete del producto y en su publicidad se establezca que es recomendado para el control de la garrapata *Amblyomma* spp., deberá cumplir con las mismas pruebas establecidas en esta Norma.

4.4. Aquellos plaguicidas cuya presentación sea en aretes de liberación lenta, no se podrán utilizar para el control de garrapatas y moscas.

4.5. Los plaguicidas aprobados como acaricidas, mosquicidas y endectocidas de uso pecuario, en cuya formulación se incluya un ingrediente activo con actividad ixodocida y que no hayan aprobado como tales, deberán incluir en su etiqueta y publicidad impresa, una leyenda que especifique: "Este producto no deberá ser utilizado para el tratamiento de infestaciones por garrapata".

4.6. Los ixodicidas candidatos a la aprobación deberán ser evaluados según los términos de la presente Norma, con cepas caracterizadas en México, sensibles y resistentes a ixodicidas piretroides, organofosforados y/o amidinas, esto último en caso de que surgieran en territorio nacional garrapatas resistentes a la familia de las formamidinas.

4.7. En el caso de las vacunas contra la garrapata que no son garrapaticidas químicos, deberán ser evaluadas para su regulación, debido a que están destinadas al control de garrapatas *Boophilus* spp. La evaluación deberá realizarse en establo y campo, para ello el laboratorio de pruebas preparará un protocolo apegado, en lo general, a la metodología establecida en el texto de la presente Norma. Dicho protocolo deberá ser discutido y convenido con el laboratorio que presenta la solicitud de regulación. Los elementos básicos que debe contener el protocolo son:

a) La vacuna será evaluada con al menos cuatro cepas de referencia como son: Tuxpan, Tempoal, Susceptible y La Mora.

b) Producto de la evaluación: se deberá lograr al menos un 80% promedio de control sobre garrapata *Boophilus*.

c) La aplicación de la vacuna no deberá provocar lesiones o reacciones secundarias imputables a la vacunación.

5. Procedimiento para el Inicio de las Pruebas.

5.1. El laboratorio interesado deberá enviar al laboratorio aprobado lo siguiente:

- a) Una muestra del producto formulado, previamente valorado y con el certificado analítico de la muestra.
- b) Información sobre las características químicas, fisicoquímicas, de estabilidad, farmacológicas, toxicológicas, de efectividad biológica; así como la concentración de residuos en tejidos y fluidos de origen animal en el producto a evaluar.

6. Requisitos de Efectividad Biológica.

El porcentaje de efectividad promedio de todas las pruebas sobre el potencial reproductivo mínimo que deberá lograr un producto en la evaluación en garrapatas *Boophilus* spp., será de 98%*; si éste fuera inferior en algún ensayo de los obligatorios pero no menor a 95%, se considerará en función de los otros resultados obtenidos en las pruebas. Para el caso de *Amblyomma* spp., el porcentaje mínimo a obtener deberá ser de 80 % de efectividad sobre la replesión y 90 % sobre el potencial reproductivo.

7. Evaluación Biológica.

7.1. Pruebas de laboratorio.

7.1.1. Inmersión de hembras repletas a la concentración recomendada.

El objetivo de esta prueba es determinar el porcentaje de control que ofrece un producto a la concentración comercial recomendada sobre garrapatas hembras repletas *Boophilus* spp. y *Amblyomma* spp., bajo el siguiente procedimiento:

a) Selección del material biológico.

Se seleccionan las garrapatas hembras eliminando aquellas demasiado pequeñas o muy grandes, deformes o con claros signos de estar dañadas. Para cada producto a evaluar se necesitan lotes de 50 especímenes dividiéndolos en cinco grupos de 10 garrapatas cada uno y otros más como testigos.

Las hembras ingurgitadas se pesan en una balanza analítica y se colocan en cajas petri de 9.0 cm de diámetro con un papel filtro Whatman No. 1 en el fondo, cada una de las cajas se identifica debidamente con los siguientes datos: lote, grupo, cepa, producto utilizado, concentración y fecha de tratamiento. Los datos de los pesos se anotan en un formato, el cual contendrá la información adicional arriba mencionada.

Como requisito mínimo se considera necesario desafiar cada producto con los siguientes géneros, especies y cepas de garrapatas: *Amblyomma cajennense*, *Boophilus annulatus* cepa susceptible, *Boophilus microplus* cepa susceptible,

Para el caso de *Boophilus*, el porcentaje de efectividad propuesto se basa en experiencias obtenidas en los laboratorios de Centro Nacional de Servicios de Constatación en salud Animal. Solicitar un porcentaje de efectividad mayor, sería muy difícil de lograr para los ixodicidas y esto haría en muchos de los casos que tuviera que elevar sus concentraciones en partes por millón, lo cual sería de alguna manera riesgoso para la salud de los animales y de los encargados de aplicar los ixodicidas. Por otro lado, un producto que alcanza el 98%, garantiza que la descendencia no sobrevivirá y por lo tanto el control es mucho mayor al reducir drásticamente la población. Este es el caso más importante, debido a que existe una campaña contra *Boophilus* spp., donde lo que se busca es erradicarla en algunas zonas y no sólo controlarla.

Boophilus microplus cepa Tigra, Tuxpan, Tempoal y La Mora, dependiendo esta última del tipo de compuestos.

b) Preparación de compuestos.

Una vez que han sido pesados los grupos, seleccionados e identificados como testigos y tratados, se procederá a preparar el ixodicida a evaluar. Para este tipo de ensayos se requiere un mínimo de 250 ml de solución para tratar a 50 especímenes. La mezcla se afora con agua destilada para llevarla al volumen final.

c) Tratamiento.

