

MINISTERIO DE EDUCACION SUPERIOR
ESTACION EXPERIMENTAL DE PASTOS Y FORRAJES

Maestría en Pastos y Forrajes
(VIII edición)

Proyecto de Tesis

Efecto de diferentes medios biológicos
en el control de las garrapatas de bovinos

ASPIRANTE
Ing. Juan Manuel Pérez León

TUTOR
Dra. Mildrey Soca Pérez

2007
“Año 49 de la Revolución”

Dedicatoria

A mis padres, por el apoyo que siempre me han brindado.

A mi esposa, por toda la dedicación y aliento que siempre me ha dado.

A mis hijos, que son mi razón de ser.

A mi hermano, por todo lo que significa para mí.

Agradecimientos

Agradecer de manera especial a mi tutora Dra. Mildrey Soca por guiarme por el camino correcto profesionalmente, dedicando su tiempo y dándome su incondicional apoyo.

Al Dr. Giraldo J. Martín por haber confiado en mí y permitirme hacer esta maestría recién llegado al centro.

Al profesor Emiro Canchila por su ayuda en la toma de muestras, datos y fotos.

A Maikel Galloso por toda la ayuda que me ha brindado en todos los sentidos.

A los compañeros de la vaquería de Indio Hatuey por el apoyo que ellos me brindaron en la toma de muestras para realizar este trabajo (Joseíto, Irinaldo, Julio, etc.).

A los compañeros del laboratorio de parasitología que me ayudaron en el montaje de las pruebas de laboratorio.

A los compañeros del CREE de la CPA VI Congreso Campesino de Colón por la ayuda con los medios biológicos que ellos me suministraron.

A Amaury por la transportación cuando teníamos que venir temprano e irnos tarde.

A la Revolución por haberme dado la oportunidad de estudiar.

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar el efecto de diferentes medios biológicos sobre la viabilidad de las garrapatas en bovinos, se desarrolló la presente investigación en áreas de la EEPF “Indio Hatuey”, diseñadas en dos experimentos: I. Evaluación de diferentes medios biológicos sobre las fases del ciclo de vida de las garrapatas a nivel de laboratorio y II. Determinación de los efectos de los medios biológicos en la prevalencia de las garrapatas en vacas en pastoreo. En la primera fase se evaluarán tres medios biológicos: *Bacillus turhingiensis*, *Verticillium lecanii* y *Beauveria bassiana*, mediante un diseño experimental totalmente aleatorizado, con cinco réplicas para cada uno. En cada medio biológico se evaluó su efecto sobre las diferentes fases del ciclo de las garrapatas (huevos, larvas y adultos). Además se utilizó un tratamiento control basado en la aplicación de agua destilada; de ellos, dos pasaron a la segunda fase. Los análisis se realizaron con el paquete estadístico SPSS 10.0. Los mayores porcentajes de mortalidad en adultos, a nivel de laboratorio, se correspondieron con la aplicación de los medios biológicos *B. bassiana* y *V. lecanii*, con valores que superaron el 90%, pasado los 21 días de aplicación, los cuales difirieron significativamente ($P < 0,05$) de *B. turhingiensis*. La aplicación de los medios biológicos tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de postura ($P < 0,05$), el peso de los huevos por postura ($P < 0,01$), así como sobre la eclosión y la viabilidad de las larvas ($P < 0,05$), siempre con los mejores resultados para la aplicación de *Beauveria*. Al evaluar la fase de campo, los medios seleccionados mantuvieron una tendencia similar, pero *Beauveria bassiana* mostró los mejores resultados en la disminución de la carga parasitaria por garrapatas en los animales en pastoreo con frecuencias de baños cada 15 días. Se apreció un efecto positivo de los hongos sobre la progenie de las garrapatas al observar una disminución significativa, tanto en el número de posturas como en la cantidad de huevos por posturas. Aunque los porcentajes de no eclosión fueron similares para ambos medios. Se recomienda ampliar las investigaciones a nivel de laboratorio y campo.

ABSTRACT

In order to evaluate the effect of different biological means on the viability of ticks in cattle, this study was conducted in experimental areas of the EEPF "Indio Hatuey", designed in two trials: I Evaluation of different biological means on the stages of the life cycle of ticks at laboratory level and II. Determination of the effects of biological means on the prevalence of ticks in grazing cows. In the first stage 3 biological means: *Bacillus turhingiensis*, *Verticillium lecanii* and *Beauveria bassiana* were evaluated using a completely randomized experimental design, with five replications for each means. Of each biological means its effect on the different stages of the tick cycle (eggs, larvae and adults) was evaluated. In addition, a control treatment was used, based on the application of distilled water. From the biological means, two continued in the second stage and the analyses were made through the statistical pack SPSS 10.0. The highest mortality percentages in adults at laboratory level corresponded to the application of de biological means *B. bassiana* and *V. lecanii*, with values that exceeded 90% after 21 days of application, which differed significantly ($p < 0,05$) from *B. turhingiensis*. The application of the biological means had a significant effect on laying percentage ($p < 0,05$), the weight of eggs per laying ($p < 0,01$), as well as on the hatching and viability of the larvae ($p < 0,05$), always with the best results for the application of *Beauveria*. When evaluating the field stage, the selected means maintained a similar trend, but *Beauveria bassiana* showed the best results in the decrease of the parasite rate for ticks in the grazing animals, with bathing frequencies every 15 days. A positive effect of fungi on the tick offspring was observed, with a significant decrease, in the number of layings, although the non hatchings were similar for both means. To expand the studies at laboratory and field level is recommended.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
CAPITULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	4
I.1 Clasificación taxonómica.....	4
I.1.2 Ciclo biológico de las garrapatas	5
I.1.3 Bioecología de las garrapatas	6
I.1.4 Relaciones con el hospedador.....	9
I.1.5 Síntomas clínicos y principales afectaciones en los sistemas pecuarios.....	10
I.2 Principales métodos de control de las garrapatas en los sistemas ganaderos	11
I.2.1 Control químico.....	11
I.2.2 Control biológico	14
I.2.3 Control genético.....	16
I.2.4 Control físico o natural.....	17
I.3 Entomopatógenos. Principales características.....	19
I.3.1 Taxonomía de los entomopatógenos.....	19
I.3.2 Características de los entomopatógenos.....	20
I.3.3 Características de virulencia de los entomopatógenos.....	20
I.3.4 Mecanismo de acción	22
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
Localización	24
Experimento I	24
Experimento II	24
Descripción de las investigaciones	24
Experimento I	24
Descripción de los medios biológicos	25
EXPERIMENTO II	27
Tratamientos	27
Procedimiento experimental.....	27
Mediciones experimentales.....	28
Análisis estadístico.....	28

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION	29
EXPERIMENTO 1. Evaluación de diferentes medios biológicos sobre las fases del ciclo de vida de las garrapatas a nivel de laboratorio.....	29
EXPERIMENTO II. Determinación de los efectos de los medios biológicos en el comportamiento de las garrapatas en vacas en pastoreo.....	37
CONCLUSIONES	42
RECOMENDACIONES.....	43
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	44

INTRODUCCIÓN

Las garrapatas y las enfermedades que transmiten se hallan ampliamente distribuidas por el mundo, especialmente en los países tropicales y subtropicales. Se ha estimado que el 80% de los bovinos existentes en el mundo (Basco Basco *et al.*, 2008) están infestados de garrapatas. Aunque se presentan diferentes especies de garrapatas en distintas regiones ecológicas, su impacto sobre la producción animal es similar en su naturaleza e importancia. Ellas son responsables de graves pérdidas causadas a través de sus picaduras (FAO, 2003), tales como: la pérdida de sangre, las lesiones de los cueros y ubres, así como la inyección de toxinas y la mortalidad y debilidad causada por las enfermedades que transmiten (Guglielmone y Mangold, 2002).

Por otra parte, durante las últimas décadas, en Latinoamérica se ha generado un movimiento de sectores sociales orientados a la producción, la comercialización y el consumo de alimentos libres de residuos tóxicos. Se han lanzado propuestas alternativas de manejo productivo en explotaciones agropecuarias, para tratar de romper con el esquema del modelo propuesto por la Revolución verde.

El control tradicional de garrapatas mediante compuestos químicos, además de ser una estrategia costosa, conlleva riesgos de contaminación ambiental, genera residuos en los productos de origen animal (Salada, 2005), puede propiciar inestabilidad enzoótica y favorece el desarrollo de quimioresistencia. Resulta necesario establecer métodos alternativos de lucha que combinen el empleo de sustancias químicas y la correcta utilización de un esquema de inmunización, con el empleo de vacunas con acción reconocida, la explotación de razas o cruces más resistentes a la parasitación por garrapatas, por lo que es necesario, además, el correcto manejo de pastizales y animales. El empleo de una lucha integrada contra las garrapatas brinda un control más efectivo y duradero, alarga el intervalo entre baños, reduce el empleo de sustancias acaricidas y, por consiguiente, disminuye el gasto invertido en ellas, mientras prolonga la vida útil de los compuestos acaricidas y restringe el volumen de residuos químicos que se vierten al medio (FAO, 2003; Furlong *et al.*, 2005).

En el ecosistema existen además reguladores biológicos de garrapatas que están en el grupo de los entomopatógenos, fundamentalmente hongos (*Beauveria bassiana*, *B. brongiarthii*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi* y *Paecilomyces fumoso-roseus*).

En Cuba, Castiñeiras *et al.* (1987) demostraron la efectividad de dos aislamientos de *B. bassiana* y tres de *M. anisopliae* que eliminaron el 92% de los huevos en 15 días, en condiciones de laboratorio. Recientemente, Monteiro *et al.* (1994) reportaron un control del 97 y 100% con los aislados de *M. anisopliae* sobre partes del ciclo biológico de *B. microplus* en condiciones de laboratorio.

Todos estos autores aseguran que los ectoparásitos pertenecientes a la familia *Ixodidae* están expuestos a un gran número de reguladores biológicos, lo que permite comprender por qué no son aún mayores los niveles de plagas que pululan en el ganado, si tenemos en cuenta que el número de huevos que oviposita una hembra de *B. microplus* está alrededor de los 2 000, con una viabilidad por encima del 90% y las neolarvas pueden permanecer largo tiempo sin ingerir alimentos, lo que les permite poder esperar hasta pasar a la etapa parasitaria.

A pesar de todos estos resultados, fundamentalmente a nivel de laboratorio, no existe una política definida para la integración de estos agentes biológicos, obtenidos en la red que existe a nivel de país para la producción de medios biológicos como parte de las estrategias de manejo integrado para estas parasitosis.

Resulta importante aplicar los conocimientos que ya se tienen, los cuales provienen de las investigaciones realizadas en el Departamento de Lucha Biológica del Instituto de Investigaciones de Sanidad Vegetal, en nuestros sistemas ganaderos, esta vez con la búsqueda de respuestas que nos ayuden a explicar la interacción parásitos–medios biológicos dentro del manejo del rebaño (con la inclusión de métodos y frecuencia de aplicación y efectos a nivel de los pastizales para la reducción de las cargas parasitarias), lo cual nos permitiría optimizar a corto plazo el uso de estos productos y alcanzar producciones cada vez más sostenibles y con menor uso de productos químicos.

Problema científico

La presencia de las garrapatas en el ganado bovino constituye una de las problemáticas más significativas que afectan la productividad pecuaria en Cuba. Este proceso está aparejado a la incidencia de la resistencia a los productos químicos, muy costosos por demás para nuestros productores, factores que en su conjunto han estimulado la búsqueda de otras alternativas de control, con énfasis en los controles naturales. Estos aspectos están muy a tono con la producción de medios biológicos en el país. Sin embargo, se hace necesaria la

adquisición de nuevos conocimientos que ayuden a explicar la interacción parásitos–medios biológicos dentro del manejo del rebaño.

Hipótesis

El uso de los medios biológicos disminuye la presencia de las garrapatas en los bovinos en pastoreo porque causan efectos letales sobre las diferentes fases de los ciclos biológicos de estos parásitos, por lo cual constituyen medios de control más amigables con el ambiente.

Objetivo general

Evaluar el efecto de diferentes medios biológicos sobre la viabilidad de las garrapatas en bovinos.

Objetivos específicos

1. Determinar los efectos de los medios biológicos sobre las diferentes fases del ciclo biológico de las garrapatas a nivel de laboratorio.
2. Evaluar los efectos de los medios biológicos sobre la prevalencia de las garrapatas en animales en pastoreo

CAPITULO 1. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

I.1 Clasificación taxonómica

Las garrapatas son artrópodos de la clase arácnida, organismos muy adaptados a la vida parasitaria, ya que son chupadores de sangre que pueden llegar a pasar varios meses sin alimentarse si las condiciones climáticas no lo permiten. Poseen un exoesqueleto duro que recubre su cuerpo segmentado y todas en estado adulto poseen patas en número par (Rodríguez, 2009).

Son ácaros cosmopolitas y ectoparásitos temporales obligados de reptiles, anfibios, aves, mamíferos, incluyendo animales domésticos y silvestres. Por su tamaño resultan observables a simple vista.

Las garrapatas según Parra *et al.* (1999) y Rodríguez (2009) pertenecen a:

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Chelicerata
Clase	Arachnida
Subclase	Acari
Orden	Parasitiformes Acarina
Suborden	Ixodida
Superfamilia	Ixodoidea
Familia	Ixodidae - Argasidae

Géneros: *Boophilus* – *Amblyomma* – *Dermacentor* (*Anocentor*) – *Rhipicephalus*

Las especies conocidas no alcanzan el millar y se dividen en dos familias: *Ixodidae* (garrapatas duras) o verdaderas, poseen escudo corto en la hembra y largo en el macho, el capítulo está implantado en la parte anterior del cuerpo de todas las especies, y *Argasidae* (garrapatas blandas) o falsas garrapatas, las cuales no poseen escudo. El capítulo está localizado en la parte inferior del cuerpo de las ninfas y los adultos, mientras que en las larvas se encuentra en la parte anterior (Quiroz, 1999; FAO, 1987).

En nuestro país están reportadas cuatro especies de garrapatas de importancia económica para Medicina Veterinaria: *Boophilus microplus*, *Amblyomma cajenense*, *Anocentor nitens*, *Ripicephalus sanguineu*.

I.1.2 Ciclo biológico de las garrapatas

Las garrapatas, durante su vida, pasan por cuatro etapas: huevos, larva, ninfa y adulto.

Todas las garrapatas son parásitos hematófagos, o sea, que se alimentan de la sangre de los animales y del hombre. Para esto cuentan con un aparato bucal especial que les permite perforar la piel del hospedador y succionar sangre. Pero no todos los estadios del ciclo biológico de la garrapata se alimentan, de hecho existen momentos dentro del ciclo que se realizan en el medio ambiente, tales como: las mudas de algunas especies de garrapatas y la deposición de huevos. Esto no significa que sean parásitos de ciclo indirecto, ya que cuentan sólo con un hospedador para poder cumplir con su ciclo biológico (Rodríguez *et al.*, 1987).

Según Quijada (2007), lo que sí diferencia a las garrapatas es la cantidad de veces que deben caer al suelo, por lo tanto la cantidad de hospedadores (aunque sea el mismo animal) que necesitan para poder realizar el ciclo completo:

Garrapatas de un solo hospedero: Son las que pasan desde el estado de larva al de adulto sin cambiar de huésped, él cual abandonan, solamente, cuando están llenas de sangre; se desprenden para ovipositar en el suelo. Ejemplo: *Boophylus annulatus*.

Garrapatas de dos hospederos: Son las que cumplen sus fases de larvas y de ninfas en un mismo huésped y lo abandonan para mudar en el suelo, al transformarse en adultas buscan un segundo huésped para completar su ciclo de vida. Ejemplo: *Rhipicephalus evertsi*.

Garrapatas de tres hospederos: Estas garrapatas se caracterizan porque siendo larvas, parasitan un huésped, al que abandonan después de alimentarse de su sangre, se dejan caer al suelo, donde mudan a ninfa y suben a parasitar un segundo huésped, que nuevamente es abandonado y, ya en el suelo, se transforma en adulto para volver a parasitar un tercer huésped.

El ciclo biológico puede considerarse en dos fases: la parasitaria o parasítica, durante la cual la garrapata se nutre del animal, y la fase no parasítica en la que la garrapata pasa en el suelo. Este período de vida libre, según Furlong *et al.* (2003), comprende cuatro etapas: la preoviposición, la oviposición, la incubación y el período de sobrevivencia de las larvas en el pastizal.

La kenogína (hembra fecundada y repleta) desova y aglutina de una vez entre 2 500 a 3 500 huevos en el suelo, gracias a la secreción protectora de una glándula que ella posee aproximadamente entre el tercer y quinto día de haberse desprendido del hospedero; entre las tres y cuatro semanas posteriores. Luego de un período de incubación, nacen las larvas;

con tres pares de patas (neolarvas), que pueden estar por varios meses en el pasto sin alimentarse (Furlong y Azebedo, 2005).

