



FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA PROFESIONAL DE MEDICINA VETERINARIA

TESIS

EFFECTO DEL HONGO *Metarhizium anisopliae* EN EL CONTROL DE GARRAPATA
(*Rhipicephalus sanguineus*) EN CANINOS.

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE MÉDICO VETERINARIO

MÓNICA SOLAGNE CORTEGANA TORRES

BACHILLER EN MEDICINA VETERINARIA

LIMA - PERÚ

2017

i. DEDICATORIA

A mis padres por el cariño y apoyo que me brindaron durante toda mi formación académica y personal.

ii. AGRADECIMIENTOS

Al finalizar el desarrollo de esta tesis que significa un gran paso para iniciar mi vida profesional como Médico veterinario, debo admitir que esto se consiguió gracias a la participación de personas las cuales me apoyaron de diversas maneras para que este trabajo sea posible.

Agradecimiento a mis padres por el esfuerzo, cariño y la confianza que depositaron en mí durante toda mi vida.

Al M.V. Jorge Alvarado por su apoyo moral, persistencia y participación activa en la elaboración de esta tesis.

A mi director de tesis el Dr. Hugo Samamé por los consejos, confianza y apoyo que ayudaron a enriquecer este trabajo de investigación.

A la escuela académico profesional de Medicina Veterinaria de la Universidad Alas Peruanas por permitirme utilizar el laboratorio de microbiología que facilitó en gran medida el desarrollo de esta investigación.

iii. RESUMEN

Este estudio evaluó al hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el control de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* en 20 caninos. Para esto se utilizó una presentación comercial de un insecticida biológico a base del hongo entomopatógeno *M. anisopliae* a una concentración de $1,8 \times 10^9$ conidias/g. el cual se utilizó según las recomendaciones del fabricante. Los caninos tratados fueron divididos en cuatro grupos según el número de garrapatas que presentaban al inicio del tratamiento. Acto seguido, se aplicó por aspersión directa (0,5 ml por pulverización) la dilución del hongo sobre todo el cuerpo de los caninos, esta operación se repitió a los 7, 14 y 21 días de iniciado el tratamiento, siendo el último conteo de garrapatas el día 28. Tras la primera aplicación del tratamiento, al día 7 se obtuvo una eficacia total del 10,67%, la menor eficacia en este día fue para el grupo 3 con un 0,4% y la mayor 24,0%. Los cuatro grupos tuvieron un aumento de la eficacia proporcional tras cada aplicación del tratamiento, finalmente al día 28 post aplicación del tratamiento la eficacia total fue en promedio de 82,81. De acuerdo a estos resultados se confirma la acción entomopatógena del hongo *Metarhizium anisopliae*.

PALABRAS CLAVE: Biocontrolador, Entomopatógenos, *Rhipicephalus sanguineus*, Entomomicosis.

iv. ABSTRACT

This study evaluated the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* in the control of the tick *Rhipicephalus sanguineus* in 20 canines. For this, a commercial presentation of a biological insecticide based on the entomopathogenic fungus *M. anisopliae* at a concentration of 1.8×10^9 conidia/g was used. This was made according to the manufacturer's recommendations. Canines were divided into four groups according to the number of ticks they presented at the beginning of treatment. Then, the dilution of the fungus on the whole body of the canines was applied by direct spray (0.5 ml per spray), this operation was repeated 7, 14 and 21 days after the start of the treatment, with the last count of ticks on day 28. After the first application of the treatment, on day 7 a total efficacy of 10.67% was obtained, the lowest efficiency on this day was for group 3 with 0.4% and the highest 24.0% . The four groups had an increase in the proportional proportion after the application of the treatment, finally at day 28 after application of the treatment the total efficacy was on average 82.81. According to these results, the entomopathogenic action of the fungus *Metarhizium anisopliae* is confirmed.

KEY WORDS: Biocontroler, Entomopathogenous, *Rhipicephalus sanguineus*, Entomomycosis.

ÍNDICE

i.	Dedicatoria	I
ii.	Agradecimiento	II
iii.	Resumen	III
iv.	Abstract	IV
I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	MARCO TEÓRICO	3
2.1.	Hongos entomopatógenos	3
2.1.1.	Generalidades	3
2.1.2.	<i>Metarhizium anisopliae</i>	4
2.1.3.	Clasificación taxonómica	5
2.1.4.	Características fisiológicas y morfológicas	6
2.1.5.	Ciclo de vida y mecanismo de acción	7
2.1.6.	Investigaciones con <i>M. anisopliae</i>	9
2.2.	<i>Rhizoglyphus sanguineus</i>	12
2.2.1.	Generalidades	12
2.2.2.	Taxonomía	13
2.2.3.	Distribución geográfica	13
2.2.4.	Características morfológicas	14
2.2.5.	Ciclo de vida	16
2.2.6.	Lesiones ocasionadas en el hospedador	17
2.2.7.	Métodos de control	19
2.2.7.1.	Control mecánico	19
2.2.7.2.	Control químico	19
2.2.7.3.	Control biológico	21

2.2.8.	Resistencia a acaricidas	22
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	24
3.1.	ESPACIO Y TIEMPO	24
3.2.	POBLACIÓN Y MUESTRA	24
3.3.	DISEÑO EXPERIMENTAL	24
3.4.	EQUIPOS Y PROCEDIMIENTOS	25
3.4.1.	EQUIPOS	25
3.4.2.	PROCEDIMIENTOS	28
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	33
IV.	RESULTADOS	34
V.	DISCUSIÓN	38
VI.	CONCLUSIONES	42
VII.	RECOMENDACIONES	43
VIII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
	ANEXOS	52