En un frasco de vidrio limpio de boca ancha tipo "Gerber", se añade una porción de la solución garrapaticida, en la que se sumergen los especímenes de un grupo durante un minuto; transcurrido este tiempo, se vacía el contenido en otro recipiente provisto de un colador, eliminando el excedente sobre un papel secante. Las garrapatas se alojarán en su caja de petri respectiva y el grupo testigo se tratará con agua solamente.

d) Incubación.

Todas las cajas con las garrapatas tratadas se colocan en una estufa de incubación a una temperatura de 27°C y una humedad relativa de 80%; catorce días después del tratamiento, se evalúa la capacidad del producto de inhibir la oviposición en las garrapatas tratadas. Este día se procede a retirar los huevos ovipositados, los cuales se pesan y se colocan en viales de vidrio que se tapan con una torunda de algodón, incubándose bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad antes descritos. Los pesos de los huevos se registran en las formas específicas.

Para determinar el efecto sobre la eclosión de los huevos se mantienen en la estufa durante 25 días; transcurrido ese tiempo, se procede a sacrificar por congelación las larvas resultantes tanto de los grupos testigos como los tratados. Una vez secos los viales, el contenido se homogeniza perfectamente y se toman 5 alícuotas para realizar los conteos de cascarones y huevos en cada uno de ellos; de esta manera se calcula el porcentaje de eclosión alcanzado en cada grupo y lote.

e) Análisis de resultados.

Con los datos del peso de garrapatas en cada grupo y el peso de la oviposición, se calcula el porcentaje de inhibición de oviposición como sigue, aplicando la siguiente fórmula:

$$P_{Lt} - P_{HLt}$$

$$\% \text{ I.O.} = \frac{\quad}{\quad} \times 100$$

$$\frac{p_{LT} - p_{HLT}}{\quad}$$

Donde:

P_{Lt} = Peso de hembras del lote tratado.

P_{LT} = peso de hembras del lote testigo.

PH_{Lt} = Peso de huevos del lote tratado.

PH_{LT} = Peso de huevos del lote testigo.

Para determinar el porcentaje de control es necesario calcular la reproducción estimada por un grupo, mediante la fórmula propuesta por Drummond, en donde:

peso de huevos

$$RE: \frac{\quad}{\quad} \times 20,000 \times \% \text{ de Eclosión}$$

peso de hembras por grupo

Una vez calculadas las RE de ambos lotes, tratados y testigos, se procede a calcular el porcentaje de control como sigue:

$$\%C = \frac{RET - RE_t}{RET} \times 100$$

Donde:

RET= Reproducción estimada en el lote testigo.

RE_t= Reproducción estimada en el lote tratado.

De esta manera se obtiene el parámetro principal de la evaluación "in vitro" de ixodicidas a la concentración recomendada para su uso en los animales, sobre garrapatas hembras repletas.

f) Rango de aceptación.

100% de control obligatorio.

7.1.2. Bioensayos con concentraciones múltiples.

El objetivo de este ensayo es conocer la capacidad de oviposición de las garrapatas tratadas a la concentración comercial recomendada de un producto dado, así como el establecer las C.I.O. y C.I.E. 50%, 90% y 95%, utilizando diferentes concentraciones del ixodicida, para ubicar la concentración comercial en una línea de regresión y determinar a la vez la tendencia natural de respuesta de las hembras repletas al producto. Los resultados son sometidos al análisis probit para determinar los estimadores de la regresión y concentraciones de respuesta.

La prueba se realizará bajo el siguiente procedimiento:

a) Selección del material biológico.

Para cada producto a evaluar se requieren por lo menos 6 grupos experimentales, incluyendo cada uno 50 hembras repletas como mínimo. A diferencia de la prueba biológica, todos los lotes de garrapatas seleccionadas y homogeneizadas serán tratados con un solo producto, pero con diferentes concentraciones como lotes de garrapatas.

b) Preparación del producto.

Se prepara la concentración recomendada por el laboratorio productor; o bien, de acuerdo a las experiencias propias, se utilizará aquella que se conozca que inhibe el total de la oviposición en una cepa susceptible.

Una vez preparada la primer dilución en el matraz A, se pasa el 60% a un segundo matraz B, el cual se afora hasta completar el volumen medido de su capacidad con agua destilada y se agita. El mismo procedimiento se realiza en el matraz C, continuando así hasta completar el número de diluciones que se requiere para el bioensayo.

c) Tratamiento.

Con la serie de diluciones preparadas se realiza el tratamiento de los distintos lotes en igual forma como se describe en la prueba de inmersión de hembras repletas, debiendo empezar el tratamiento con el lote testigo en agua destilada y posteriormente se sigue de la dilución más baja a la más concentrada.

d) Incubación/seguimiento "in vitro".

Todas las cajas con las garrapatas tratadas, se alojarán bajo las mismas condiciones de temperatura y humedad relativa anteriormente descritas, retirándose la oviposición a los 14 días y los huevos incubados se dejan por 25 días. La determinación de la eclosión se realiza en la misma forma para la prueba biológica, vaciándose los datos a formatos especiales, diseñados para el manejo de la información resultante.

e) Análisis de resultados.

Para poder evaluar la concentración de la inhibición de la CIO 50%, 90% y 99%, son necesarios los siguientes datos:

Concentraciones utilizadas, número de garrapatas por lote y los distintos porcentajes de respuesta obtenidos en el bioensayo. Una vez determinados los porcentajes de eclosión por lote y concentración se calculará la reproducción estimada, y al final los porcentajes de control.