En la primera etapa (4-5 días de nacida) no tienen toda la vitalidad ya que sus órganos de fijación y piezas bucales no están desarrollados. Una vez que maduran y ocurre la fase de encuentro, trepan a un animal y comienzan su vida parasitaria. Para poder subirse al bovino, las larvas utilizan los pastos o el suelo donde éste se encuentra. Cuando las larvas de garrapata infestan al animal huésped, generalmente, pican de inmediato y comienzan a alimentarse. Sin embargo, los dos primeros días después de la infestación, las larvas se alimentan de manera intermitente y con frecuencia se desprenden y se mueven de un lugar a otro en el animal; después de ingerir una buena cantidad de sangre y fluidos de los tejidos, aproximadamente a los cuatro días se produce la primera muda y se transforman en metalarva, de este estadio nace la ninfa con cuatro pares de patas (Parra *et al.*, 1999).

En el noveno día de vida parasitaria realizan la tercera muda y se convierten en metaninfa, en el día 14 ocurre la diferenciación sexual, dando lugar a los meandros; los cuales se transforman a las 24 h en gonandros o machos aptos para la fecundación. La transformación en adulta de la hembra ocurre dos días después del macho y se le denomina neogina, la cual a las 24 h pasa a partenogina, apta para ser fecundada, si ello se produce se transforma en teleogina aproximadamente entre el día 18 y 21. Con el desprendimiento de la teleogina termina la fase parasitaria, convertida en kenogina, luego de la puesta total de los huevos muere (Espaine y Lines, 1983; Parra *et al.*, 1999). Sin embargo, los machos permanecen fijados al hospedador por períodos más largos y pueden aparearse con otras hembras.

En el estadio adulto hay dimorfismo sexual, la hembra es mucho más grande que el macho. Una vez alcanzada la madurez sexual copulan y la hembra debe alimentarse hasta que se llena de sangre, luego cae al suelo y busca un lugar protegido para poner los huevos (Drugueri, 2004).

I.1.3 Bioecología de las garrapatas

La duración del ciclo varía en dependencia de las condiciones climáticas, ya que gracias a ellas las larvas pueden o no estar más o menos tiempo en espera del hospedador. En cambio la parte del ciclo que se cumple sobre el animal (ciclo de vida parasitaria) no varía, ya que las condiciones ambientales las crean la humedad y calor del cuerpo del bovino y es aproximadamente de 23-24 días. Desde que la larva alcanzó al hospedador hasta que se

transformó en hembra ovígera (repleta de sangre y huevos) todo el ciclo se cumple sobre el mismo animal (Fonseca, 2009).

Tras la eclosión o la muda, los individuos inmaduros y adultos experimentan un período inactivo de “endurecimiento” de algunos días, durante el cual se producen algunas modificaciones de las cutículas y se digieren las reservas de alimento. Este período es seguido por otro de actividad alimenticia (en las garrapata de dos y un hospedador) o de la búsqueda de hospedador (o de esperar condiciones adecuadas para la búsqueda), de acuerdo con las características etológicas de las especies.

La alimentación de las larvas, ninfas y adultos dura generalmente 4-10 días y se realiza en dos fases:

- a) Lenta y gradual, durante la que se produce el crecimiento tegumentario y en el adulto el apareamiento.
- b) Rápido, durante los 1-2 días finales de la alimentación (marcado por la gran dimensión del organismo), excepto en la mayoría de los machos. En la fase rápida, la sangre ingerida se concentra y vuelve el exceso de líquido al hospedador. En esta fase, las garrapatas adquieren, frecuentemente, los organismos patógenos de los fluidos del hospedador.

El apareamiento sobre el hospedador es esencial para que las garrapatas hembras completen su saciedad. Una vez que la hembra se ha alimentado durante algunos días emite una o más feromonas que atraen a los machos (con menos frecuencia son los machos los que emiten la sustancia atrayente). De manera característica los machos chupan repetidamente pequeñas comidas, permanecen sobre el hospedador durante semanas o meses y se aparean con varias hembras. Por ello el número de garrapatas hembras, no machos, es únicamente indicador significativo de la actividad y las dinámicas estacionales (Furlong y Azebedo, 2005).

Los ambientes con cambios estacionales (cálido/frío, seco/húmedo) tienen poblaciones de garrapatas adaptadas estacionalmente. Estas adaptaciones climáticas comprenden períodos de reposo o diapusas que pueden aumentar marcadamente la longitud de su ciclo biológico. Así, en climas húmedos y cálidos el ciclo biológico puede requerir de 2-4 meses, mientras que pueden ser necesarios 3-5 años en zonas frías.

El estado no parasítico de la garrapata comprende los períodos de: preoviposición, oviposición, incubación y larva en los que transcurre el 60% de su ciclo de vida y durante los cuales habita en los pastos (Cordovés y Vitorte, 1989). Este conocimiento es importante

porque permite la regulación de la población existente en la Biocenosis, mediante la aplicación de los medios de control sin alterar el equilibrio que toda la especie debe mantener con los demás elementos del ecosistema.

La duración de la postura depende de la temperatura y puede variar de 2 a 44 días. En el verano, cuando la humedad y la temperatura son óptimas, la eclosión de los huevos ocurre aproximadamente de los 18 a 21 días. Al disminuir la temperatura ambiental, baja el porcentaje de eclosión de los huevos.

La hembra ingurgitada se tira del animal y comienza el período de preoviposición. Thompson (1976) estudió en la costa atlántica de Colombia el comportamiento de este período en *B. microplus* y registró una duración de 3 días; posteriormente, Benavides (1984) señaló una duración similar con una variación que podía oscilar entre 2 y 6 días a 28°C de temperaturas y 80% de humedad relativa, según estos autores las garrapatas más pesadas inician la puesta en un lapso más rápido que aquellas de un menor peso.

Benavides (1984), por su parte, estudió que el periodo de ovoposición de esta especie de garrapata se extendió a 9,3 días con una variación entre 7–12 días. Sin embargo, en Cuba, De La Vega (1985) planteó que la oviposición ocurre, generalmente, entre los 10 y 15 días y que la temperatura afecta la duración de éste cuando la humedad relativa es constante.

El período de incubación, según Boero (1957) es de 25 a 30 días, si las condiciones de temperatura y humedad relativa son adecuadas. El autor señaló que la duración del periodo de incubación de *B. microplus* es de 21 días, para la Costa Atlántica; mientras que en Cuba osciló entre 19 y 28 días y puede llegar a prolongarse algo más en la época de seca (De La Vega, 1985).

Luego de la eclosión, la larva-1 sube a las partes más altas de los pastos y malezas y ahí espera el paso de un animal, se traslada a él y comienza su vida parasitaria. Tras comenzar a alimentarse y aumentar de tamaño, ocurre la primera muda y pasa de larva a ninfa, la cual vuelve a succionar sangre y crece hasta ocurrir la segunda muda (ambas mudas se realizan sobre el huésped) en que se transforma en garrapata adulta y posteriormente realiza la fecundación. Finalmente la hembra ingurgitada se desprende y, pasado un periodo corto de espera, inicia la oviposición, al concluir esta muere. Así se repetirá el ciclo con el nacimiento de las larvas que emergen de los huevos ovipositados por la garrapata (De La Vega, 1985).

La sobrevivencia de la larva-1 de *B. microplus*, en la época de lluvia es de 49 días, mientras que en el periodo de seca puede permanecer hasta 140 días en el pastizal (Cordovés y Vitorte, 1989).

De la Vega (1985) realizó un estudio exhaustivo del desarrollo de los estados parasíticos de *B. microplus* en Cuba y concluyó que:

Larvas alimentándose	0 – 5	Aparición de adultos jóvenes	14 – 15
Aparición de metalarvas	5 – 7	Apareamiento	15 – 17
Aparición de ninfas	7 – 9	Ingurgitación	14 – 21
Aparición de metaninfas	10 – 13	Desprendimiento	21

El conocimiento de la duración de los estados no parasíticos de *B. microplus* que pululan en los pastos permite la regulación de la población existente en la Biocenosis, mediante la aplicación de los medios biológicos, sin alterar el equilibrio que toda la especie debe mantener con los demás elementos del ecosistema.

I.1.4 Relaciones con el hospedador

La clave para la comprensión de la relación garrapata-hospedador se sitúa en la historia pretérita de estas asociaciones en la escala del tiempo de la evolución (FAO, 1987). Aparentemente, las garrapatas evolucionaron en dos líneas principales (*Argasidae* e *Ixodidae*) como parásitos obligados de los reptiles en los climas cálidos y húmedos de finales del Paleozoico o comienzos del Mesozoico. Tras la aparición explosiva de las líneas de aves y de mamíferos hace unos 700 millones de años, algunas especies permanecieron fieles a sus hospederos reptiles, aunque la mayoría evolucionó como parásitos específicos de ciertas familias o grupos de especies y mamíferos (Massard y Fonseca, 2004).

Una relación perfecta entre parásito y hospedador es aquella en la que hospedador, parásito y agente infeccioso coexisten en armonía; no se plantea ninguna amenaza a la continuidad de alguna de las especies implicadas en la asociación. Para llegar a este punto, el número relativo de las especies se halla en equilibrio. Las garrapatas han llegado a adaptarse a la aparición relativamente rara de sus hospedadores, mediante el desarrollo de mecanismos de supervivencia a largo plazo; los hospedadores han desarrollado mecanismos de resistencia,

frecuentemente de base inmunológica, que controlan las cifras de garrapatas a niveles bajos (Singh y Girschich, 2003).

El equilibrio saludable entre hospedador y parásito se destruyó cuando el hombre domesticó a los animales para proporcionarse carne, leche, pieles, huevos, medios de transporte y animales de compañía. El campo geográfico-ecológico original de las garrapatas que parasitan a los animales domésticos se ha ampliado extensamente por los desplazamientos del hombre y de los animales, por el comercio y por la modernización.

I.1.5 Síntomas clínicos y principales afectaciones en los sistemas pecuarios

Las garrapatas causan, fundamentalmente, enfermedades que cursan con algún tipo de anemia (que se define como la incapacidad de la sangre de transportar oxígeno), este proceso causa una baja en la producción individual y general del rodeo. Fundamentalmente se afectan los animales jóvenes, los viejos, las hembras lactantes o aquellos cuyo sistema inmunológico esté afectado en forma temporal o permanente (Guglielmone y Mangold, 2002). También las garrapatas son consideradas agentes transmisores de enfermedades, ya que, según Rodríguez *et al.* (1995); Quiroz (1999); Aguirre (1999) y Estrada y Santos (2005):

- a) Son hospedadores definitivos de la *Babesia trigemina* y *Babesia argentina*, parásitos productores de la babesiosis o fiebre tic, enfermedad de los bovinos ampliamente distribuida en el mundo. La babesiosis produce malestar, decaimiento, aletargamiento en los animales y pérdida de la coordinación. Otros síntomas pueden ser la hepatomegalia, la esplenomegalia, la ictericia y la muerte.
- b) Transmiten en los bovinos la anaplasmosis, debido a que es hospedador de *Anaplasma marginale*.
- c) Además *B. microplus* transmite la piroplasmosis, causada por *Babesia divergens* y *B. bovis*. y la fiebre Q (*Rickettsia burnetti*).

La anemia que producen en los hospedadores puede ser desde la más insignificante hasta la que puede producir la muerte, siempre en dependencia de la carga parasitaria, del estado general del animal (de su condición fisiológica) y del ambiente (Fragoso, 2005; De Sousa, 2005).

Sus picaduras provocan irritación, lo que determina molestias e interfiere en la alimentación del animal. El prurito y el dolor que produce la garrapata al succionar sangre del hospedador y las lesiones que esto trae aparejado, como la formación de eritemas, vesículas y costras,

se hace evidente (se pueden formar también pústulas en caso de contaminación bacteriana secundaria) (Rodríguez, 2009).

El rascado lleva a una formación aún mayor de las lesiones y a la caída del pelo, los daños provocados en la piel constituyen puertas de entrada para enfermedades bacterianas o fúngicas y otras parasitosis, que, como miasis, pueden ocasionar grandes pérdidas económicas en el vacuno (Kem, 2003). Las garrapatas y las lesiones que ellas producen se encuentran en todo el cuerpo pero especialmente en la tabla del cuello, la entrepierna y el área de la ubre en el caso del ganado de leche. Todo esto produce una irritación y estrés que afecta notablemente la productividad de los animales.

A esto se le suma la depreciación económica de los cueros provenientes de animales que sufrieron esta parasitosis, ya que al alimentarse la garrapata perfora con su probóscide la piel de los bovinos. Si la carga parasitaria sobre el animal es muy alta el desmejoramiento corporal general de los animales es muy evidente.

1.2 Principales métodos de control de las garrapatas en los sistemas ganaderos

Muchos han sido los métodos de control que el hombre ha implementado para erradicar esta problemática, los primeros fueron los aceites y extractos de las plantas, más tarde el petróleo crudo y las soluciones arsenicales hasta llegar a las sustancias químicas, estos se clasifican en métodos químicos, biológicos, genéticos y naturales (FAO, 2003).

1.2.1 Control químico

El uso de productos acaricidas que matan a la garrapata en la etapa de vida parasitaria es el medio de lucha más difundido en el mundo. Está basado en el conocimiento del ciclo biológico del parásito y en tratar de evitar que las formas parasitarias lleguen al estado de teleógina, previniendo su caída al suelo, y de esa manera evitar que haya reinfección de la pastura por larvas (De Sousa y Furlong, 2005).

El ciclo biológico en el vacuno se completa en un periodo promedio de 22 a 23 días. Teóricamente, utilizando una acaricida eficaz (99%) cada 21 días, evitaríamos la presencia del *B. microplus* con capacidad reproductiva, logrando un control adecuado con tratamientos de rutina (Cardozo y Franchi, 1995).

Sin embargo, la aplicación de estos baños busca controlar directamente sobre el animal la población de ectoparásitos, teniendo en cuenta que la erradicación del ácaro no es el

objetivo primordial de esta actividad, sino el mantenimiento de la estabilidad enzoótica para hemoparásitos. Por esta razón no se debe pretender que los bovinos permanezcan completamente libres de garrapatas, sino más bien tratar de mantener en niveles bajos su presentación (De Sousa y Furlong, 2005).

La escogencia del producto a utilizar debe tener en cuenta el principio activo, tanto del baño que se empleó anteriormente como del nuevo; esto es necesario para realizar una adecuada rotación de compuestos, de forma tal que no se incurra en la sobreutilización o subutilización de un producto. Se recomienda cambiar de principio activo cada cierto período de tiempo (de 4 a 6 meses) (Mangold, *et al.* 2000; Aguirre *et al.*, 2000).

El aumento del número de baños conlleva a un aumento de la presión de selección, sobreviviendo los individuos más resistentes, lo cual obliga a utilizar concentraciones cada vez más altas. Mientras que, si la concentración es inferior a la dosis efectiva permite que el ectoparásito desarrolle mecanismos de quimiorresistencia hacia dicha sustancia (Parra *et al.*, 1999).

Los productos más empleados son líquidos concentrados que contienen un principio activo contra el parásito, pero que además tienen en su fórmula sustancias emulsionantes, solventes y humectantes que juegan un rol muy importante en la calidad del producto. Los principios activos más usados en la lucha contra las garrapatas han sido: organoclorados, organofosforados, carbamatos, amidinas y piretroides sintéticos (Alfonso Guerra *et al.*, 2005; Furlong *et al.*, 2007).

Compuestos clorinados: son estimulantes del sistema nervioso central (SNC), por lo que producen manifestaciones neuromusculares. Las sustancias activas son Aldrín, Hexacloruro de benceno, Clordano, Dieldrín, Endrín, Heptaclor, Metoxiclor, Toxafeno, DDT y HCH/lindano (Encinas *et al.*, 1999).

Organofosforados: se caracterizan por inhibir la actividad de la colinesterasa, producen un exceso de estímulo colinérgico de tipo muscarínico, nicotínico y central (Parra *et al.*, 1999). Los organofosforados son lipofílicos, se absorben a través de la piel y se acumulan en el tejido adiposo, donde son liberados lentamente a la sangre y otros líquidos fisiológicos (leche), por acumulación pueden dar origen a un estado de envenenamiento crónico, motivo por lo que su uso es restringido (Álvarez *et al.*, 2003).

A pesar de su estabilidad sobre el pelo, lana y piel, solo tienen una permanencia de 4 a 8 días al ser absorbidos por la piel o por otras causas. Los medicamentos de mayor uso en

este grupo son: Azinfosmetilo, Carbofenatión, Clorfenvinfós, Clorpirifós, Coumafós, Diazinón, Diclorvós, Dioxatión, Feniltrotion, Fentión, Fosmet, Foxim, Malatión, Paratión, Tiofós y Triclorfón (De Sousa y Furlong, 2005).

Carbamatos: actúan de forma similar a los organofosforados, inhiben la colinesterasa. Los principios activos más conocidos son: Carbaril, Carbofurán, Metonilo y Propoxur (Encinas *et al.*, 1999).

Piretroides: provocan un bloqueo de la actividad motriz o bien por la producción de excitabilidad, incoordinación de movimientos, irritabilidad, parálisis, letargo y muerte.

Entre los fármacos más frecuentes en este grupo se hallan: Alletrina, Cihalotrina, Cipermetrina, Deltametrina, Fenvalerato, Fenotrín, Flucitrinato, Flumetrina, Permetrina y Resmetrina. Estos compuestos tienen efectos residuales importantes (Álvarez *et al.*, 2003).

Formamidinas: ocasionan la muerte del ectoparásito por inhibición de la monoaminooxidasa, sus dianas más importantes son los receptores de la optopamina. El producto de mayor uso es el Amitraz (Pereira, 2006).

Según Encinas *et al.* (1999), los componentes anteriores son neurotóxicos. Sus dianas más importantes son los canales axonales del sodio (DDT y piretrinas), la acetilcolinesterasa (organofosforados y carbamatos), los receptores de la optopamina (formamidinas) y los receptores del GABA (HCH).

Otros compuestos químicos utilizados han sido los benzolifenilúreas: la mayor parte de los representantes de este grupo son altamente eficaces contra los insectos, pero no contra las garrapatas (Parra *et al.*, 1999). Las sustancias con acción sobre estos ectoparásitos, como el Fluazurón, se caracterizan por interferir, principalmente, en la formación de la quitina, con lo cual impiden la formación de la cutícula del parásito y se consideran inhibidores de las mudas y del crecimiento (Ortiz y Franco, 2005). Por otro lado, estas sustancias intervienen en el funcionamiento de las glándulas salivales, por lo que afectan la nutrición de los diversos estadios. Las células excretoras también se ven afectadas, por lo que ocasionan desequilibrios en la hemolinfa (Parra *et al.*, 1999).

La reducción progresiva del volumen de acaricida utilizado es posible mediante la utilización de acaricidas de acción sistémica, administrados por vía oral o subcutánea (Ortiz y Franco, 2005). Entre los garrapaticidas sistémicos encontramos los derivados de las lactonas macrocíclicas, los cuales han demostrado ejercer su acción sobre garrapatas de uno y tres hospederos.

La Ivermectina es uno de estos compuestos que, aplicado a 200 microgramos/kg en inyección subcutánea (SC), controla las garrapatas (Ortiz y Franco, 2005). Otros derivados de la Ivermectina, como moxidectin y doramectina, están siendo desarrollados con buenas perspectivas para su uso como garrapaticida (Rodríguez, 2002).

El Closantel (5 mg/kg) también se ha empleado como garrapaticida y demostró una eficaz protección sobre formas inmaduras de *B. microplus* y la reducción en la eclosión de los huevos de hembras tratadas. Además, ofrece buena protección vía SC (6 semanas para *Amblyomma*) y por vía oral en igual dosis a los parásitos presentes en el animal el día tratamiento (Encinas *et al.*, 1999).

El principal problema del uso de las sustancias químicas contra las garrapatas es la aparición de resistencia a los acariciadas y la reaparición del parásito en zonas ya limpias, situación que dificulta las campañas de lucha (De Sousa y Furlong, 2005).

La resistencia desarrollada por garrapatas se ha manifestado frente a casi todos los grupos químicos utilizados en su control; esto ha ocurrido, preferentemente, en áreas donde la utilización de acaricidas ha sido más sistemática (Betancourt *et al.*, 2004). Este fenómeno crea la necesidad de realizar investigaciones epidemiológicas, en las que se determina la dinámica de la población del parásito a través de conteos de garrapatas y estudios ecológicos; así como la búsqueda de nuevas alternativas de control (Parra *et al.*, 1999).

Esta realidad y el hecho de que el desarrollo de nuevos acaricidas es cada vez más complicado y costoso, resulta imperioso contar con estudios que permitan alargar al máximo su vida útil. El buen uso de los productos para baños acaricidas es importante, pues en el lapso que va entre su aparición en el mercado y el desarrollo de resistencia del parásito es cada vez menor debido a los nuevos productos (Nari y Eddi, 2002).

I.2.2 Control biológico

La disponibilidad de productos químicos para el control de garrapatas es cada vez menor debido a los altos costos de desarrollo y a la aparición de problemas de resistencia que los deja fuera del mercado. Se hace necesario el correcto uso de los acaricidas disponibles para prolongar su vida útil (Betancourt *et al.*, 2004; Polanco, 2001). Dicha situación, sumado al impacto ambiental que conlleva la eliminación de estos productos al medio, resultó necesario el desarrollo de nuevos métodos de control, destacándose el empleo de vacunas recombinantes contra las garrapatas.

El desarrollo de vacunas contra la garrapata *B. microplus* fue reportado por primera vez en Australia donde la proteína BM86, aislada del intestino del a garrapata, fue recombinada en *Escherichia coli* y llevada a escala mundial bajo los nombres de Tick Gard ® (Rand *et al.*, 1989).

Este antígeno permanece en forma natural “oculto” al sistema inmunológico del animal, o sea, no juega ningún papel en la interacción hospedero-parásito para inducir de forma artificial la inmunidad del hospedero (Willansed y Kemp, 1988).

Según Rodríguez (2000), la ventaja de usar antígenos ocultos está en evitar los principales mecanismos de evasión parasitaria de la respuesta inmune. La falta de contacto entre los antígenos ocultos y el sistema inmunológico permite que los parásitos no desarrollen estrategias para escapar a la acción de una repuesta contra ellos, esto los hace especialmente atractivos para el diseño de vacunas contra ectoparásitos.

Posteriormente, investigadores cubanos, con el empleo, básicamente, de la misma tecnología, pero con la combinación de la proteína en la levadura *Pichia pastoris*, produjeron una vacuna denominada Gavac ® (CIGB, Cuba), la cual tiene registro para su aplicación en varios países de Latinoamérica como Colombia, Bolivia, Brasil, México, además de encontrarse en fase de registro en otros países de la región (Valdés *et al.*, 2005).

Los anticuerpos específicos contra este antígeno que se obtienen en los animales vacunados, junto con otros componentes como el complemento, son ingeridos por las garrapatas junto con la sangre; esto favorece que los anticuerpos se unan al antígeno, lo que provoca el daño intestinal y el paso de las sustancias a la hemolinfa del parásito. Ello resulta, finalmente, en la reducción del número de garrapatas que completan el ciclo biológico y afectan la fertilidad de los parásitos resultantes.

Por lo tanto el resultado fundamental de este inmunógeno no será la muerte directa de la garrapata en una sola generación, sino el control progresivo del número de garrapatas en generaciones sucesivas, mediante la reducción de la capacidad reproductiva de estos parásitos (Valdés *et al.*, 2005).

El inmunógeno Gavac es utilizado en Cuba para el control de la garrapata *B. microplus* en el ganado bovino. El esquema de aplicación involucra una prima inmunización en las semanas 0, 4 y 7, con revacunaciones cada 6 meses. En los rebaños que pierden el esquema de inmunización por diversas razones se requiere, por recomendación de los fabricantes, el reinicio de la inmunización con una prima inmunización de tres dosis. Cada dosis está

constituida por 2 mL de Gavac, que contiene 100 microgramos del antígeno (Vargas *et al.*, 2005). Recientemente se ha ensayado una nueva formulación denominada Gavac Plus, la cual se elaboró a partir de la misma fórmula inicial de Gavac, pero se obtiene mediante un proceso de purificación más perfeccionado. Su eficacia es superior al Gavac y produce mayores títulos de anticuerpos (Valdés *et al.*, 2005).

Otra formulación que se ha venido desarrollando es la TickVac MK, la cual emplea un antígeno crudo obtenido de la totalidad de la proteína natural de larvas de *B. microplus* (Betancourt *et al.*, 2004).

I.2.3 Control genético

Este método se basa en la utilización de razas que muestran más resistencia a las garrapatas. En términos generales se puede definir como la aptitud del huésped para imponer limitaciones sobre el parásito en cualquier etapa de su relación (Parras *et al.*, 1999). De igual forma, Cardozo y Franchi (1995) la definen como la capacidad del huésped para limitar el número de garrapatas que alcanzan el estadio adulto. La resistencia es adquirida como respuesta al ataque de garrapatas y dura toda la vida. Según estos autores, aumenta con la densidad de garrapatas y es hereditaria. Los terneros que nacen de madres resistentes están protegidos hasta el destete.

Es posible desarrollar rebaños resistentes del *Bos taurus* a partir de individuos excepcionalmente resistentes, pero se necesitan muchos años para lograrse. La resistencia puede conseguirse más rápidamente a partir de entrecruzamientos con bovinos *Bos indicus*. En general, se considera que se requiere de un 50% de sangre de *Bos indicus* para lograr una resistencia adecuada (Rivera, 1996).

La alta mortalidad de garrapatas que se da durante el ciclo parasitario oscila entre el 30 y 40% en vacunos *Bos taurus* altamente susceptibles al *B. microplus*. La muerte de las garrapatas está determinada por la resistencia del huésped en que se alimente. Los porcentajes de sobrevivencia van de 0, en animales que no son huéspedes habituales o que han desarrollado fuerte resistencia, a 40% en vacunos susceptibles. La mortalidad ocurre, aparentemente, en las primeras 24 horas de fijadas al hospedador y en menor medida en el establecimiento de estadios evolutivos posteriores. Estos porcentajes de sobrevivencia fueron medidos en *B. microplus* en las distintas razas de vacunos y en varias condiciones (Cardozo y Franchi, 1995).

I.2.4 Control físico o natural

Se ha comprobado que *B. microplus* en su etapa de vida libre depende, en gran medida, de las condiciones externas de humedad y temperatura, por lo que los pastoreos intensivos reducen la cobertura vegetal y pueden limitar la sobrevivencia de huevos y larvas. Las teleoginas que caen al suelo procuran un lugar protegido de los rayos solares para iniciar su postura. Por lo tanto influye la composición del tapiz vegetal donde cae la hembra repleta para encontrar esa protección; es por ello que los campos sucios con arbustos y malezas proporcionan condiciones favorables para que *B. microplus* complete su ciclo biológico. Investigaciones realizadas en Colombia determinan que la supervivencia larvaria de la garrapata fluctúa entre 30 y 60 días promedio, resultados que permiten recomendar un manejo rotacional de potreros con periodos de descanso no menos de 30 días, siendo el ideal de 45 días (Parras *et al.*, 1999).

Al mismo tiempo hay que tener en cuenta que la mejora del pasto tiene un efecto indirecto, ya que al mejorar el estado nutricional de los animales, éstos pueden desarrollar la capacidad de soportar mayores cargas parasitarias sin pérdidas de producción (Rivera, 1996).

Por otra parte, en los sistemas de pastoreo muchos son los enemigos naturales que se han registrado como reguladores de las poblaciones de garrapatas, los más importantes parecen ser las hormigas, hay referencias en Australia de los géneros *Iridomyrmex*, *Asphaenogaster* y *Pheidole* como depredadores de adultos repletos en el suelo (CSIRO, 1959). Además hay referencias que las hembras de *A. cajennense* y de *B. microplus* son atacados por *Solenopsis germinata* (Cerny, 1969).

Verrisimo (1995) señala cuatro especies de hormigas, entre ellas, *Solenopsis saevissima* como el más importante biorregulador de *B. microplus*, también depreda *A. cajennense* y *R. sanguineus*. En segundo lugar refiere la especie *Camponotus rengerii*, que presenta mayor actividad forrajera al anochecer y al amanecer y la hormiga *Ectatomma quadridens* que ataca a las garrapatas menos desarrolladas o menos ingurgitadas, principalmente en días húmedos.

En Cuba son varios los autores que señalan a *Pheidole megacephala* como un regulador de huevos de *B. microplus* (Vega y Díaz, 1982; Castiñeiras *et al.*, 1987; Rijo *et al.*, 1992). Además, Rodríguez *et al.* (1983) observaron las poblaciones de *A. cajennense* atacadas por el mismo depredador.

También se han observado otros controles naturales, Costa Lima (1915) encontró ninfas de *R. sanguineus* parasitadas por el himenóptero *Hunterellus hookeri*, posteriormente Alfeev y Klimas (1938) estudiaron en la antigua URRS, *Hunterellus hookeri*, parásito procedente de los EE.UU. y comprobaron que las ninfas de *Ixodes ricinus* y de *Dermacentor marginatum*, eran parasitadas por *H. hookeri*.

Los artrópodos no son los únicos reguladores biológicos de las garrapatas, hay otros depredadores como es la regulación que el propio huésped ejerce mediante el lamido o rascado de su piel; las aves también actúan al deprimir las poblaciones del ectoparásito al igual que las ratas y los ratones (Barnett, 1961).

Además de lo expresado anteriormente, Sutherst *et al.* (1978) señalan que las aves pueden elevar la eficiencia de los programas de control integrado de garrapatas, sobre todo *Buphagus* spp. Por otra parte, Bezuidenhout y Stutterheim (1980) estudiaron 53 ejemplares de *Buphagus erythrorhynchus* y encontraron que habían ingerido 21 641 ixódidos, de los cuales los géneros *Boophilus* y *Rhipicephalus* fueron más representados.

Norval y Mc Cosker (1983) comunicaron que el lagarto arcoris (*Mabuyu quinquetaeniata margarifer*) es capaz de ingerir hembras repletas de *A. hebraeum*.

En el ecosistema existen, además, reguladores biológicos de garrapatas que están en el grupo de los entomopatógenos, Samsinakova *et al.*, (1974) encontraron una hembra de *Ixodes ricinus* con micelios de *Beauveria tenella* cerca de la boca y en la región ventral. Romaña *et al.* (1987) probaron 14 aislamientos de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*, *B. brongiarthii*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi* y *Paecilomyces fumosoroseus*), para controlar larvas del primer estadio de *Rhodnius prolexus* con mortalidad que varió entre 30 y 100%.

En ese mismo año, en Cuba, Castiñeiras *et al.* demostraron la efectividad de dos aislamientos de *B. bassiana* y tres de *M. anisopliae* que eliminaron el 92% de los huevos en 15 días, en condiciones de laboratorio. Más recientemente Monteiro *et al.* (1994) señalaron un control del 97 y 100% con los aislados de *M. anisopliae* sobre partenoginas de *B. microplus* a nivel de laboratorio, en el mismo año Bittencourt *et al.* Evaluaron, en condiciones controladas, el efecto del entomopatógeno *M. anisopliae* sobre huevos y hembras repletas de *B. microplus* y demostraron que el hongo provoca alteración significativa en la fase no parasítica de la garrapata.

Correira *et al.* (1994) encontraron que el hongo *M. anisopliae* presentó mayor patogenicidad a las partenoginas de *B. microplus* a medida que aumentaba la concentración del biopreparado.

Por otro lado, Samish y Glazer (1992) evaluaron en condiciones de laboratorio la acción reguladora de diferentes concentraciones de *Steinernema carpocapsae* a *B. microplus*, e indicaron un 100% de mortalidad a los dos días de infestado el ectoparásito, con una concentración de 10 000 nematodos por placa.

Todos estos autores y otros tantos apuntan a que los ectoparásitos pertenecientes a la familia Ixodidae están expuestos a un gran número de reguladores biológicos, lo cual permite comprender por qué no son aún mayores los niveles de plagas que pululan en el ganado, si tenemos en cuenta que el promedio de huevos que oviposita una hembra de *B. microplus* está alrededor de los 2 000 con una viabilidad por encima del 90% y las larvas pueden permanecer largo tiempo sin ingerir alimento, lo que les permite poder esperar hasta subir al vacuno y pasar a la etapa parasitaria.

I.3 Entomopatógenos. Principales características

Las investigaciones con entomopatógenos cada día reciben más atención, debido a los efectos permanentes que causan en poblaciones de insectos plagas de importancia económica y por el uso potencial como agentes de control biológico en programas de manejo integrado (Samish y Rehacek, 1999). Esto ha originado un gran interés en su producción masiva, su formulación y su comercialización como insecticidas biológicos.

En Europa, Brasil, Venezuela y Cuba se han desarrollado formulaciones como *B. bassiana* y *M. anisopliae* (CENICAFÉ, 1997). Estos hongos imperfectos tienen un gran potencial como agentes de control biológico y actualmente se expenden en países como Estados Unidos. Las características que son necesarias para que se puedan utilizar como plaguicidas son: alta virulencia, rápida acción, estabilidad y seguridad para los trabajadores (MaCoy, 1990).

I.3.1 Taxonomía de los entomopatógenos

No plasmodiales y frecuentemente miceliales, por décadas se han considerado los entomopatógenos en la división *Eumycota* dentro de la subdivisión *Deuteromycotina*, clase *Hyphomycetes* y orden *Moniliales*. Su reproducción es asexual, por medio de conidios, es común en los *Deuteromycotina* y menos común en *Basidiomycotinas*. Toulloch (1976)

estudió varias especies de este género y concluyó que solamente *M. anisopliae* y *M. flavoviride* fueron aceptados como especie. Las cepas de *M. anisopliae* fueron caracterizados por su producción de esterazas (De Conti *et al.*, 1980).