Con todos estos resultados se procederá a aplicar el análisis probit para establecer la tendencia de la respuesta calculando las CIO y la CIE 50%, 90% y 99%.

7.2. Pruebas en vivo.

7.2.1. Prueba de cámaras para evaluación de productos para tratamiento de aspersión o inmersión.

El objetivo de esta prueba consiste en la evaluación de un ixodicida al ser aplicado en áreas seleccionadas de un bovino infestado artificialmente previo al tratamiento, de tal forma que al momento de administrar el producto sea posible conocer su efectividad sobre los diversos estadios de desarrollo de las garrapatas. Esta prueba fue adaptada de la propuesta realizada originalmente por Dowing y cols., con el fin de realizar ensayos con productos químicos en áreas localizadas de un bovino, en las cuales se practican infestaciones artificiales periódicamente, previas al tratamiento.

La prueba proporciona información útil acerca de la efectividad que alcanzan productos ixodicidas cuando son aplicados en bovinos o sobre tales áreas y en las cuales se encuentran presentes garrapatas en distintos estadios de desarrollo parásito, incluyendo aquellas en fase de muda. Por otro lado, la oportunidad de realizar seguimientos "in vitro" de los especímenes colectados durante el periodo posterior al tratamiento, complementa y enriquece los resultados de estas evaluaciones.

a) Selección del material biológico.

Se utilizarán 6 bovinos de razas europeas con un peso de 200-300 kg, los cuales serán mantenidos durante la ejecución de la prueba en infestaderos especiales con agua y alimento de alta calidad, proporcionada "ad libitum".

Garrapatas: La elección se realizará previa realización de la prueba. Las garrapatas a utilizarse deberán ser de uno o varios géneros o cepas de una misma especie, descritas en el inciso a) del punto 7.1.1. de esta Norma.

b) Preparación de los animales.

Sobre el dorso y lomo de los animales, se seleccionarán de 4 a 6 partes que ofrezcan las mejores condiciones para la prueba, trazándose sobre cada uno un círculo de aproximadamente 20 cm de diámetro; alrededor de los círculos se rasura una franja de 4-5 cm de ancho, para facilitar el pegado de las mangas de tela.

Las mangas se confeccionan con tela de punto, la cual proporciona la elasticidad requerida en su manejo y evita el escape de larvas. Dichas mangas se adhieren utilizando pegamento de contacto, un día antes de iniciar las infestaciones, con el fin de favorecer la volatilización de los solventes presentes en el adhesivo.

c) Sistema de infestaciones.

Generalmente en los trabajos con *Boophilus* se realizan 10 infestaciones cada tercer día para cumplir un periodo de 27 días entre la primera y la última infestación. Esto permite que la mayoría de los especímenes de las primeras infestaciones completen su fase parásita y puedan ser utilizados como controles para determinación de efectividad. En cada infestación se colocan por cámara entre 15 y 20 mg de larvas, que equivalen aproximadamente a 500-650 especímenes, entre 15 y 45 días de eclosionadas.

En el caso de *Amblyomma*, se aplica el procedimiento de infestaciones siguiente: Una vez que se encuentran fijadas las mangas, se colocan entre 100 y 120 machos de la especie *Amblyomma* con la que se vaya a trabajar; 5 días después se realiza la primera infestación con 40-50 hembras, la cual se repite en dos ocasiones más, con intervalo de 3 días. Si además se desea probar el efecto de un producto sobre fases inmaduras, se realizan infestaciones con ninfas y larvas, 3 y 2 días antes de que se aplique el tratamiento, colocando en cada ocasión 400 ninfas y 20 mg de larvas.

d) Tratamiento.

La aplicación de productos químicos en los animales o sobre las áreas infestadas se realiza de acuerdo con las recomendaciones y posología o concentración sugerida por el laboratorio productor.

En caso de ixodicidas convencionales, se utilizan 500 ml de líquido preparado para cada cámara, retirando la manga de infestación, el cual se aplica mediante una aspersora de gatillo con la apertura de boquilla que facilite una buena impregnación del área sujeta a tratamiento. Las áreas seleccionadas como testigo serán asperjadas solamente con agua, utilizando el mismo volumen indicado para el producto.

e) Seguimiento.

Una vez que los animales o las áreas han sido tratados, se adhieren nuevas mangas, iniciando así el periodo de observaciones sobre el efecto de las garrapatas. Diariamente se realizarán colectas de todos los especímenes que se desprendan, registrándose y clasificándolos de acuerdo con sus características y condiciones. Las hembras repletas y semirrepletas que presenten signos vitales serán alojadas en cajas de petri, colocándose en incubadora bajo condiciones ambientales óptimas, con objeto de que continúen su ciclo biológico. También es registrado el peso de la oviposición y el porcentaje de eclosión alcanzado por estos especímenes.

f) Evaluación de resultados.

Los datos obtenidos en los seguimientos de pre y pos-tratamiento en los grupos testigo y tratado serán utilizados para realizar comparaciones en los parámetros biológicos siguientes:

- Número de garrapatas producidas.

- Efecto sobre la oviposición en las garrapatas del grupo tratado, que alcancen repleción pese a la aplicación del producto químico a evaluar.

- Potencial reproductivo obtenido en base al número de larvas viables que se produzcan en cada grupo de trabajo.