I.3.2 Características de los entomopatógenos

Los hongos de la clase *Hyphomycetes* son facultativos y pueden ser cultivados artificialmente (Alexopoulos, 1952). Cuando las colonias de *Maetharizium* son nuevas, tienen apariencia blanca, pero al madurar las conidias el color se torna verde olivo. Los conidióforos se ramifican y a su vez forman cadenas de conidios, estas dan origen a masas miceliares. *M. anisopliae* tiene dos tipos de esporas, la forma corta que es *M. anisopliae* variedad *anisopliae* (conidia 3,5 – 9,0 μ m), y la espora larga, *M. anisopliae* var. *major* (conidia 9,0 – 18,0 μ m) Tolloch (1976).

Las cepas de la variedad *major* son relativamente homogéneas, pero aquellas de la variedad *anisopliae* son heterogéneas cuando se prueban con isoenzimas (Riba *et al.*, 1986). Ya que estas cepas son consideradas como una promesa en el control biológico porque son de esporulación rápida y producen micotoxinas, se degradan mucho más rápido que las cepas menos virulentas (Al-Aidroos y Sheifert, 1980). Los hongos entomopatógenos también producen metabolitos secundarios, los cuales actúan como micotoxinas (Roberts, 1997), los cultivos de *M. anisopliae* contienen cyclodepsipeptidos, destruxinas A, B, C, D y E. También la desmethyldestruxin B (Kodaira, 1961, 1962; Tamura *et al.*, 1994; Suzuki *et al.*, 1966, 1970), las destruxinas han sido consideradas como una nueva generación de insecticidas.

I.3.3 Características de virulencia de los entomopatógenos

Las condiciones climáticas impiden o favorecen que los agentes de control biológicos alcancen su potencial pleno en el control, por su sensibilidad a los cambios de temperatura y humedad (Kaaya y Gaugler, 1993), ya que la aplicación de los organismos entomopatógenos puede ser eficaz, en dependencia de la especie y cepa, ya que presentan diferencias en la vivencia y la virulencia, según el ambiente donde se les aplique (Barker y Koenning, 1988).

Existen factores que afectan la virulencia de los agentes de control biológicos, tales como: el sustrato de crecimiento (Genthener *et al.*, 1977), la viabilidad y concentración de conidias, así como la alimentación del hospedero (Knutson y Gilstrap, 1990). Otros autores refieren que la luz solar, la humedad ambiental, la temperatura y algunos productos químicos afectan la

virulencia, el desarrollo y la esporulación de los entomopatógenos (Genthner *et al.*, 1977; Ferron, 1978; Noma y Strickler, 1999; Rath, 2000), esto causa que la mortalidad de la plaga disminuya en la medida que la temperatura aumenta (Inglis *et al.*, 1999). Sin embargo, otros autores señalan que en temperaturas altas, aunque los entomopatógenos sobreviven, tienen un control muy bajo (Rath, 2000).

Robers y Campbell (1977) atribuyen que el principal factor que limita al desarrollo de los entomopatógenos es la temperatura y esta tiene un efecto principal en todas las actividades celulares. Por debajo de 0°C los hongos y bacterias generalmente sobreviven, pero raramente crecen, o bien están en latencia y expuestos a más de 40°C, la mayoría de los organismos detienen su desarrollo y mueren rápidamente.

Dentro de esta variación de temperaturas, el crecimiento puede aumentar o disminuir, en dependencia del aislamiento, la cepa y la especie (Ouedraogo *et al.*, 1997; Bidochka *et al.*, 1998; Rath, 2000), aún dentro de una misma especie los rangos son muy variables y los óptimos de temperatura se disminuyen de manera muy diferente entre las cepas, por ejemplo *M. anisopliae*, el 33% de los aislados se desarrollan dentro el rango de 8-11 y de 35-37°C, pero se ha observado que tiene un notable crecimiento a 35°C (Fargues *et al.*, 1992). *P. fumosoroseus* cepa Apopka 97 PFR 97, CG170, ATCC20874 no crece a temperaturas por encima de 32°C por lo que a esas temperaturas se considera no patogénica a humanos, no dañino a aves, escarabajos y un amplio rango de artrópodos (COMISION EUROPEAN, 2002). Otras cepas se desarrollan en el rango de 11 a 32°C y temperaturas menores o iguales a 25°C estimulan un mayor crecimiento (Ouedraogo *et al.*, 1997).

Ferron (1978) y Fargues *et al.* (1992) refieren que la temperatura óptima para el desarrollo de los entomopatógenos no es necesariamente la misma para el desarrollo de la enfermedad. De igual forma el porcentaje de infección está directamente relacionado con la temperatura, por ende, la presencia de temperaturas bajas provoca que el tiempo de desarrollo en el hospedero sea mayor (Guzmán y Axtell, 1987), por lo que retardan de manera significativa la micosis sin afectar la mortalidad (Ferrón, 1978).

Por otra parte, la humedad relativa también puede afectar la longevidad de los conidios (Hong *et al.*, 1999). Por ejemplo para los *Hyphomycetes* el rango de sobrevivencia de conidias está entre 50 y 60% de HR, para *M. flavoviridae* (Games y Rozsypal) 34% para *B. bassiana* y *P. Farinosus* (HolmsK) A.H.S. y G.Sm. y los conidios de *M anisopliae* sobreviven en humedades bajas y altas (Ferron, 1978); HajeK *et al.*, (1994) y Samish y Rehacek, (1999)

señalan que por su distribución mundial y su amplia dispersión, se encuentran en la mayoría de los hábitats. Por lo que son propagados y almacenados con facilidad, lo que los hace atractivos como bioplaguicidas de contacto (Hwang, 1968; Hong *et al.*, 1999; Shah *et al.*, 1999).

I.3.4 Mecanismo de acción

Los hongos actúan por contacto, invaden el cuerpo del insecto y causan la muerte (Fernández, 1997). La forma de penetración de los hongos es generalmente a través del tegumento del hospedero (Fargues y Vey, 1974; Zacharuk, 1981), existen casos particulares en que los orificios naturales como: tracto digestivo, las partes bucales, el orificio anal, tracto genital y la tráquea o espiráculos son usados por el hongo para su invasión (Delmas, 1973; Schabel, 1976).

El proceso se inicia cuando el conidio o esporas se adhiere a la superficie del insecto y por atracción de las enzimas llamadas lipasas y quitinazas desarrollan una clava que penetra la epicutícula y la cutícula, libera enzimas tóxicas que llegan a la hemolinfa, lo que produce la muerte del insecto, el hongo continua invadiendo y colonizando el interior del cadáver hasta que lo invade completamente, manifestando desarrollo micelial externamente para luego esporular (Charnley, 1992; Galindo, 2005).

Una vez que el hospedero muere, los hongos emergen de su cuerpo para producir conidias, las cuales son llevadas por el viento, la lluvia o por otros insectos y pueden expandir la infección. Los insectos enfermos dejan de alimentarse, caen en estado letárgico, pueden morir relativamente rápido, en unos cuantos días, estos pueden ser encontrados sobre el follaje o el suelo, cubiertos por micelios y emergiendo por las articulaciones y segmentos del cuerpo (Galindo, 2005).

El proceso de infección de los entomopatógenos sobre los ixódidos, principalmente en la fase de huevo, se inicia con la adhesión de la espora sobre el corion y después de dos a cuatro días se observan las hifas de forma filamentosa emergiendo del huevo. Estas son de color verde olivo para *M. anisopliae*, blanco algodonoso para *B. bassiana* y rosado para *P. fumosoroseus* (Galindo *et al.*, 2001).

En adultos ixódidos y dípteros es poco conocido su mecanismo de infección. Samsinokova *et al.* (1974) señalan que los adultos infectados por hongos no muestran signos particulares previos, solo hasta después de su muerte, cuando las condiciones higrotérmicas son

adecuadas, el hongo emerge del interior del tegumento para formar cuerpos hifales y posteriormente esporulan en la superficie, transformándose en un nuevo foco de infección.

La importancia del control biológico con entomopatógenos, en huevo de garrapatas, radica en que este primer estado biológico está como fase libre en pradera y no ha causado daño al hospedero, por lo que en este período pudiera implementarse la aspersión de estos hongos en pradera para su control, además de que la fase de huevo es más susceptible a los hongos (Galindo, 1988; Lezama y Hernández, 1989).

Onofre *et al.* (2001) refieren que el hongo *M. flavoviride* var. *flavoviride* cepa CG291 efectiva en adultos de *B. microplus* con las concentraciones de 1×10^7 y 1×10^8 conidias/mL incubadas a 27°C y 80% de humedad relativa por 7 días demostró que reduce la ovoposición y el porcentaje de eclosión en 100% de control. Para la garrapata adulta *Rhipicephalus appendiculatus* (Kaaya *et al.*, 1996) encontró que *M. anisopliae* y *B. bassiana* inducen altas mortalidades de hembras confinadas en la oreja sobre becerros de cebú, así como en condiciones de laboratorio y bolsas de nailon (tetrapacks) en campo, las modalidades fueron similares.

CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

Localización

Las investigaciones se realizaron en el Laboratorio de Parasitología y en el Módulo de Investigación-Producción Bovina de la Estación Experimental de Pastos y Forrajes "Indio Hatuey", ubicada en el Central España Republicana, (Perico, Matanzas) a los 22°48'7" de latitud Norte y los 81°1' de longitud Oeste y a 19,01 msnm.

Las investigaciones se realizaron en dos experimentos:

Experimento I

Evaluación de diferentes medios biológicos sobre las fases del ciclo de vida de las garrapatas a nivel de laboratorio

Experimento II

Determinación de los efectos de los medios biológicos en la prevalencia de las garrapatas en vacas en pastoreo

Esta tesis fue financiada por el proyecto "Utilización de la medicina alternativa en los sistemas ganaderos", del Programa de Ganado Mayor del Ministerio de la Agricultura (MINAGRI).

Descripción de las investigaciones

Experimento I

Tratamientos

Se evaluarán tres medios biológicos *Bacillus turhingiensis*, *Verticillium lecanii* y *Beauveria bassiana*, con la utilización de un diseño experimental totalmente aleatorizado, con cinco réplicas para cada uno.

En cada medio biológico se evaluará su efecto sobre las diferentes fases del ciclo de las garrapatas (huevos, larvas y adultos). Además se utilizó un tratamiento control basado en la aplicación de agua destilada.

Se seleccionó la especie *Boophilus microplus* para la realización de los estudios *in vitro* a partir de los resultados del diagnóstico inicial del rebaño, donde se mostró como la especie de mayor representatividad.

Descripción de los medios biológicos

Los medios biológicos utilizados fueron producidos en el Laboratorio de Controles Biológicos de la CPA 6to. Congreso Campesino, en el municipio de Colón. Centro de referencia nacional en la producción de entomopatógenos.

A. *Bacillus turhingiensis*. Bacteria. Su reproducción se realiza sobre cabecilla de arroz, enriquecida con sales de hierro, magnesio, manganeso y con carbonato de calcio. Se aplica 10 mL, proveniente de un preinóculo con una concentración de 10^{6-7} esporas por mL de solución, por cada 120 g de cabecilla humedecido y esterilizado en autoclave a 120 grados y 1,5 ATM de presión. Después se deja reposar durante tres días y posteriormente es cosechado, secado y envasado con un título final de 10^9 esporas/mL.

B. *Verticillium lecanii*. Hongo. Su reproducción se realiza sobre cabecilla de arroz. Se aplica 20 mL, proveniente de un preinóculo con una concentración DE 10^{6-7} esporas por ml de solución, por cada 120 g de cabecilla humedecido y esterilizado en autoclave a 120 grados y 1,5 ATM de presión. Después se deja reposar durante 5 - 7 días y posteriormente es cosechado, secado y envasado con un título final de 10^9 esporas/mL.

C. *Beauveria bassiana*. Hongo. Su reproducción se realiza sobre cabecilla de arroz. Se aplica 20 mL, proveniente de un preinóculo con una concentración de 10^{6-7} esporas por mL de solución, por cada 120 g de cabecilla humedecido y esterilizado en autoclave a 120 grados y 1,5 ATM de presión. Después se deja reposar durante 5 - 7 días y posteriormente es cosechado, secado y envasado con un título final de 10^9 esporas/mL.

Se utilizó una sola dilución para cada uno de los medios biológicos en estudios, los cuales se hicieron a partir de productos madres con una concentración de 10^{-9} esporas/mL, considerando las recomendaciones establecidas por el Instituto Nacional de Sanidad Vegetal para estos medios.

A continuación se presentan imágenes relacionadas con la fase de producción de los entomopatógenos en el laboratorio de la cooperativa. A los cuales se les realizó, además, las pruebas de control de calidad.



Procedimiento experimental

Para la ejecución de este experimento se colectaron suficientes cantidades de garrapatas adultas ingurgitadas (repletas de sangre) en el momento del ordeño, las cuales fueron divididas en dos grupos. El primero para la realización de las pruebas con adultos y el segundo para la producción de huevos y larvas.

En el caso de los huevos se evaluaron 100 ejemplares en cada réplica. Estos fueron depositados sobre placas Petri y separados al estereoscopio con una pinza entomológica plástica para evitar los daños en los huevos. Los medios biológicos se aplicaron por goteo hasta que la masa de huevos quedó totalmente bañada por cada medio.

Mientras que en las larvas y los adultos se utilizaran 50 ejemplares en cada réplica, que se ubicaron igualmente en placas Petri, pero sobre cinta adhesiva, para evitar la movilidad de cada uno de los individuos, a través del método de inmersión, en ambos casos, según la metodología descrita por Rodríguez y Figueroa (2006).

A continuación se presentan imágenes del montaje de las pruebas *in vitro* en el laboratorio.



Las evaluaciones se realizaron cada 24 horas por 30 días posteriores a la aplicación de los medios biológicos.

Mediciones experimentales

- A. Porcentaje de mortalidad de los huevos.
- B. Momento de eclosión.
- C. Momento de la muda a fase larvaria (en aquellos que logren sobre vivir).
- D. Porcentaje de mortalidad de las larvas.
- E. Definición de las características de vitalidad en las larvas.
- F. Porcentaje de mortalidad de los adultos.
- G. Momento de la puesta y características de los huevos (en aquellos que logren sobre vivir).
- H. Peso de la postura.
- I. Definición de las características de vitalidad en los adultos.

EXPERIMENTO II

Tratamientos

Se evaluarán los dos medios biológicos con mejores resultados a nivel de laboratorio, mediante un diseño experimental totalmente aleatorizado.

- A. Medio biológico I. *Verticillium lecanii*
- B. Medio biológico II. *Beauveria bassiana*

Procedimiento experimental

Se utilizaron 22 vacas en ordeño por tratamiento, a las cuales se le realizó un diagnóstico inicial para determinar el nivel de infestación por garrapatas e identificar las especies presentes en el rebaño, a través del método de medición por umbral al 100% de los animales en estudio, según la metodología de Rodríguez y Figueroa (2006). Para la taxonomía se utilizó las claves descritas por Parra *et al.* (1999).

Al igual que en las pruebas a nivel de laboratorio se utilizó una sola dilución para cada uno de los medios biológicos en estudio, los cuales se hicieron a partir de productos madres con una concentración de 10^{-9} esporas/mL.

El baño de los animales se realizó manualmente con el empleo de una motomochila, a través del método de aspersión hasta que los animales quedaron totalmente húmedos, en el horario de la tarde entre las 5 y las 6, después del pastoreo, para evitar la inactivación de los medios por el efecto de las temperaturas.

La concentración fue de 40 g del medio biológico por mochila en 16 litros de agua. Los medios biológicos fueron puestos a remojar previamente en intervalos de 6 a 8 horas, para disolver las esporas en el medio líquido y aumentar su capacidad infestiva.

Imágenes que muestran las condiciones y la aplicación de los medios biológicos a los animales



Cada grupo de animales fue dividido en dos subgrupos para la evaluación de las frecuencias de baños (15 y 30 días respectivamente), cada uno con 11 animales.

Las evaluaciones y recolecciones de muestras se hicieron en función de la frecuencia de los baños, con observaciones cada 7 días.

Las garrapatas colectadas fueron trasladadas al laboratorio para estimar la puesta y el porcentaje de eclosión.

Mediciones experimentales

Porcentaje de mortalidad de las garrapatas en función a la frecuencia de baños.

Aparición de nuevas fases vivas.

Porcentaje de eclosión y postura.