Los parámetros biológicos propuestos se calcularán de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

- Efecto sobre la repleción:

$$A \times D$$

$$\% \text{ de E} = 100 \left[1 - \frac{A \times D}{B \times C} \right]$$

$$B \times C$$

Donde:

A = Número de garrapatas en el lote testigo pretratamiento

B = Número de garrapatas en el lote testigo postratamiento

C = Número de garrapatas en el lote tratado pretratamiento

D = Número de garrapatas en el lote tratado postratamiento

- Efecto sobre la oviposición:

$$O / P T - O / P t$$

$$\% \text{ I.O.} = \frac{\quad}{\quad} \times 100$$

$$O / P T$$

Donde:

I.O. = Inhibición de la oviposición

O / P = Peso de huevos/peso de garrapatas x 20,000

T = Lote testigo

t = Lote tratado

- Efecto sobre el potencial reproductivo:

$$A(XL) \times D (XL)$$

$$\% E / P.R. = 100 [1 - \frac{\quad}{\quad}]$$

$$B(XL) \times C (XL)$$

Donde:

A,B,C,D, son los mismos parámetros para calcular efectividad.

(XL) = Número promedio de larvas, que se calcula de la siguiente manera:

$$(P.O. \times 20,000 \times F.C. \% \text{ Ecls.}) / \text{No. O}$$

P.O. = Peso de la oviposición

F.C. % Ecls. = Fracción centesimal del porcentaje de eclosión

No. O = Número de garrapatas hembras repletas seleccionadas

7.2.2. Prueba de establo con infestación libre.

Esta prueba está diseñada para evaluar el efecto de la aplicación simple de un producto ixodicida a una concentración o dosis determinada sobre animales infestados artificialmente de tal forma que, en el momento del tratamiento, se encuentren presentes en cantidades significativas todos los estadios de desarrollo de garrapata *Boophilus*, la cual deberá realizarse bajo el siguiente procedimiento:

a) Selección del material biológico.

Se utilizarán 6 bovinos de razas europeas con un peso de 200-300 kg, los cuales serán mantenidos durante la ejecución de la prueba en infestaderos especiales con agua y alimento de alta calidad, proporcionada "ad libitum".

Para las infestaciones se utilizan larvas de garrapatas *Boophilus* de cualquier cepa, cuyo comportamiento hacia productos químicos se conozca, o con la cual se desee realizar desafío. Su edad debe ser de entre 15 a 30 días de eclosionadas.

b) Alojamiento.

Los animales sujetos a experimentación son colocados en compartimientos específicos denominados infestaderos, donde es posible realizar los procedimientos de que consiste la prueba, con un mínimo de riesgos para los operarios y que a la vez permite al animal echarse o estar de pie. Los bovinos deben permanecer en estas condiciones durante toda la prueba.

c) Infestaciones.

Una vez que se cuenta con el número adecuado de animales se inicia el programa de infestaciones que consiste en colocar sobre el dorso y lomo de los animales, la cantidad de larvas previamente calculada, de acuerdo con el modelo de la prueba seleccionada.

Cada tercer día se colocan 500 mg de larvas, que equivalen a 10,000, realizándose de 9 a 10 infestaciones, dependiendo de la cepa utilizada; el tratamiento se aplicará 2 días después de la última.

Este sistema de infestación permite tener garrapatas repletas unos 6 a 8 días antes de aplicar el producto, que son necesarias como controles en los grupos testigo y tratado, así como para el cálculo de los porcentajes de efectividad diario, por fase y global. De estas garrapatas se toman alícuotas representativas de 30 especímenes al día por bovino, para mantenerlas en condiciones óptimas de temperatura y humedad, con objeto de que completen la fase reproductiva.

d) Tratamiento.

Con la finalidad de evitar diferencias significativas en cuanto a las condiciones y número de garrapatas por lote de trabajo, los bovinos sujetos a prueba se reparten de acuerdo a la media de garrapatas obtenidas en el periodo pretratamiento, de tal forma que sean lo más homogéneo posible.

La aplicación del producto químico se realiza de acuerdo a las condiciones y recomendaciones expresadas por el laboratorio productor, tanto en la posología o concentración, como en la vía de aplicación. El tratamiento se da al grupo de animales marcado como tratados, al segundo día de la última infestación programada.

e) Seguimiento.

Después de la aplicación del producto a evaluar, durante 25 días como mínimo se realizarán observaciones, conteos y colectas diarias de los bovinos; o bien, hasta que se dejen de obtener garrapatas repletas en todos los animales. Todos los especímenes producidos por el lote tratado, así como una alícuota significativa del testigo, se mantendrán en condiciones óptimas de temperatura y humedad para permitir que continúen su fase reproductiva.

Los datos derivados de las observaciones y colecta como: condiciones generales de salud de los bovinos; número y peso de garrapatas obtenidas; peso de la oviposición y porcentaje de eclosión por grupo de especímenes por día por animal, serán registrados en formas específicas para control adecuado de la información.

f) Evaluación de resultados.

Los datos obtenidos en los seguimientos de pre y pos-tratamiento en los grupos testigo y tratado serán utilizados para realizar comparaciones en los parámetros biológicos descritos en el punto 7.2.1. inciso f).