Análisis estadístico

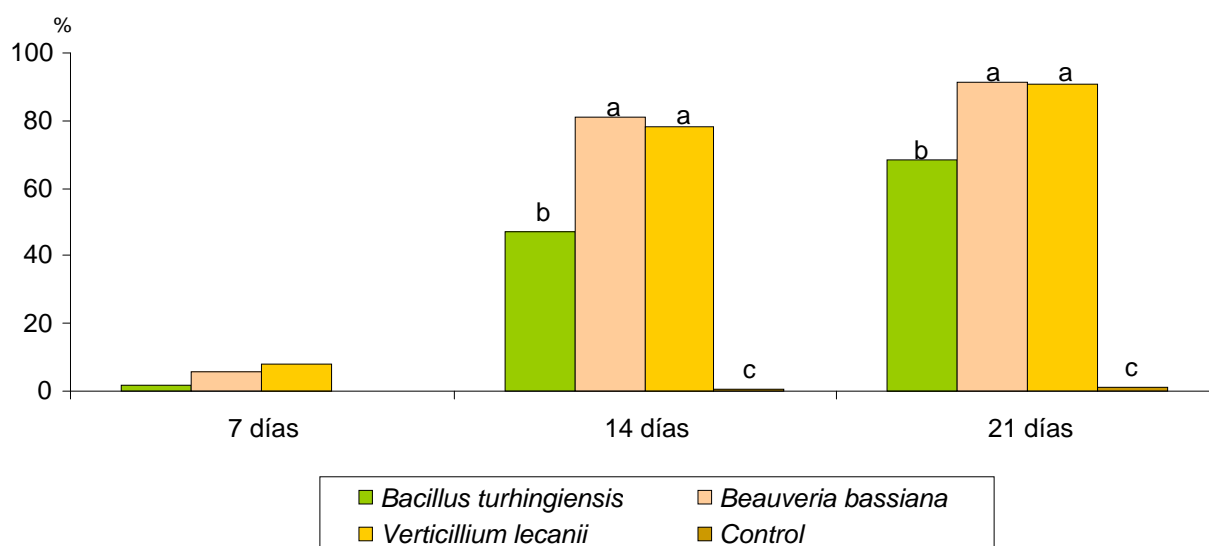
Para el análisis de varianza y los cálculos de los estadígrafos de dispersión se utilizó el paquete estadístico SSPS versión 10.0.1 para Windows. Para la comparación de las medias se empleó la dócima de comparación de rangos múltiples de Duncan (Steel y Torrie, 1992), para un nivel de significación de $P < 0,05$.

Estas variables fueron transformadas según las directrices regulatorias europeas para preparaciones ectoparasíticas (Thrusfield *et al.*, 1997).

CAPITULO III. RESULTADOS Y DISCUSION

EXPERIMENTO 1. Evaluación de diferentes medios biológicos sobre las fases del ciclo de vida de las garrapatas a nivel de laboratorio

Al evaluar el efecto de los medios biológicos sobre la mortalidad de garrapatas adultas ingurgitadas o repletas (fig. 1) se pudo apreciar que existe un efecto positivo en todos los tratamientos utilizados. Con los mejores resultados para *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii* ($P < 0,05$) los cuales superaron el 90% de mortalidad pasado los 21 días de aplicados los medios biológicos. Mientras que, *Bacillus turhingiensis* solo alcanzó el 68% de mortalidad en igual momento.



a, b Valores con superíndices diferentes difieren a $P < 0,05$ (Duncan, 1955) * $P < 0,05$

Fig. 1. Por ciento de mortalidad de garrapatas adultas con la aplicación de diferentes medios biológicos.

Desde mediados del siglo pasado se reportó un importante grupo de reguladores biológicos en las garrapatas en los ecosistemas ganaderos. Samsinakova *et al.* (1974) encontraron la presencia de micelios de *Beauveria tenella* cerca de la boca y en la región ventral del cuerpo de hembras del género *Ixodes* y aseguró que este hongo posee excelentes potencialidades para el control de las garrapatas. Aunque no es la misma especie que la utilizada en estas investigaciones, sus mecanismos de acción son similares a *Beauveria bassiana*.

Por su parte, Rijo (2009) informa que la utilización de bioacaricidas a base de aislados de los hongos *Verticillium lecanii*, *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* tiene una acción micótica que altera significativamente la fase no parasítica de la garrapata.

Así mismo, Bustamante *et al.* (2009), al aplicar diluciones 1×10^8 conidias/mL en estadios ninfales y adultos de *B. microplus*, observaron la muerte de las garrapatas después de 6 días de aplicación de *Verticillium lecanii* y a los 8 días con *Beauveria bassiana*. Sin embargo, Rozas *et al.* (2009) aseguran que la mortalidad ocasionada a *Boophilus microplus* por *Beauveria bassiana* (59,19%) es más elevada que la producida por *Verticillium lecanii* (46,95%).

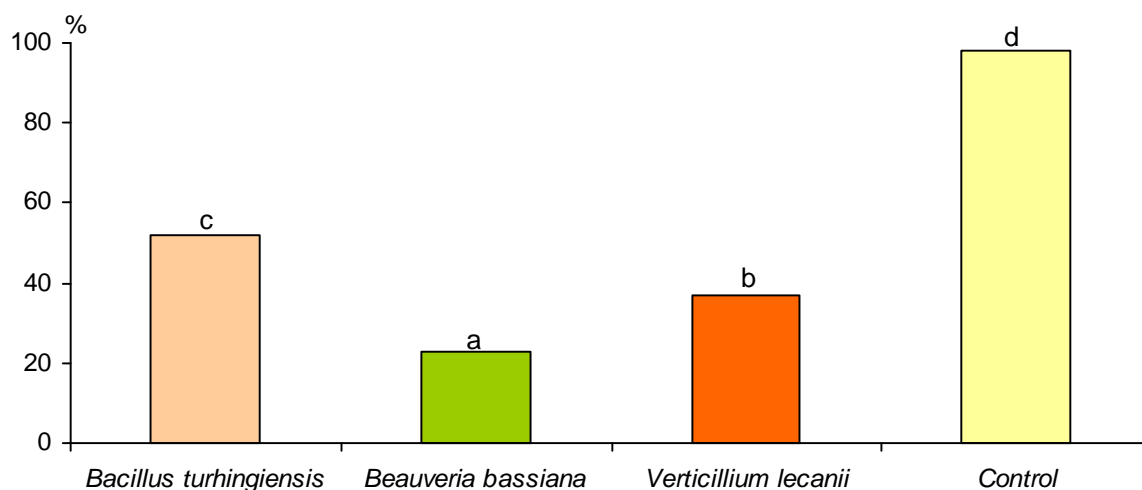
Los resultados alcanzados en este estudio son similares a los reportados por Monteiro *et al.* (1994) y Bittencourt *et al.* (1994), quienes señalaron un control del 97% con el uso de *M. anisopliae* sobre partenoginas y hembras repletas de *B. microplus* a nivel de laboratorio y bajo condiciones controladas.

Por otra parte, Correia *et al.* (1994) informan que la patogenicidad de los hongos entomopatógenos, sobre garrapatas adultas, se incrementa en la medida que aumenta la concentración de los biopreparados. Al respecto es importante señalar que estos estudios se realizaron, en consideración a los reportes realizados por el Instituto Nacional de Sanidad Vegetal, pionero de estas investigaciones en Cuba, con una concentración de 10^9 .

Sin embargo, nuestros resultados fueron menores que los informados por Samish y Glazer (1992), quienes al evaluar en condiciones similares la acción reguladora de diferentes concentraciones de *Steinernema carpocapsae* a *B. microplus*, observaron un 100% de mortalidad a los dos días de infestado el ectoparásito con una concentración de 10 000 nematodos por placa. Al parecer porque este medio biológico no solo por su carácter agresivo, sino porque su concentración también es más alta.

Por su parte, la figura 2 muestra el porcentaje de postura de las garrapatas bañadas con medios biológicos pasado los 21 días. El menor porcentaje de postura fue para aquellas tratadas con *Beauveria bassiana*, que solo alcanza el 23%, difiriendo significativamente ($P < 0,05$) de *Verticillium* y *Bacillus* con 37 y 52% respectivamente. Resultados que están estrechamente relacionados con los porcentajes de mortalidad, ya que muchas de ellas mueren antes de alcanzar la puesta de sus huevos. Resultados similares fueron reportados por Alvarez *et al.* (2003), pero al evaluar *Verticillium lecanii* y *Metarhizium anisopliae*.

Mientras que el tratamiento control ovoposito el 98%, lo que indica que estos artrópodos tienen una alta resistencia y adaptación al medio ambiente, aun en condiciones de laboratorio. Según Rodríguez (2009), pueden llegar a pasar varios meses sin alimentarse, gracias a que poseen un exoesqueleto duro que recubre su cuerpo segmentado, protegiéndolas de las condiciones adversas.



a, b Valores con superíndices diferentes difieren a $P < 0,05$ (Duncan, 1955) * $P < 0,05$

Fig. 2. Porcentaje de postura a los 21 días de la aplicación de los medios biológicos.

Los hongos actúan por contacto, invaden el cuerpo de las garrapatas para finalmente causar su muerte (Fernández, 1997). La forma de penetración de los entomopatógenos es generalmente a través del tegumento del hospedero, con la utilización de mecanismos enzimáticos y mecánicos, aunque también pueden utilizar sus orificios naturales, tales como: tracto digestivo, partes bucales, orificio anal y tráquea o espiráculos para su invasión (Galindo, 2005).

Según Galindo *et al.* (2001), los adultos infectados por entomopatógenos que no mueren se les afecta significativamente el tracto genital, por lo que disminuye la cópula entre hembras y machos, así como la postura.

El proceso de postura (ovoposición) comenzó aproximadamente entre los días 9 y 10 similares a los reportados por Benavidez (1984) en Colombia y De La Vega (1985) en Cuba, quienes informan que pueden extenderse hasta los 15 días si las condiciones de temperatura y humedad relativa no son constantes. Aunque según estos autores el peso de las

garrapatas puede incidir significativamente, ya que las garrapatas más pesadas inician la puesta en un lapso más rápido que aquellas de un menor peso.

Al momento de la puesta, los huevos presentaban color amarillo pardo y forma ovoide, con el paso del tiempo se comienza a preciar signos de deshidratación y deformación de sus límites, con apariencia de desecación, una coloración intensa y puntos negruzcos en su interior. Sin embargo, en el tratamiento control los huevos mantienen sus características, iniciándose la eclosión aproximadamente a los 25 días, para pasar al estadio larval.

La aplicación de los medios biológicos tuvo un efecto significativo ($P < 0,001$) en la disminución del peso de la postura en las hembras tratadas con respecto al tratamiento control (fig. 3). Resultados similares fueron encontrados por Alvarez *et al.* (2003), en investigaciones realizadas en Costa Rica, donde apreciaron pesos de 0,24, 0,43 y 1 g para los tratamientos con *Metarhizium anisopliae*, *Verticillium lecanii* y control, respectivamente.

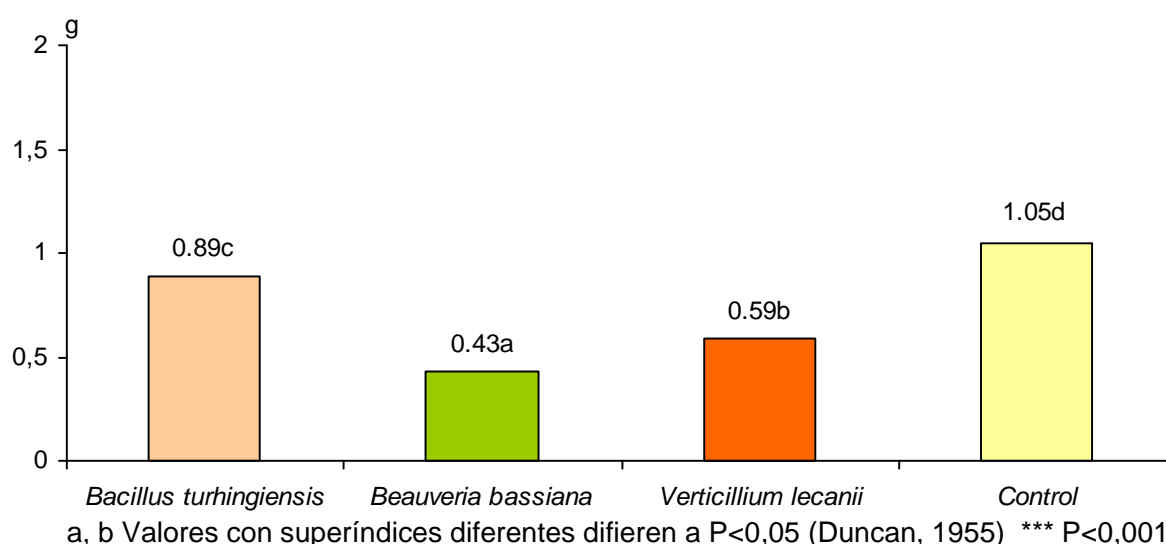
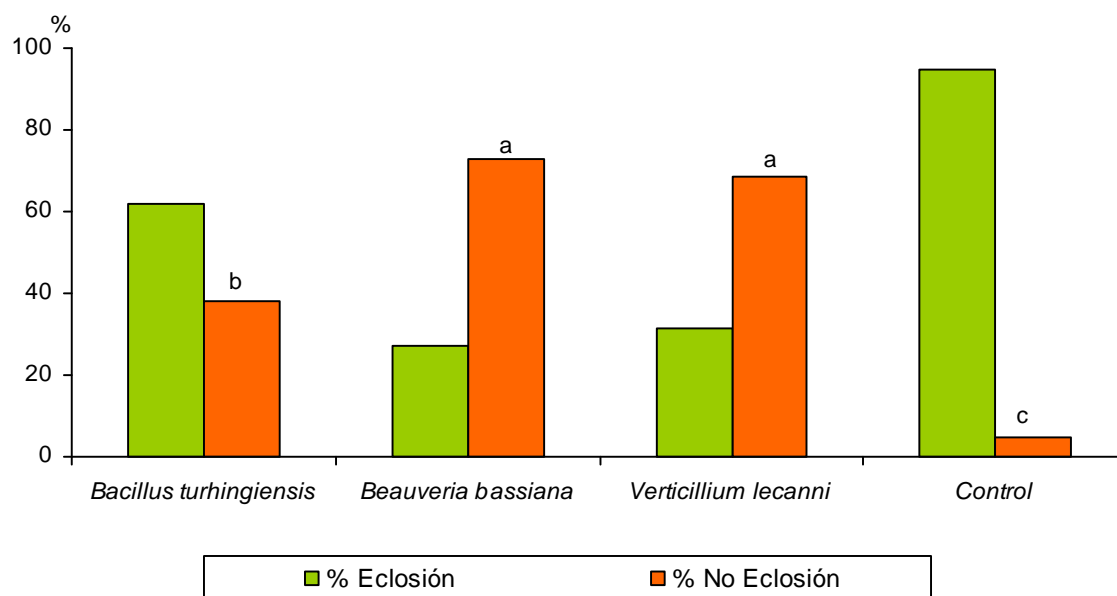


Fig. 3. Peso de los huevos en hembras tratadas con los medios biológicos (g).

En todos los casos se observó una disminución significativa, tanto en el número de posturas como en la cantidad de huevos por posturas. Sin embargo, la diferencia más notoria la representa el porcentaje de eclosión de los tratamientos con medios biológicos con respecto al control. La figura 4, por su parte, muestra la eclosión de los huevos provenientes de dichas garrapatas tratadas con medios biológicos. Los mejores resultados de no eclosión fueron para *Beauveria* con 72%, seguidos de *Verticillium* con 68,6%. Sin embargo, el tratamiento control alcanzó un 95% de eclosión.



a, b Valores con superíndices diferentes difieren a $P < 0,05$ (Duncan, 1955) * $P < 0,05$

Fig. 4. Porcentaje de eclosión de los huevos provenientes de garrapatas tratadas con medios biológicos.

Por los resultados alcanzados en esta investigación se ha podido apreciar que ambos hongos afectan significativamente los procesos o fases de las garrapatas en su vida no parasitaria. Los altos porcentajes de no eclosión están estrechamente relacionados con las afectaciones fisiológicas que provocan estos medios biológicos en el sistema reproductivo y sobre la fertilidad de las posturas de las garrapatas, las cuales, aun cuando puedan ovopositar sus huevos, son poco viables y vienen contaminados por esporas o por enzimas tóxicas, liberadas por los hongos, que producen la destrucción de los huevos sin que se logre la eclosión a la fase larvaria (Charnley, 1992; Pérez y Patiño, 2009).

De manera general, el comportamiento de *Bacillus turhingiensis*, en todas las fases evaluadas ha sido muy discreto, lo que significa que sus efectos como control biológico de las garrapatas es menos significativo que los hongos entomopatógenos.

Según Junquera (2007), los estudios realizados con *Bacillus turhingiensis* (Bt) han tenido poco efecto, ya que para afectar a las garrapatas debe ser fundamentalmente ingerida, pues actúa en el intestino. Esto puede ser la causa de que sus resultados no fuesen significativos en comparación con los demás medios biológicos estudiados.