7.2.3. Prueba de establo para la evaluación de productos de aplicación tópica denominados Pour-on.

Mediante este tipo de ensayo, el ixodicida es desafiado sobre cantidades significativas de garrapatas en sus diferentes fases de desarrollo parásita como larvas, ninfas y adultos; aplicándose el tratamiento tal como lo sugiere el laboratorio productor, simulando condiciones naturales. Los indicadores biológicos de actividad a determinar son:

- Efecto diario, global y por fases de desarrollo, sobre el número de garrapatas que alcancen la repleción pese a la aplicación del producto.
- Efecto sobre la oviposición diaria, global y por fases en garrapatas hembras repletas.
- Efecto sobre el potencial reproductivo diario, por fases y global en garrapatas hembras repletas.
- Variantes en el peso diario en garrapatas hembras repletas postratamiento.

Esta prueba deberá realizarse bajo el siguiente procedimiento:

a) Selección del material biológico.

Se utilizarán 6 bovinos de razas europeas con un peso de 200-300 kg, los cuales serán mantenidos durante la ejecución de la prueba en infestaderos especiales con agua y alimento de alta calidad, proporcionada "ad libitum".

Las garrapatas que se utilizarán para las infestaciones serán larvas de garrapatas *Boophilus microplus* resistente a ixodicidas organofosforados y/o piretroides, con una edad aproximada de 15 a 30 días de eclosionadas.

b) Procedimiento de infestaciones.

El procedimiento de infestación consiste en colocar sobre el lomo y dorso de cada animal, la cantidad de 150 mg de larvas que equivalen a 5000 aproximadamente, cada dos, días hasta completar un total de once infestaciones.

Este sistema permite obtener garrapatas hembras repletas entre cuatro y seis días previos al tratamiento, las cuales son necesarias como controles en el grupo testigo y tratado, para hacer comparaciones válidas en ambos y estimando los parámetros biológicos establecidos con anterioridad.

c) Seguimiento pretratamiento.

Una vez detectada la presencia de garrapatas hembras repletas, se inicia el seguimiento que comprende el conteo y colecta en todos los animales de experimentación, cuyo procedimiento continuará de igual forma hasta el final de la prueba. El número de especímenes por conteo será registrado en las formas respectivas para este tipo de ensayo.

Dada la característica particular de aplicación y para determinar los indicadores de actividad propuestos, las observaciones, conteos y colectas, así como el seguimiento postratamiento, se llevará a cabo tomando en cuenta tres zonas corporales del bovino, de acuerdo al siguiente esquema:

Zona 1 Lomo y flancos

Zona 2 Cabeza, cuello y pecho

Zona 3 Entrepierna y vientre

d) Tratamiento.

Con el objeto de evitar variaciones significativas en cuanto a las condiciones y número de garrapatas por lote de trabajo, los bovinos serán agrupados de acuerdo al promedio general de especímenes registrados en el periodo de pretratamiento, de tal forma que sean lo más homogéneo posible. Tres días posteriores a la última infestación, los animales serán pesados para determinar la dosis de producto para cada uno. La aplicación del producto se llevará a cabo en la línea media del cuerpo, desde la cruz hasta la región caudal, de acuerdo a la posología propuesta por el laboratorio.

e) Seguimiento postratamiento.

Posterior a la aplicación del producto, se realizarán observaciones, conteos y colectas diariamente, hasta que ya no se obtengan hembras repletas en todos los animales y se indicará la procedencia de los especímenes colectados, que serán registrados según la región corporal donde se localicen. Las hembras repletas, una vez pesadas, se incubarán a $27^{\circ}\text{C} + 1$ y 80% H.R., para la continuación de su ciclo vital.

Con el objeto de detectar el efecto sobre la oviposición, a los 14 días posincubación, los huevos serán pesados y mantenidos en las condiciones anteriormente descritas, por 21 días, para calcular los porcentajes de eclosión respectivos. Ambos parámetros son útiles para calcular finalmente el efecto sobre el potencial reproductivo de los especímenes sujetos a tratamiento comparados con los controles.

f) Procesamiento de datos.

Con la información obtenida durante el ensayo se calcularán los parámetros biológicos propuestos con las mismas ecuaciones del punto 7.2.1. inciso f).

7.2.4. Prueba de campo para la evaluación de productos de inmersión o aspersión con garrapata *Boophilus* spp.

Estas pruebas están diseñadas con la idea de proporcionar un punto de vista objetivo sobre la efectividad de los productos cuando son aplicados en ganado naturalmente infestado y bajo condiciones de uso normales en el campo.

El objetivo de esta metodología es el de encontrar la concentración o dosis mínima que alcanza una efectividad igual o superior al 98%, para que de esta manera se pueda calcular el factor de garantía que el producto dado ofrece cuando se aplica siguiendo las instrucciones de uso. Esta prueba se realizará bajo el siguiente procedimiento:

a) Selección de material biológico.

Animales de experimentación: En estos ensayos se requiere utilizar bovinos infestados naturalmente, con un mínimo de 40 garrapatas por lado, en proceso de repleción final. La edad o sexo de los animales no representa, en este caso, ninguna limitación; sin embargo, es recomendable realizar las pruebas con ganado europeo de manejo para evitar trabajo excesivo en la manipulación de animales y conteo de especímenes.

Garrapatas: *Boophilus* spp.

b) Procedimiento experimental.

Los lotes de trabajo serán determinados de acuerdo con las condiciones especificadas de aplicación del producto a evaluar. En el caso de ixodícidas convencionales, se realizarán en la misma explotación, tratamientos por aspersión e inmersión, por lo que se deberán seleccionar predios que cuenten con las instalaciones adecuadas y un mínimo de 50 animales infestados, repartidos como a continuación se indica:

30 para tratamiento por aspersión.

20 para tratamiento por inmersión.