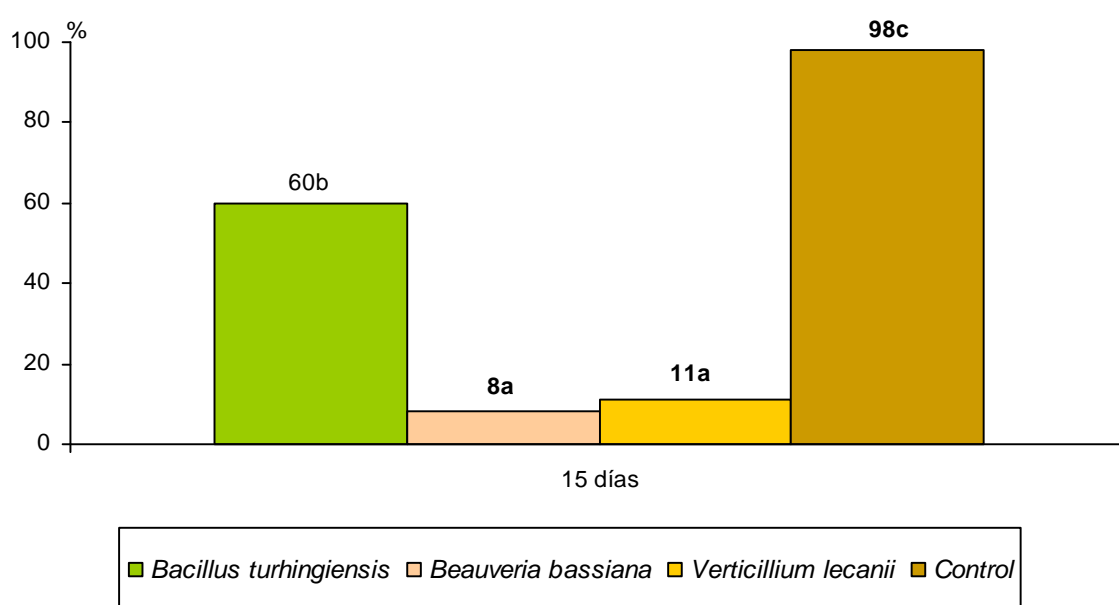
Por otra parte, las condiciones climáticas pueden impedir o favorecer que los agentes de control biológicos alcancen su potencial pleno en el control, aun en condiciones de

laboratorio, por su sensibilidad a los cambios de temperatura y humedad (Kaaya y Gaugler, 1993), ya que la aplicación de los organismos entomopatógenos puede ser eficaz, en dependencia de la especie y cepa, por sus diferencias en vivencia y virulencia.

Al realizar esta investigación, pero con la aplicación de los medios biológicos sobre huevos recién puestos, se apreció un efecto muy similar al de aquellos provenientes de garrapatas bañadas (fig. 5). Los mejores resultados fueron para *Beauveria* y *Verticillium* con una supervivencia de solo el 8 y 11%, respectivamente, con respecto al tratamiento control que alcanzó el 98%.

Resultados similares fueron reportados en las condiciones de Cuba por Castiñeiras *et al.* (1987), donde se demostró la efectividad de dos aislamientos de *B. bassiana* y tres de *M. anisopliae* que eliminaron el 92% de los huevos en 15 días, en condiciones de laboratorio similares a las de esta investigación.

Así mismo, Bittencourt *et al.* (1994) informan porcentajes de mortalidad del 97% en huevos expuestos al efecto de hongos entomopatógenos, pero en estudios realizados a nivel de laboratorio en Brasil.

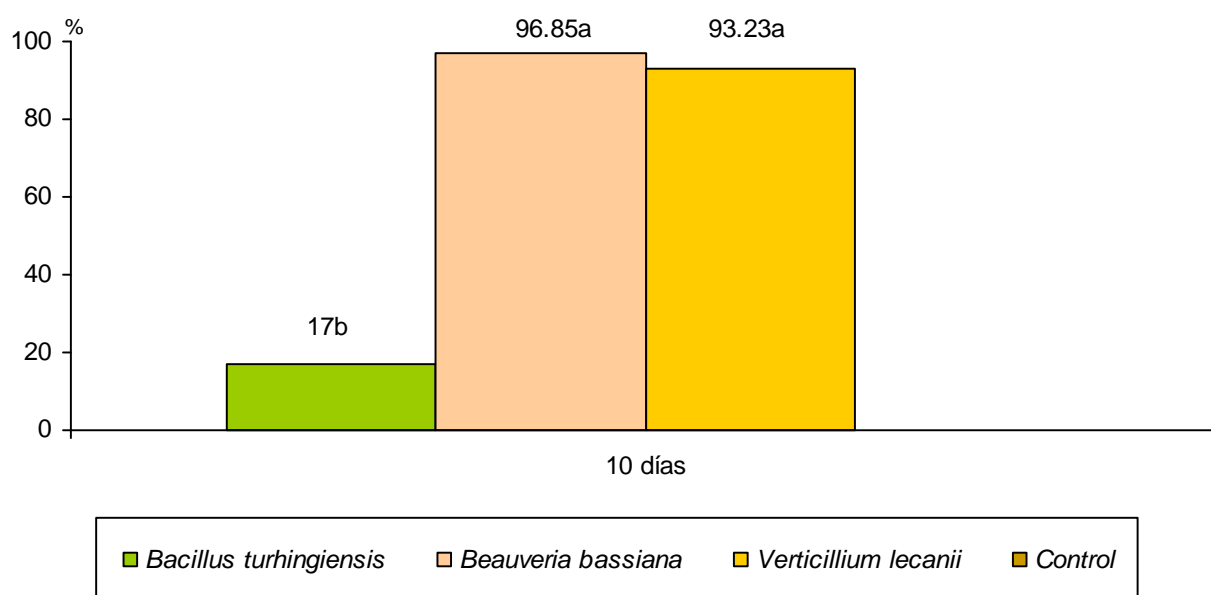


a, b Valores con superíndices diferentes difieren a $P < 0,05$ (Duncan, 1955) * $P < 0,05$

Fig. 5. Viabilidad de los huevos expuestos a los diferentes medios biológicos a los 15 días de aplicación.

El proceso de infección de los hongos entomopatógenos sobre la fase de huevo se inicia con la adhesión de la espora sobre el corion y después de 2 a 4 días se comienza a observar las primeras hifas de forma filamentosa, que emergen de los huevos si las condiciones ambientales son favorables para el desarrollo de los medios biológicos utilizados (Galindo *et al.*, 2001). Sin embargo, la pérdida de la viabilidad de los huevos se puede presentar sin la aparición de las hifas, las cuales pueden tardar. Estos cuerpos hifales posteriormente esporulan en la superficie, transformándose en un nuevo foco de infección para aquellos que no están contaminados.

Al probar el efecto de los medios biológicos sobre larvas provenientes de huevos sin tratamientos, no se observaron diferencias significativas entre los medios *Beauveria* y *Verticillium*, cuyos valores estuvieron por encima del 90% de mortalidad (fig. 6).



a, b Valores con superíndices diferentes difieren a $P < 0,05$ (Duncan, 1955) * $P < 0,05$

Fig. 6. Mortalidad de los huevos expuestos a los diferentes medios biológicos a los 15 días de aplicación.

Estos resultados son similares a los encontrados por Romaña *et al.* (1987), quienes probaron 14 aislamientos de hongos entomopatógenos (*Beauveria bassiana*, *B. brongiarthii*, *Metarhizium anisopliae*, *Nomuraea rileyi* y *Paecilomyces fumoso-roseus*) para controlar larvas del primer estadio de diferentes géneros de garrapatas, donde la mortalidad varió entre el 30 y 100%.

Por su parte, Rijo (2009) resalta no solo las propiedades ovicidas del hongo *V. lecanii*, sino que informa una mortalidad del 100% de las larvas del ectoparásito por su acción micótica al producir la infestación del 30-40% de la masa de huevos.

Los experimentos demostraron que los hongos entomopatógenos matan a las garrapatas en un alto porcentaje, con lo que afectan significativamente a las hembras en el momento de la puesta de los huevos. Estos medios biológicos son altamente infectivos para cepas de garrapatas susceptibles y resistentes a los organofosforados, así ha sido demostrado en investigaciones bajo condiciones de laboratorio por Álvarez *et al.* (2003) y Fernández *et al.* (2005), con la producción de deficiencias nutricionales y daños patológicos de los tejidos internos de la garrapata.

EXPERIMENTO II. Determinación de los efectos de los medios biológicos en el comportamiento de las garrapatas en vacas en pastoreo

A partir de los resultados a nivel de laboratorio se hicieron ensayos en condiciones de campo y se evaluó el efecto de *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii* en el comportamiento de las garrapatas en vacas en pastoreo. Para lo cual se realizó una caracterización al inicio y final del experimento de los géneros presentes en el rebaño (fig. 7).

Se pudo apreciar un predominio del género *Boophilus* dentro del rebaño en la fase inicial, sin embargo, los porcentajes disminuyeron de un 92,3 a un 67,3%. Mientras que *Amblyomma* manifestó una tendencia aumentar discretamente dentro del rebaño. Ambos géneros están ampliamente distribuidas por el mundo, especialmente en los países tropicales y subtropicales, donde afectan significativamente la producción ganadera (Basco Basco *et al.*, 2008).

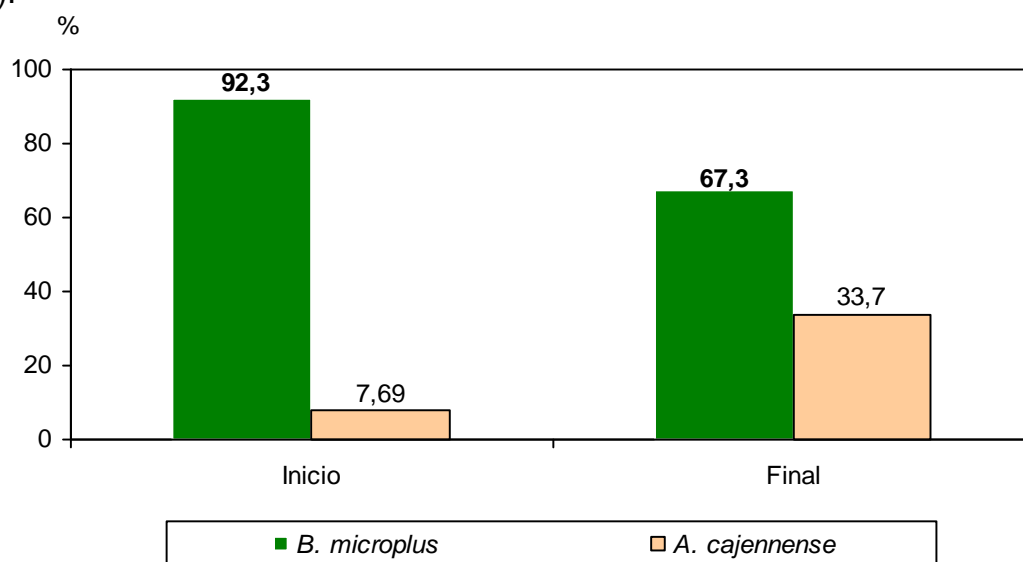
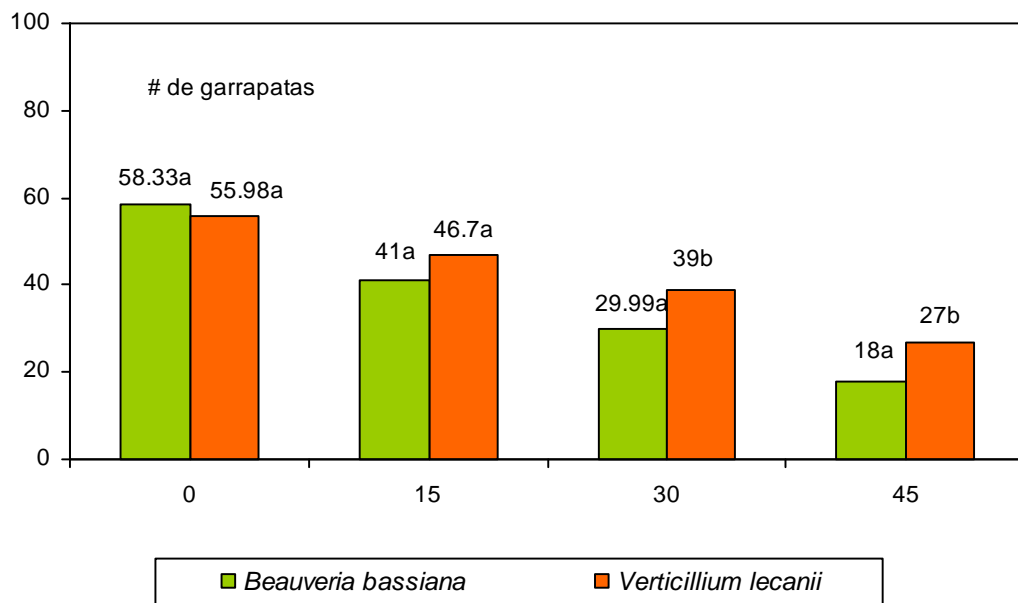


Fig. 7. Géneros de garrapatas presentes en el rebaño lechero.

Al evaluar los intervalos de 15 y 30 días para la realización de los baños con los medios biológicos a los animales en pastoreo (figura 8 y 9) se pudo apreciar que para aquellos cuya frecuencia era de 15 días se manifestó una disminución lineal de la cantidad de garrapatas promedios por cada animal. Siendo los mejores resultados para *Beauveria bassiana* con una reducción del 69,14% con respecto a la carga inicial de garrapatas. Solo se apreciaron diferencias significativas a los valores alcanzados por *Verticillium lecanii*, a partir de los 30 días.



a, b Valores con superíndices diferentes difieren a $P < 0,05$

Fig. 8. Evaluaciones en intervalos de baños de 15 días.

Sin embargo, en los intervalos de 30 días la disminución de la carga parasitaria no fue apreciable en los animales, *Beauveria bassiana* mostró una discreta disminución, mientras que *Verticillium lecanii*, comienza aumentar ligeramente después de los 60 días, pero sin diferencias significativas.

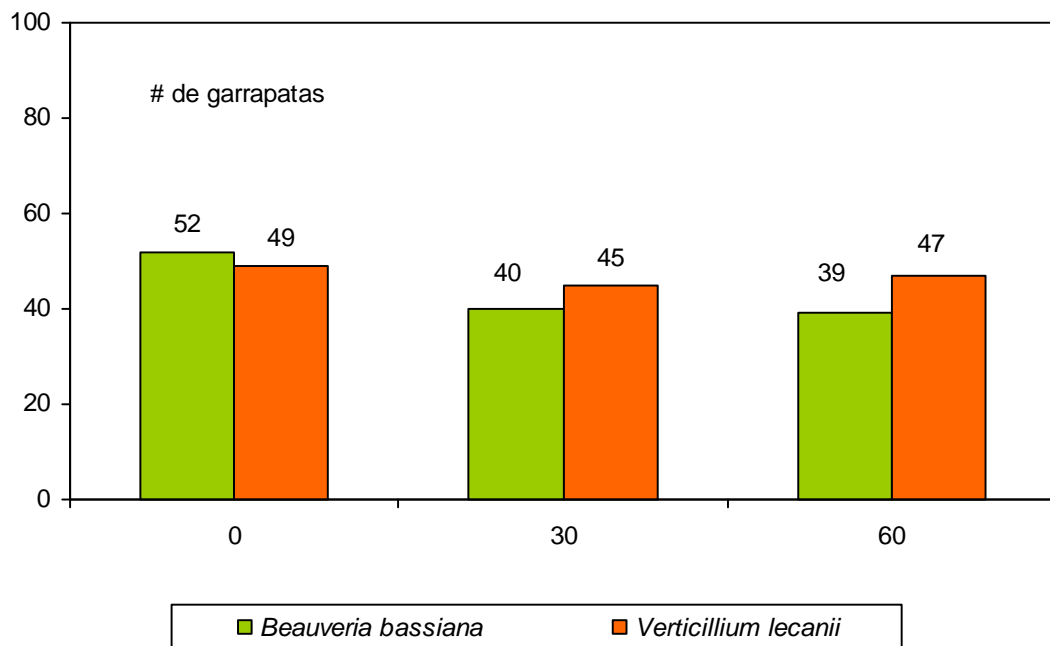


Fig. 9. Evaluaciones en intervalos de baños de 30 días.

Estos resultados, aunque con una tendencia similar, son inferiores a los informados por Taylor (2008) al evaluar en Costa Rica el efecto del EM5 (microorganismos benéficos) en la prevalencia de garrapatas en vacas lecheras en pastoreos, para el autor las afectaciones principalmente se aprecian en el estadio de ninfa, donde este medio biológico al parecer genera un proceso de deshidratación, las cuales terminan por caerse secas de la piel de la vaca.

Sin embargo, no coinciden totalmente con los reportados por Rijo (2009) quien observo en investigaciones con novillos estabulados un efecto altamente significativo de productos biológicos a base de *V. lecanii* sobre los estados parasíticos de *B. microplus*, con una reducción total del ectoparásito al cuarto tratamiento.