De los 30 bovinos seleccionados para la prueba de aspersión, deberán repartirse a su vez, en lotes de 5 animales cada uno, siguiendo el procedimiento de mantener una cantidad uniforme en todos. Uno de estos lotes será retenido como testigo y los otros cinco se utilizarán para ser tratados con cada uno a las cinco concentraciones diferentes del producto a evaluar. En la prueba de inmersión, 15 de los 20 animales seleccionados serán bañados y cinco permanecerán como testigos, sin recibir ninguna clase de manejo fuera de los conteos. Para la identificación de los animales, habrá que marcarlos con crayón para piel en la región pélvica, por ambos lados, y siguiendo una numeración progresiva.

Para ambos tipos de pruebas, los grupos testigos deberán colocarse en un potrero diferente a aquel destinado a los bovinos en experimentación, sobre todo en los casos que se tenga conocimiento acerca de propiedades volátiles de los productos, como en el caso de ciertos piretroides que puedan interferir en el curso de la evaluación.

Si el producto a probar requiere de un método de aplicación diferente, se seguirán criterios similares en cuanto a su posología para los dos grupos de trabajo señalados.

c) Conteos pretratamiento.

Con el objeto de determinar el número promedio de garrapatas *Boophilus* spp. En proceso de replesión final por animal previo al tratamiento, se realizarán al menos dos conteos por animal, un día antes y el día de la aplicación del producto. Sólo serán incluidas las hembras con un tamaño de 4.5 a 8 mm de longitud, que se encuentren localizadas en cualquiera de los dos lados en que pueda dividirse un animal, izquierdo o derecho, incluyendo además la cola desde los pliegues anales. Los conteos sucesivos deben realizarse en el mismo lado en que se iniciaron, haciéndolo general a todos los animales seleccionados para la prueba.

d) Tratamiento.

En todos los casos, independientemente del tipo de producto y su forma de aplicación, se considera indispensable la realización de tratamientos con cinco dosis o concentraciones progresivamente más bajas a la recomendada por el laboratorio, incluyendo ésta como la más elevada, para ser aplicada a lote de cinco animales infestados naturalmente en cada caso. Asimismo, en otro grupo de 25 animales se aplicará tratamiento de acuerdo a las recomendaciones y sugerencias de aplicación del laboratorio productor. Para ambos casos deberá contarse con lotes testigos que se encuentren en las mismas condiciones de parasitosis que los tratados.

e) Conteos postratamiento.

Con el fin de evaluar el efecto de los tratamientos aplicados, se realizarán conteos diarios durante los 7 días posteriores. Todas las hembras repletas que se encuentren durante estas prácticas deberán ser colectadas para llevar a cabo el seguimiento "In vitro". Si esto es posible, las observaciones sobre los animales incluidos en la prueba serán continuadas hasta el día 25 cada 48 horas.

f) Seguimiento clínico.

Tomando en cuenta los riesgos que los tratamientos pueden implicar para los animales sometidos a la prueba, se realizarán observaciones clínicas para detectar posibles consecuencias tóxicas en el periodo crítico después del tratamiento; para lo cual será necesario contar con los antídotos que permitan contrarrestar los efectos adversos.

g) Análisis de resultados.

Todos los datos derivados de la ejecución de la metodología expuesta serán anotados en hojas especiales de registro, para facilitar su procesamiento estadístico. Cuando el número de garrapatas presentes en los animales y las condiciones de la prueba lo permitan, se aplicará la forma de evaluación descrita para la prueba de establo; en caso contrario se utilizará la fórmula basada en la comparación del número de garrapatas presentes en los lotes tratados y testigo, antes y después del tratamiento.

7.2.5. Prueba de campo para la evaluación de productos de aplicación topical Pour-on.

El objetivo de la prueba es corroborar los resultados obtenidos en los ensayos de establo y determinar el comportamiento del producto bajo condiciones de campo.

A través de la prueba se busca determinar el efecto diario y global sobre la replesión de las hembras; así como determinar en garrapatas hembras repletas los efectos sobre la oviposición y el potencial reproductivo diario y global.

Este bioensayo, deberá realizarse bajo el siguiente procedimiento:

a) Selección del material biológico.

Los bovinos se elegirán de un rancho que reúna las siguientes características :

- Contar con un número de animales suficientes para seleccionar 30 con un mínimo de 40 garrapatas por lado en proceso de replesión. La edad o sexo de los animales no representa en este caso ninguna limitación.
- Posibilidad de separar físicamente el grupo tratado del control.
- Facilidades de manejo del ganado dentro del rancho, para realizar las observaciones durante el tiempo de la prueba.

Garrapatas: *Boophilus* spp. de campo.

b) Procedimiento experimental.

Se formarán dos grupos de animales, el primero con 10 bovinos no recibirá ningún tratamiento y será utilizado como control; los 20 restantes se tratarán con el producto a evaluar de acuerdo a las recomendaciones técnicas propuestas para su uso en campo.

Las observaciones postratamiento se llevarán a cabo los días 1, 3, 5, 7, 14 y 21 posteriores al tratamiento, con la finalidad de determinar el tiempo de protección a la reinfestación.

7.2.6. Prueba de establo para evaluación de garrapaticidas de aplicación sistémica mediante prueba de cámaras.

Mediante esta prueba, se pretende establecer los porcentajes de efectividad de los garrapaticidas administrados por vía parenteral. Los parámetros a valorar son los mismos que se determinaron en las pruebas de inmersión, aspersión o topicales, consistentes en:

- El porcentaje de supervivencia y efectividad diaria, por fase parásita y global sobre el total de garrapatas hembras que alcancen la replesión pese al tratamiento.
- El efecto sobre la oviposición diaria por fase parásita y global en garrapatas hembras repletas.
- El porcentaje de control diario, por fase y global sobre el potencial reproductivo en garrapatas hembras repletas.

Esta prueba deberá realizarse bajo el siguiente procedimiento:

a) Selección del material biológico.

Se utilizarán seis bovinos de raza europea con un peso aproximado de 300 kg, que serán alojados en infestaderos individuales para facilitar el manejo, los conteos y las observaciones diarias durante la fase experimental.

En los costados de cada animal se seleccionarán 4 áreas de infestación, en donde se procederá a afeitar una franja de 5 cm. de ancho, obteniéndose una zona central con pelo, de un diámetro aproximado de 88 cm². En cada uno de estos sitios se colocará una cámara de tela de 35 x 25 cm a manera de manga, fijándose ésta a la piel del animal con pegamento de contacto. El extremo libre quedará cerrado por medio de un hilo elástico para facilitar las observaciones y colectas de especímenes, así como para evitar la fuga de los mismos.

Garrapatas: *Boophilus microplus* cepa susceptible a ixodicidas organofosforados. *Boophilus microplus* cepa resistente a ixodicidas organofosforados y piretroides.

b) Procedimiento experimental.

Se realizarán 10 infestaciones en cada cámara los días lunes, miércoles y viernes, por un periodo de 30 días entre la primera y última infestación; colocándose 15 mg de larvas equivalentes a 450 especímenes, con una edad de 15 días de eclosionadas. Las cámaras del lado izquierdo serán infestadas con *Boophilus microplus* La Mora y las del lado derecho con *Boophilus microplus* susceptible, rotulando cada una con las iniciales de cada cepa.

c) Conteo pretratamiento.

Una vez detectada la presencia de garrapatas hembras repletas en las cámaras, se inicia el seguimiento diario que consiste en colectas y conteos de todos los especímenes recién desprendidos, siguiendo este procedimiento de igual forma hasta la culminación de la fase experimental en los infestaderos. El número de especímenes por conteo será registrado en las formas específicas. Las hembras repletas serán pesadas e incubadas en condiciones óptimas de temperatura y humedad relativa.

d) Tratamiento.

A tres días de iniciada la colecta de especímenes, se procederá a aplicar el tratamiento en 4 bovinos y los dos restantes serán controles, la aplicación del producto será por inyección subcutánea en la parte frontal o posterior de la escápula a la dosis recomendada por el laboratorio solicitante de la evaluación.

e) Conteo postratamiento

Los especímenes colectados en cada una de las cámaras durante esta fase de trabajo, serán clasificados y alojados en cajas de petri desechables de 100 x 15 mm. Las garrapatas hembras repletas se pesarán e incubarán a 27°C y 80 % de humedad relativa. A los 14 días posincubación, los huevos serán retirados y pesados, anotándose todos los datos resultantes en las hojas de registro respectivas.

Los huevos se alojarán en viales de vidrio e incubados en las condiciones de microambiente descritas con anterioridad, por 25 días, para posteriormente calcular los porcentajes de eclosión. Tanto la oviposición, como la eclosión, son parámetros biológicos necesarios para que finalmente, se pueda calcular el efecto total sobre el potencial reproductivo de los especímenes sujetos a tratamiento comparados con los controles.

f) Análisis de resultados.

Con la información obtenida durante el ensayo, se calcularán los parámetros biológicos propuestos con las mismas ecuaciones matemáticas del punto 7.2.3. inciso f).

7.2.7. Prueba de campo para evaluación de garrapaticidas de aplicación sistémica.

El procedimiento en su totalidad es similar al de las pruebas de campo para la evaluación de productos de aplicación topical, variando únicamente en lo relativo a la forma de aplicación del producto.

7.2.8. Prueba de campo para evaluación de garrapaticidas de aplicación mediante bolos de liberación lenta.

Tiene como finalidad determinar la efectividad de un ixodicida intraruminal de liberación lenta en ganado bovino naturalmente infestado, utilizando como parámetros de evaluación, los mismos que se usan en las otras pruebas de campo consideradas en esta Norma.

Esta prueba se realizará bajo el siguiente procedimiento:

a) Selección del material biológico.

Se seleccionarán 30 bovinos de la raza Pardo Suizo o similar, con un peso aproximado de 200 a 250 kg. Los animales que reciban el tratamiento no podrán ser utilizados para consumo humano por 210 días, a partir del día de que el bolo fue administrado.

Garrapatas: *Boophilus* spp. de campo.

b) Procedimiento experimental.

Debido a las características de este trabajo y a la limitada oportunidad de realizar observaciones frecuentes sobre los animales seleccionados, se utilizará un lote experimental con un mínimo de 20 bovinos y un grupo control con 5 o 10 animales. Como el tipo de tratamiento no implica alguna posible vía de contaminación de los animales testigos por parte de los tratados, no será necesaria la separación de los grupos de trabajo. La prueba tendrá una duración de 5 meses a partir del inicio de ensayo.

c) Conteos pretratamiento.

Antes de la administración de los bolos intraruminales con ivermectina y placebo, se deberán realizar dos conteos de garrapatas de ambos géneros, para lograr una mayor homogeneidad en los lotes experimentales y tener una referencia en los cálculos de efectividad respectivos.