En otras investigaciones con diferentes medios químicos y biológicos en condiciones de producción esta misma autora señala que frecuencias de 14 días son los que mejores resultados permiten cuando utilizamos medios de control de este tipo. Las cuales pueden tener un mejor efecto en la medida que disminuimos la cantidad de días entre los baños.

Otra variable evaluada en los tratamientos fue el tiempo promedio de mortalidad (en días) de las garrapatas, causadas por *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii*, encontrándose mortalidad tanto de los estadios inmaduros como de las garrapatas adultas, de 8 y 9,2 días respectivamente para cada uno de los medios (tabla 1), sin diferencias significativas.

Tabla 1. Días promedios de mortalidad en los tratamientos.

Tratamientos	Días promedios	± DS
<i>Beauveria bassiana</i>	8	1,2
<i>Verticillium lecanii</i>	9,2	1,4

Las garrapatas muertas recolectadas de los animales fueron trasladadas al laboratorio y fueron colocadas en cámara húmeda, pudiéndose detectar en las mismas, la presencia de hifas de ambos hongos.

Asimismo se recolectaron adultos vivos de ambos tratamientos, registrándose la cantidad de postura y su porcentaje de eclosión para determinar el efecto de los hongos sobre sus progenies. En todos los casos se observó una disminución significativa, tanto en el número de posturas como en la cantidad de huevos por posturas. Aunque *Verticillium lecanii*

presentó un mayor porcentaje de postura que *Beauveria*, los porcentajes de no eclosión fueron similares (fig. 10).

Pérez y Patiño (2009) encontraron resultados similares a los nuestros cuando evaluaron los medios por separado. Sin embargo, con las mezclas de *Beauveria* y *Metarhizium* alcanzaron porcentajes cercanos al 82% de no eclosión a la fase larval, asegurando que la sinergia de ambos biológicos se complementa al unirse, logrando resultados más significativos, sin que existan daños para ninguno de los dos medios.

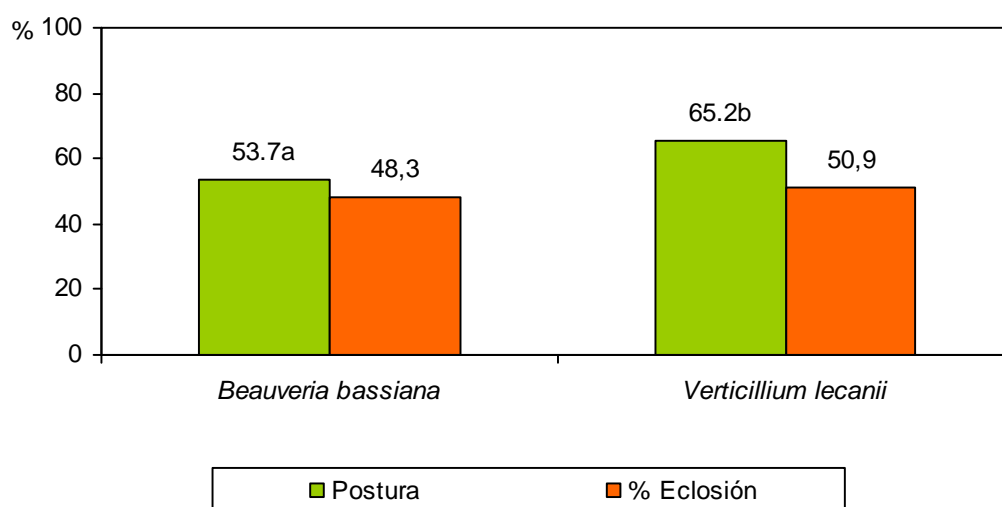


Fig. 10. Postura y porcentaje de eclosión en los tratamientos.

Por todos es conocido que los medios biológicos reducen las poblaciones de los agentes indeseables, no de forma espectacular como los productos químicos, pero se llegan a establecer en el medio y en el caso de los microorganismos forman epizootias en el agroecosistema y no afectan en gran medida a la entomofauna beneficiosa; por ejemplo, *V. lecanii* al igual que *B. bassiana* y *M. anisopliae* son inocuos a la hormiga *Pheidole megacephala*, depredador de huevos, larvas y adultos de *B. microplus* para las condiciones de Cuba (Rijo, 2009).

El efecto residual y la alta capacidad de dispersión de los hongos entomopatógenos en el medio le permiten que se reproduzcan en los diferentes huéspedes y en sus diferentes generaciones; donde el viento, el agua, el suelo, los animales, los parasitoides y los predadores juegan un papel importante en la diseminación del inoculo. Sin embargo, las condiciones ambientales, en especial la temperatura y la humedad relativa, pueden determinar en gran medida sus dinámicas (Rath, 2000).

Gracias a que las garrapatas están expuestas a un gran número de reguladores biológicos, eso nos permite comprender por qué no son aún mayores los niveles de plagas que pululan en nuestros sistemas ganaderos, si tenemos en cuenta la alta resistencia de estos ectoparásitos y su capacidad para reproducirse, con una viabilidad por encima del 90%.

Pero los resultados nos dicen que los biológicos no deben mirarse ni compararse con los efectos inmediatos que se alcanzan con los productos químicos. Pues su efecto es hacia el futuro, en donde no solo actúa sobre el artrópodo presente sino que afecta su progenies, volviéndolos más débiles y menos numerosos. Estos son los llamados efectos subletales. Esta disminución es factible en función de la presencia de esporas de los microorganismos en los sistemas de explotación pecuarios, lo que permite una acción de control de relativa permanencia (Pérez y Patiño, 2009).

Por otra parte, De Moura Souza *et al.* (2005) y Ortiz y Franco (2005) afirman que los métodos de forma aislada resultan totalmente eficaces en el control de los ixódidos. Sin embargo, Polanco (2001) refiere que sólo un manejo integrado, donde se combinen armónicamente los diferentes métodos, resulta verdaderamente efectivo en el control de estos ectoparásitos.

Ortiz y Franco (2005) exponen que un programa de control, con base en la aplicación de baños con acaricidas combinados con medios biológicos y la aplicación de inhibidores del crecimiento, es una táctica que abate las poblaciones de garrapatas y alarga la vida útil del recurso baño.

De Moura Souza *et al.* (2005), en un estudio realizado en Brasil, refieren que antes del empleo de la lucha integrada (baños acaricidas y vacunación) ascendían a 20 baños ixodicidas como promedio anual; sin embargo, después del primer año de combinar el método químico y el biológico, el número de baños se redujo a 12, para realizar solamente tres baños al cabo de los tres años de emplear la combinación de los métodos de lucha. Polanco (2001) comprobó que con la utilización de un manejo integrado contra las garrapatas no solo se obtuvo un control superior de los ixódidos, sino que también se logró espaciar el intervalo entre baños acaricidas de 49,9 días (en el grupo donde sólo se aplica el método químico) a 170,4 días (en el grupo donde se aplica la combinación del método químico y el control inmunológico mediante Gavac); al tiempo que reportó reducciones considerables de la morbilidad y mortalidad por babesiosis. Este autor explica que la aplicación de la lucha integrada arrojó una ganancia general de 34 558,46 pesos, una reducción de pérdidas del 25,17 % y una tasa de beneficio costo de 1,36 pesos.

CONCLUSIONES

- Los mayores porcentajes de mortalidad en adultos, a nivel de laboratorio, se correspondieron con la aplicación de los medios biológicos *Beauveria bassiana* y *Verticillium lecanii*, los cuales difirieron significativamente de *Bacillus turhingiensis*.
- La aplicación de los medios biológicos tuvo un efecto sobre la postura de la garrapata y la cantidad de huevos por postura, así como sobre la eclosión y viabilidad de las larvas.
- El medio *Beauveria bassiana* mostró los mejores resultados en la disminución de la carga parasitaria por garrapatas en los animales en pastoreo.

RECOMENDACIONES

- Profundizar en los estudios a nivel de laboratorio sobre el efecto de los medios biológicos en otros géneros.
- Ampliar las investigaciones sobre la frecuencia de los baños, el momento y la carga parasitaria.
- Estudiar el efecto de los medios biológicos sobre la fase no parasitaria de la garrapata.
- Impacto de los medios biológicos sobre la fauna del suelo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Aguirre, D. 1999. Prevención de la tristeza bovina. Desarrollo Rural del NOA-INTA. 3(22):13. www.produccion-animal.com.ar
2. Aguirre, D.; Viñabal, A.E.; Salatín, A.O.; Cafrune, M.M.; Volpogni, M.M.; Mangold, A.J. & Guglielmone, A.A. 2000. Susceptibility to two pyrethroids in *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) populations of northwest Argentina. *Vet. Parasitol.* 88:329-334
3. Ainsworth, G.C. 1973. Introduction and keys to higher taxa. In: The fungi: An advanced treatise. (Eds. G.C. Ainsworth, F. K. Sparrow and A.S. Sussman). IVA. Academic Press. New York, USA p. 1-7
4. Alexopoulos, C.J. 1952. Introductory mycology. J. Wiley and Sons, Inc. New York, USA
5. Alfeev, N.I. & Ya. V. Klimas. 1938. Experience in cultivating ichneumon flies, *Hunnerehellus hookeri*, obtained from United States, which destroy Ixodid ticks from soviet fauna. *Priroda*, Moskva 2:98-101
6. Álvarez, V.; Bonilla, R. & Chacón, I. 2003. Comportamiento de la resistencia a los acaricidas organofosforados y piretroides sintéticos por la garrapata *Boophilus microplus* (la garrapata común del ganado) en diez fincas de Costa Rica. *Boletín de Parasitología*. 4:1
7. Álvarez, V.; Obregón, M.; Arguedas, M. & Bonilla, R. 2001. Determinación de la eficacia de hongos entomopatógenos en el control de *Boophilus microplus*. Fase *in vitro*. Memoria del I Encuentro Mesoamericano y del Caribe y III Encuentro Costarricense de Agricultores Experimentadores e Investigadores en Producción Orgánica. p. 90-91
8. Basco Basco, P.I.; Carballedo Álvaro, A.D.; Cota Guajardo, S.C.; Olmeda García, A.S. & Valcárcel Sancho, F. 2008. Estudio de control biológico de garrapatas en la finca "La Garganta". *RCCV*. Vol. 2 (2)
9. Barker, K.R. & Koenning, S.R. 1998. Developing sustainable systems for nematode management. *Ann. Rev. of phytopathol.* 36:165-205
10. Barnett, S.F. 1961. Lucha contra las garrapatas del ganado. FAO. Estudios Agropecuarios. No 5. Roma, Italia. 117 p.
11. Benavides, E. 1984. Biología oviposicional de la garrapata *Boophilus microplus* en condiciones de los Llanos Orientales de Colombia. *Revista ICA*. 19:23-32

12. Betancourt, A.; Patiñot, F.; Torres, O. & Eugenio, B. 2004. Prueba de estado para evaluar la efectividad de Tickvac MK contra la garrapata *Boophilus microplus*. ACOVEZ. Informe Especial: 18-25
13. Bittencourt, V.R.E.P.; Massaro, C.C. & Lima, A.F. 1994. Ação do *Metarhizium anisopliae* na fase nãe parasitaria do ciclo biológico do carrapata *Boophilus microplus*. Em: SICONBIOL, 4, Gramado, RS. Anais. Peloras: EMBRAPA-CPACT. Brasíol. p. 96
14. Bezuidenhout, J.D. & Stutterhein, C.J. 1980. A critical evaluation of the role played by the redbilled oxpecker *Buphagus erythorthynchus* in the biological control of ticks. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 47:51-57
15. Bidochka, M.J.; Kasperski, J.E. & Wild, Gam. 1998. Occurrence of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* in soils from temperate and near-northern habitats. *Canadian Journal of Botany.* 76 (7):1198-1204
16. Boero, J.J. 1957. Las garrapatas del bovino. *Rev. Med. Vet. Bs. Aires.* 37(4):169-174
17. Cardozo, H. & Franchi, M. 1995. Garrapata. Epidemiología y control de *Boophilus microplus*. En: Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos. Bases epidemiológicas para su prevención. (Eds. A. Nari y C. Fiel). Editorial Hemisferio Sur. p. 369-402
18. Castiñeiras, A.; Jimeno, G.; López, Miriam & Sosa, W. 1987. Efecto de la *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* (Fungi imperfecti) y *Pheidole megacephala* (Hymenoptera: *Formicidae*) contra huevos de *Boophilus microplus* (Acarina: *Ixodidae*). *Rev. Salud Anim.* 9:288-293
19. CENICAFE. 1997. Centro de Investigaciones del Café. Boletín Técnico No 17 Departamento de Bacteriología. Colombia
20. Cerny, V. 1969. Las garrapatas ectoparásitas del ganado vacuno. Los ectoparásitos de las gallinas. Serie Ganadería No. 2. Academia de Ciencias de Cuba. p. 1-26
21. Charnley, A.K. 1992. Mechanisms of fungal pathogenesis in insects with particular reference to locust, in biological control of locusts and grasshoppers (Eds. C.J. Lomer y C. Prior). CAB International. Wallingford, UK. p. 181-190
22. Commission European. 2002. Review report for the active substance *Paecilomyces fumosoroseus* (Apopka strain 97, PFR 97 or CG170, ATCC20874). In: Annex 1 of Directive 91/414/EEC, 4203/VI/98, 24 January 2002. Health consumer protection Directorate-General. p. 1-7

23. Cordovés, C.O. & Vitorte, E. 1989. Ecología y control de las garrapatas en la República de Cuba. Organización de la Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma, Italia. p. 223-229
24. Correia, A. do C.B.; Monteiro, A.C. & Fiorion, A.C. 1994. Efeito de quatro concentrações do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapata de bovinos *Boophilus microplus*, em condições de laboratorio. Em: SICONBIOL, 4, Gramado, RS. Anais. Gramado p. 98
25. Costa Lima, A. 1915. The calcid *Hunterellus hookeri* Howard, a parasite of the tick *Rhipicephalus sanguineus* Latreille. Observed in Rio Janeiro. *Revista Veterinaria. Zootech.* 5 (4):200-203
26. CSIRO. 1959. Understanding the cattle tick. No. 24. Melbourne 1-12
27. De Conti, E.; Messias, C.L.; de Souza, H. & Azevedo, J.L. 1980. Electroforetic variation in esterases and phosphatasas in eleven wild type strains of *Metarhizium anisopliae*. *Experientia.* 36, 293-294
28. De la Vega, R. 1985. Estudio de la fase no parasitaria e la garrapata del ganado vacuno *Boophilus microplus* (Ixodoidea: Ixodidae). Aplicación del método de constantes térmicas. Tesis (Candidato a Doctor en Ciencias). Centro Nacional de Sanidad Agropecuaria. La Habana, Cuba. 213 p.
29. De la Vega, R.; Moreno, A. & Díaz, G. 1984. Método de muestreo de la garrapata del ganado vacuno (*Boophilus microplus*) en las vacas lecheras. *Rev. Salud Animal.* 6:397-406
30. De Moura Souza, R.; Scatamburlo, R.; Teixeira, M.H.; Reis, A.J. dos; Seoane, G.; Castillo, E.; Rodríguez, M.; Machado, E.; Borroto, C. & Lleonart, R. 2005. Empleo exitoso de un programa de control integrado de garrapatas del bovino (*B. microplus*) en el estado de Rio de Janeiro, Brasil. Congreso Biotecnología 2005. Habana, Cuba
31. Delmas, J.C. 1973. Influence de lieu the contamination tegumentarie sur le developpement de la micose a *Beauveria tenella* (Delac). Siem. (*Fungi imperfecti*) chez les larves du coleoptere *Melolontha melolontha*. *Pathol. des insect.* 227:433-435
32. De Souza, J.R. 2005. Tristeza parasitaria bovina. In: Carrapatos: Problemas e Soluções (Eds. J. Furlong). EMBRAPA. Juiz de Fora, MG, Brasil. 65 p.
33. De Souza, J.R. & Furlong, J. 2005. Os carrapatos, os carrapaticidas e a resistencia. Em: Carrapatos: problemas e soluções (Eds. J. Furlong). EMBRAPA. Juiz de Fora, MG, Brasil. 65 p.