En el caso de garrapatas *Boophilus* spp. sólo serán sujetos de registro aquellos especímenes en proceso de repleción con un tamaño entre 0.4 a 0.8 cm de largo y que se presenten en el lado derecho del animal, incluyendo cola y muslo. Para el caso de *Amblyomma* spp., se establece como necesario el conteo de las ninfas que se encuentren en proceso terminal de repleción, así como todos los adultos machos y hembras que se presenten en el mismo lado, considerado para conteo de *Boophilus* spp.

d) Tratamiento.

La administración de los bolos intraruminales se realizará a uno de los dos grupo dejando al otro como testigo, haciendo la aplicación se realizará de acuerdo a las instrucciones que al respecto proporcione el laboratorio productor, una vez que finalice el segundo conteo.

e) Conteos postratamiento.

Siguiendo los criterios señalados para el conteo de especímenes, se realizarán visitas de inspección los días 7, 14, 21, 42, 63, 84, 105, 120 y 135 para lograr un total de 9 observaciones, en un lapso de 4.5 meses. Siempre que sea posible, se realizarán colectas de especímenes para su seguimiento en el laboratorio aprobado, para determinar capacidad de muda en las ninfas, así como supervivencia y potencial reproductivo en los adultos.

f) Análisis estadístico.

Los resultados obtenidos serán sujetos a un análisis estadístico para determinar la efectividad del tratamiento en forma mensual y por el periodo total, aplicando las ecuaciones establecidas para cada uno los parámetros biológicos a consideración, como son: sobrevivencia, capacidad de muda, efectos sobre oviposición y potencial reproductivo.

7.2.9. Prueba de campo para evaluación de productos ixodicidas con garrapata *Amblyomma* spp.

En estas pruebas se sigue básicamente el patrón descrito para las evaluaciones de campo con *Boophilus*; requieren realizarse algunas modificaciones para ajustar la metodología de acuerdo a las condiciones particulares de la parasitosis por este género de garrapatas.

Esta prueba se realizará bajo el siguiente procedimiento:

a) Animales de experimentación.

El tipo de ganado y número de especímenes hembras de garrapata *Amblyomma* spp. serán iguales a los descritos en la prueba para *Boophilus* spp.

b) Lotes de trabajo.

El número de bovinos necesarios para la evaluación de tratamientos a la dosis o concentración recomendada y la propuesta para la prueba de subdosificaciones, no sufren modificaciones; sin embargo, para evitar la interferencia que en estos casos puede originarse por reinfestación de *Amblyomma*, las condiciones en cuanto a alojamiento de los bovinos seleccionados para estos ensayos deberán ser más rigurosas, ya que será necesario mantenerlos en potreros que se encuentren positivamente libres de garrapatas en fase de búsqueda de hospedero.

La determinación de esta condición será realizada a través de exámenes de la vegetación por medio de muestreos de bandera.

c) Conteos pretratamiento.

Para la evaluación de efectividad en *Amblyomma* serán considerados para conteo todas las hembras que se encuentren fijas sobre los bovinos, siendo suficiente realizar por lo menos un conteo previo a su tratamiento. La región anatómica podrá ser elegida por el experto encargado de la prueba, de acuerdo a las observaciones sobre la distribución de la carga parasitaria y será mantenida durante todo el desarrollo del ensayo. La asignación de animales para los lotes testigo y tratados seguirán los criterios estipulados para la prueba con *Boophilus* spp.

d) Tratamiento.

No se considera ningún cambio a lo establecido para la prueba con *Boophilus*.

e) Conteos postratamiento.

El efecto de los tratamientos se determinará por comparación de las condiciones vitales de las garrapatas, y el número de especímenes hembras que permanezcan sobre los animales pese a la aplicación del producto, para lo cual se realizarán conteos diarios durante un mínimo de 7 días. Al igual que lo señalado para la prueba con *Boophilus*, las garrapatas repletas que se encuentren en estos días de observación, deberán ser colectadas y llevadas al laboratorio para el seguimiento "In vitro".

f) Seguimiento clínico.

Será realizado bajo las mismas condiciones señaladas para la prueba con *Boophilus*.

g) Análisis de resultados.

Los parámetros biológicos a considerar en el análisis de los datos son:

- Capacidad de los tratamientos de inhibir los procesos de repleción en la hembras fijas, ya sea por efecto tóxico y/o mortalidad.

- Efecto en las garrapatas que logren su replesión pese al tratamiento, determinando los porcentajes de efectividad por comparación de los datos obtenidos en los lotes tratados y testigos.

8. Sanciones

El incumplimiento de la presente Norma se sancionará conforme a lo establecido en la Ley Federal de Sanidad Animal y en la Ley Federal sobre Metrología y Normalización.

9. Concordancia con Normas Internacionales

Esta Norma Oficial Mexicana no es equivalente con ninguna norma internacional.

10. Bibliografía

Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas. Fao, Roma, 1985.

Guidelines On Efficacy Data For The Registration Of Pesticides For Plant Protection. Fao, Roma, 1985

Manual de Procedimientos para el Registro de ixodicidas. Centro Nacional de Parasitología Animal. SARH. México. 1987.

The Pyrethroid Resistance Problem In The Horn Fly. Kunz, S.E. and Schmidt, Ch.D. Journal of Agriculture Entomology 2 (4):358-363. 1985.

11. Disposiciones Transitorias

Esta Norma entrará en vigor al día siguiente de su publicación en el Diario Oficial de la Federación.

Sufragio Efectivo No Reelección.

México, D.F., a 8 de agosto de 1994.- El Director General Jurídico, Guillermo Colín Sánchez.- Rúbrica.