34. Encinas, A., Oleada, A. y Pérez, R. 1999. Garrapatas duras. En Parasitología veterinaria. (Ed. M. Cordero del Campillo y F.A. Rojo Vázquez). Mc Graw-Hill- Interamericana. Madrid, España. p. 420-429
35. Espaine, C. & Lines, R. 1983. Manual de parasitología y enfermedades parasitarias. Tomo II. Ed. ENPES-MES. Ciudad de La Habana, Cuba. p. 254
36. Estrada Peña, A. & Santos Silva, M.M. 2005. The distribution of ticks (Acari: *Ixodidae*) of domestic livestock in Portugal. *Exp. Appl. Acarol.* 36:233-246
37. FAO. 1987. El control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten. Manual Práctico de Campo. Vol. I. Roma, Italia. p. 219
38. FAO. 2003. Resistencia a los antiparasitarios. Estado actual con énfasis en América Latina. Dirección de Producción y Salud Animal. Roma, Italia. 52 p.
39. Fargues, J.; Maniania, N.K.; Delmas, J.C. & Smiths, N. 1992. Influence de la temperature sur la croissance *in vitro* d'hyphomycetes entomopatogènes. *Agronomie.* 12: 557-564
40. Fernández-Larrea, V.O. 1997. Microorganismos en el control fitosanitario en Cuba. Tecnologías de producción. III Encuentro Nacional de Agricultura Orgánica. ACAO-INISAV. Ciudad de La Habana, Cuba
41. Ferron, P. 1978. Biological control of insect pest by enthomopathogenous fungi. *Ann. Rev. of Entomol.* 23:409-442
42. Fragoso, H. 2005. Control de la garrapata. Viejos problemas, nuevas soluciones. Centro Nacional de Servicios de Constatación en Salud Animal. DAGSA, CONASAG, SAGAR. México
43. Franz, J.M.; Bogenschüts, H.; Hassan, S.A.; Huang, P.; Waton, E.; Suter, H. & Giggisni, G. 1980. Results of a joint pesticide test program by the working group: pesticides and benefical arthropods. *Entomophaga.* 23(3):231-236
44. Furlong, J.; Souza, J.R. de & Azevedo, Márcia Cristina de. 2003. Carrapato dos bovinos: controle estratégico nas diferentes regiões brasileiras. Comunicado Técnico 36. Juiz de Fora, MG, Brasil
45. Furlong, J.; Martins, J.R. & de Azevedo, Márcia Cristina. 2007. O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar?. *A Hora Veterinária*, 27 (159):1-7
46. Furlong, J. & de Azevedo Márcia Cristina. 2005. Conhecimento básico para controle do carrapato dos bovinos. Em: Carrapatos: Problemas e Soluções (Ed. J. Furlong). EMBRAPA. Juiz de Fora, MG, Brasil. 65 p.

47. Galindo Velasco, Edelmira. 2005. Uso de Hyphomycetes entomopatógenos para el control de *Haematobia irritans* (L) sobre bovinos en el estado de Colima. Tesis en opción al título de Doctor en Ciencias. Tecomán, Col. México. 106 p.
48. Galindo Velasco, Edelmira. 2002. Susceptibilidad de adultos de *Haematobia irritans* (Díptera: Muscidae) a los hongos entomopatógenos *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* y *Paecilomyces fumosoroseus* (Hyphomycetes) en laboratorio. XXV Congreso Biológico. Hermosillo, Sonora. México. p. 196-199
49. Galindo-Velasco, Edelmira; Clicerio, I.R.; Torres, F.; Lezama, G.R.; Rebolledo, D.O. & López, L.M. 2001. Susceptibilidad de huevos de *Rhipicephalus sanguineus* (Acarina: Ixodidae) a hongos entomopatógenos (Deuteromycotina: Hiphomycetes). Congreso Estatal de Investigación Científica y Desarrollo Tecnológico. U.C. SEMIRELOS. Colima, p. 35
50. Galindo-Velasco, Edelmira. 1988. Sencibilidad in vitro de la garrapata Boophilus spp al hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Metsch) Sor. Tesis (MC) F.C.B.A. Universidad de Colima. México. p. 65
51. Genthener, F.J.; Foss, S.S. & Glass, P.S. 1997. Virulence of *Metarhizium anisopliae* to germination, and virulence against mosquitoes sn the entomopatogenic fungus *Matarrhizium anisopliae*. *J. Invertebr. Pathol.* 36-34
52. Guglielmone, A.A. & Mangold. A.J. 2002. Garrapata común de los bovinos. *Sanidad.* XXI:132-136
53. Guzmán, D.R. & Axtell, R.C. 1987. Temperature and water quality effects in simulate woodland pools on the infections of culex mosquito larvae by *Lagenidium giganteum* (Oomycetes: Lagenidiales) in North Carolina. *J. of the Am.* 3:211- 218
54. Hajek, A.E. & St. Leger, R.J. 1994. Interactions between fungal pathogens and insects hosts. *Ann. Rev. of Entomol.* 39:293- 322
55. Kemp, D. 2003. Registration of products for Boophilus control, suggestion for change from experiences in Australia. Seminario Internacional de Parasitología Animal. Mérida, Yucatán, México
56. Hong, T.D.; Jenkins, N.E. & Ellis, R.H. 1999. Fluctuating temperature and the longevity of conidia of *Metarhizium flooviride* in storage. *Bio. Science and Technol.* 9:165-176

57. Hwang, SW. 1968. Investigation of ultra-low temperature for fungal cultures. I. An evaluation of liquid nitrogen storage for preservation of selected fungal cultures. *Mycologia*. 60:621-613
58. Inglis, G.D.; Duke, G.M.; Kawchuk, L.M. & Goettel, M.S. 1999. Influence of oscillating temperatures on the competitive infection and colonization of the migratory grasshopper by *Beauveria bassiana*, *Metarhizium flavoviride*. *Biol. Control*. 14:111-120
59. Kaaya, G.P.; Mwangi, E.N. & Ouna, E.A. 1993. Prospects biological control of livestock, ticks *Rhipicephalus appendiculatus* and *Amblyoma variegatum*, using the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *J. Inv. Pathol*. 67:15-20
60. Knutson, A.E. & Gilstrap, F.E. 1990. Seasonal occurrence of *Beauveria bassiana* in the Southwestern corn borer (Lepidoptera: *Pyralidae*) in the Texas high Plains. *J. of the Kansas Entomol. Society*. 63:243-251
61. Kodaira, Y. 1961. Toxic substances to insects, produced by *Aspergillus ochraceus* and *Oospora destructor*. *Agric. Biol. Chem*. 25:261-262
62. Kodaira, Y. 1962. Studies on the new toxic substances to insects, destruxin A and B, produced by *Oospora destructor*. Part I. Isolation and purification of destruxin A and B. *Agric. Biol. Chem*. 26:36-42
63. Lezama, G.R. & Hernández, A.C. 1989. Acción ovicida del *Metarhizium anisopliae* (Metch) Sor. En el control de *Boophilus* spp. XII Reunión Nacional de Control Biológico. Memorias. Torreón, Coah. Méx. p. 129-132
64. Mangold, A.J.; Muñoz Cobeñas, M.E.; Castelli, M.C.; 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*. 81:259-261
65. Massard, C.L. & Fonseca, A.H. 2004. Carrapatos e doenças transmitidas comuns ao homem e aos animais. *A Hora Veterinária*. 135(1):15-23
66. Monteiro, A.C.; Correia, A. do & Fiorin, A.C. 1994. Patogenicidade de isolados de *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* (Acari, *Ixodidae*) sob condições de laboratório. FCA/UNESP, 14870-000, Jaboticabal, S.P.
67. McCoy, C.W. 1990. Entomogenous and fungi as microbial pesticide. In: New directions in biological control. (Eds. R.R. Baker and P.E. Dunn). Liss. New York, USA. p. 139-159
68. Nari, A. & Eddi, C. 2002. Control integrado de las parasitosis. En: Reunión de especialistas en Parasitología Veterinaria de Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y

- Uruguay. Facultad de Ciencias Veterinarias. Tandil, Argentina. www1.inta.gov.ar/producto/helminto/rtandil_17.htm
69. Noma, T. & Sctrickler, K. 1999. Factors affecting *Beauveria bassiana* for control of *lygus* bug (Hemiptera: *Miridae*) in alfalfa seed fields. *J. of Agrc. And Urban Entomol.* 16:215-233.
70. Norval, R.A.L. & Mc Cosker, P.J. 1983. Tick predation by a rainbow skink. *Zimbabwe Vet. J.* 13(3/4):53
71. Onofre, S.B.; Miniuk, C.M.; Barros, N. & Azevedo, J.L. 2001. Pathogenicity of four strains of entomophatogenic fungi against the bovine tick *Boophilus microplus*. *Am. J. of Vet. Res.* 62:1478-1480
72. Ortiz, M. & Franco, B.R. 2005. Experiencia de un programa estratégico de control en *Boophilus microplus* y *Amblyomma cajennense*, empleando inhibidores de crecimiento (Fluazurón), ivermectina y baños convencionales en bovinos naturalmente infectados, en México. Congreso Biotecnología. Habana, Cuba
73. Parra, M.H.; Peláez, S.L.; Segura, C.F.; Arcos, J.C.; Londoño, A.; Díaz, E. & Vanegas, M.A. 1999. Manejo integrado de garrapatas en bovinos. Serie modular para la capacitación en tecnologías agropecuarias, 2:72-77
74. Pérez, Miryan & Patiño, F. 2009. Validación en campo del efecto de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como agentes reguladores biológicos sobre *Boophilus microplus* y *Amblyomma canennense*. En: Ganadería para el futuro. Investigación para el desarrollo. (Eds. E. Murgueitio, C. Cuartas y J. Naranjo). 2da ed. Fundación CIPAV. Cali, Colombia. 490 p.
75. Polanco, H.C. 2001. Evaluación de un programa de control integrado contra la garrapata *B. microplus* en zonas lecheras de Villa Clara. Trabajo en opción al título de Master en Ciencias en Medicina Preventiva. Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad Agraria de la Habana, Cuba
76. Quijada, T. 2007. La garrapata del vacuno *Boophilus microplus* en tres fincas ganaderas de Carora, estado Lara. Informe FONAIAP. Centro de Investigaciones Agropecuarias del Estado Lara. Venezuela. www.ceniap.gov.ve. [Consulta mayo 2007]
77. Quiroz, R.H. 1999. Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos. Editorial LIMUSA. México. p. 767-802

78. Ouedraogo, A.; Fargues, J.; Goettel, M.S. & Lomer, C.J. 1997. Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *Metarhizium flavoviride*. *Mycopathologia*. 137:37- 43
79. Rath, A.C. 2000. The use of entomopathogenic fungi for control of termites. *Biocontrol Sce. Tech*. 10:563- 561
80. Rijo Camacho, Esperanza. 2009. Control de garrapata del ganado, *Boophilus microplus* (Canestrini) con hongos entomopatógenos. www.aguascalientes.gob.mx/codagea/produce/garrapat.htm. [Consulta 24 de noviembre de 2009]
81. Rijo Camacho, Esperanza; Luján, Mercedes; Vitorte, Elena & Ponce, E. 1992. Control biológico de *Boophilus microplus* (Arochorida: *Ixodidae*) en parcelas experimentales. VI Jornada Científica de la Sociedad Cubana Zoología
82. Rivera, M. 1996. Hemoparasitosis Bovinas. ANAUCO Ediciones, C.A. Caracas, Venezuela. p. 131-46
83. Roberts, D.W. & Campbell, A.S. 1977. Stability of entomopathogenic fungi. In: Environmental stability of microbial insecticides. (Eds. D.L. Hostetter and C.M. Ignoffo). Entomological Society of America. 10:19-76
84. Rodríguez, J.; Alonso, Magalis; Blandino, Teresa; Abreu, Raquel & Gómez, E. 1987. Manual de técnicas parasitológicas. Ed. ENPES. La Habana, Cuba. 103 p.
85. Rodríguez, Daisy. 2009. Control integrado contra la garrapata (*B. microplus*). www.monografias.com/trabajos33/control-garrapata/control-garrapata.shtml. [Consulta 26 de noviembre de 2009]
86. Rodríguez, M.; Massar, L.; Fonseca, H. da; Fonseca, N.; Machado, H.; Labarta, M. & Fuente, J. de la. 1995. Effect of vaccination with a recombinat Bm 86 antigen preparation on natural infestation of *Boophilus microplus* in grazing dairy and beef pure and cross-bred cattle in brazil. *Vaccine*. 13:1804-1808
87. Rodríguez, O.N.; Espaine, L.; Rivas, A. & Rodríguez, P. 1989. Epizootiología de las enfermedades de los bovinos causadas por los hemoparásitos de la República de Cuba. *Rvta. cub. Cienc. vet*. 20 (1):37-56
88. Rodríguez, J.; Villalbe, G.; Abreu, Raquel & Castiñeiras, A. 1983. *Pheidole megacephala* (Hymenoptera: *Formicidae*) como depredador de *Amblyomma cajennense* (Acarina. *Ixodidae*) en Cuba. *Rev. Salud Anim*. 5:437-440

89. Romaña, C.A., Fargues, J. & Poys, J.F. 1987. Mise au point d'une methode biologique de lutte contre les triatominas, vecteurs de la maladie de chagas avec des, hyphomycetes entomophogenes. *Bull. Soc. Path. Ex.* 80:105-111
90. Salada, D. 2005. Garrapata. Control químico y residuos. Salto, Veterinaria Bortagaray. Uruguay
91. Samish, M. & Rehacek, J. 1999. Pathogens and predators of ticks and their potential in biology control. *Ann. Rev. Entomol.* 44:82-159
92. Samish, Michael & Itamar, Glazer. 1992. Infectivity of entomopathogenic nematodes (*Steinernematidae* and *Heterorhabditidae*) to female ticks of *Boophilus annulatus* (Arachnida: *Ixodidae*). *J. Med. Entomol.* 29(4):614-618
93. Samsinakova, Anna; Kalakova, Susana; Dusabek, D.M.; Homzakova, Elena & Cerny, V. 1974. Entomophage fungi associated with the ticks *Ixodes ricinus*. *Parasitología* (Praha) 21:39-48
94. Schabel, H.G. 1976. Oral infection of *Hylobius pales* by *M. anisopliae*. *J. of In. Pathol.* 27:377-383
95. Shah, P.A., Aebi, M. & Tuor, U. 1999. Production factors involved in the formulation of *Erinya neoaphidis* as alginate granules. *Biocontrol Scs. and Tec.* 9:12-26
96. Singh, S.K. & Girschich, H.J. 2003. Tick-host interactions and their immunological implications in tick-borne diseases. *Cun. Sci.* 85(9):1284-1298
97. Steel, R.G.D. & Torrie, J.H. 1992. Bioestadística: Principios y procedimientos. 2da. ed. McGraw-Hill. Interamericana de México, S.A. de C.V. 622 p.
98. Sutherst, R.; Warton, W. & Vlech, K.B.W. 1978. Guide to studies on tick ecology. Division of Entomology. Technical Paper No. 14. CSIRO. p. 1-59
99. Suzuki, A.S.K. & Kodair, Tamura, S. 1966. Structural elucidation of destruxin A. *Agric. Biol. Chem.* 30:517-518
100. Suzuki, A.H.T. & Tamura, S. 1970. Isolation and structure elucidation of tree new insecticidal cyclodepsipeptides, destruxins C and D and desmethyldestruxin B, produced by *Metarhizium anisopliae*. *Agric. Biol. Chem.* 34:813-816
101. Tamura, S.; Kuyama, S.; Kodaira.; Higashikawa, S. 1994. The structure of destruxin B, a toxic metabolite of *Oospora destructor*. *Agric. Biol. Chem.* 28: 137-138
102. Taylor, R. 2008. El uso del EM-5 en el control de garrapatas (*Boophilus microplus*) en ganado híbrido. Conferencia. EARTH. Costa Rica

103. Thompson, K.C.A. 1976. Technique to establish a laboratory colony of *Boophilus microplus*. (s.l.): (s.n.)
104. Tulloch, M. 1976. The genus *Metarhizium*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 66:407-411
105. Valdés, M.; Méndez, L.; Quintana, Y.; Montero, C.; Machado, H.; Lleonart, R. & Borroto, C. 2005. Evaluación de la eficacia en ensayos controlados del inmunógeno Gavac Plus contra dos cepas Argentinas de la garrapata *Boophilus microplus*. Congreso Biotecnología 2005. Habana, Cuba
106. Vargas, M.; Montero, C.; Sánchez, D.; Pérez, D.; Joglar, M.; Machado, H.; Oliva, R.; Castillo, E. & Lleonart, R. 2005. La aplicación de una dosis de refuerzo con el inmunógeno Gavac Plus es suficiente para estimular un nivel efectivo de inmunidad en rebaños con más de un año sin inmunización. Congreso Biotecnología 2005. Habana, Cuba
107. Vega de la, R. & Díaz, Graciella. 1982. Depradación de la garrapata del ganado vacuno, *Boophilus micropilus*, por la hormiga *Pheidole megacephala*. Reporte preliminar. *Cien. Tec. Agric. Protec. Plantas*. 5(2):97-100
108. Veríssimo, Cecilia José. 1995. Inimigiz naturais do carrapato parasita dos bovinos. *Agropecuária*. 8(1):35-37
109. Willansed, P. & Kemp, D. 1988. Vaccination with "Concealed" antigens for tick control. *Parasitology Today*. 4:199
110. Zacharuk, R. 1981. Fungal disease of terrestrial insects. In: Pathogenesis of invertebral microbial disease. (Ed. E.W. Davison). Allondeld Osmun. And Co. Totowa. p. 367-402