I. INTRODUCCIÓN

La garrapata del perro (*Rhipicephalus sanguineus*) es nativa de África, actualmente está ampliamente distribuida en el mundo especialmente donde existen climas cálidos debido a su fácil adaptabilidad, esto se debe a la migración del hombre y sus perros. Estas representan un problema de salud pública por ser plagas en zonas urbanas y no urbanas, ocasionar lesiones cutáneas por acción de las picaduras, ser vectores de diversas enfermedades en caninos como erliquiosis, anemia, reacciones alérgicas y ser agente transmisor de algunas enfermedades a humanos como rickettsiosis, Durante años se ha tratado de erradicarlas o controlarlas, existen distintos métodos de control de origen químico los cuales tienen ciertas desventajas como desarrollo de resistencia de las garrapatas, contaminación del medio ambiente, no son aptos para todas las razas, intoxicación de los animales y/o personas que manejan los insecticidas, etc.

Existe un número considerable de hongos y bacterias antagonistas de artrópodos e insectos que son potenciales para el control biológico de garrapatas y otras plagas de interés veterinario. Actualmente *Metarhizium anisopliae* se comercializa en diversos países con la finalidad de controlar las especies de insectos que actúan como plagas.

Los hongos entomopatógenos son importantes en el control de ectoparásitos, porque estos son susceptibles a las enfermedades fungosas, *M. anisopliae* es uno de los hongos más eficientes para la bio regulación de las garrapatas *R. sanguineus* en condiciones *in vitro* y de *R. microplus in vivo*. Además existe la ventaja de que el hongo tiene un costo bajo, son de fácil manipulación, no se ha documentado hasta el momento resistencia adquirida por parte de los insectos a los que ataca y no dejan residuos tóxicos ni contaminan el medio ambiente.

En las últimas décadas en el campo de la medicina veterinaria se vienen realizando diversos estudios sobre agentes biológicos que atacan a las garrapatas del ganado

(*Rhipicephalus microplus*) así como también a las garrapatas del perro (*Rhipicephalus sanguineus*), la mayor parte de estos estudios son realizados *in vitro* con resultados favorables y actualmente se vienen realizando estudios que validen la eficacia de los hongos entomopatógenos en campo en diversos países.

II. MARCO TEÓRICO

2.1. HONGOS ENTOMOPATÓGENOS

2.1.1. Generalidades

Los hongos entomopatógenos son aquellos que parasitan diferentes órdenes de artrópodos, desde arañas hasta casi todos los grupos de insectos (1). Penetran en la especie plaga a través del tubo digestivo o del tegumento dando lugar a una micosis que provoca la muerte del insecto. Los entomopatógenos tienen el inconveniente de que no buscan activamente al hospedador o presa; de aquí que generalmente no limiten la densidad de población del hospedador en niveles bajos (2).

Estos hongos se usan frecuentemente para el control de plagas en los cultivos agrícolas y se considera una práctica ordinaria en algunos países como: Brasil, Inglaterra, Francia, China y EUA (2). El uso del control biológico se va incrementando debido a que ha aumentado la conciencia sobre la seguridad medioambiental y salud humana, pero además, debido al incremento del costo del control químico y al aumento de la resistencia de las garrapatas a los ixodicidas (3).

Los hongos entomopatógenos poseen un gran potencial como agentes controladores extrema importancia en el control de ectoparásitos; virtualmente todos los ectoparásitos son susceptibles a las enfermedades fungosas y existen aproximadamente 700 especies de hongos entomopatógenos, de las cuales sólo el 10 % se usan para el control de insectos (4). Entre los géneros más importantes están: *Metarhizium*, *Beauveria*, *Aschersonia*, *Entomophthora*, *Zoophthora*, *Erynia*, *Eryniopsis*, *Akanthomyces*, *Fusarium*, *Hirsutella*, *Hymenostilbe*, *Paecilomyces* y *Lecanicillium* (5).

Los agentes entomopatógenos se emplean comúnmente para el control biológico de plagas agrícolas. Existen numerosos insecticidas biológicos con base en hongos entomopatógenos empleados en diversos hospederos. Los hongos más utilizados comercialmente son *M. anisopliae*, *B. bassiana* y *Lecanicillium lecanii* (5).

El desarrollo del control biológico se define como una práctica en constante crecimiento que busca la destrucción total o parcial de patógenos e insectos plagas frecuentemente mediante el uso de sus enemigos naturales (6), los hongos entomopatógenos son los primeros agentes biológicos en ser utilizados para el control de plagas, porque son capaces de producir enfermedad y muerte en los insectos (7).

2.1.2. *Metarhizium anisopliae*

Es un hongo saprofito del suelo y se encuentra con frecuencia en hábitats alterados. Es utilizado como insecticida biológico contra coleópteros (larvas de abejas), lepidópteros (larvas de mariposa), homópteros (algunos tipos de chinches), himenópteros (algunos tipos de hormigas), hemípteros (chinches comunes), ortópteros (grillos), garrapatas (*R. microplus*), jobotos, comején, *Prosapia* sp., entre otros (2).

El hongo *M. anisopliae* se emplea para el control biológico de plagas agrícolas, pero es rara su utilización en el control de parásitos de animales. Algunos estudios demuestran que este hongo es patógeno para huevos, larvas, ninfas y adultos de las garrapatas *Rhipicephalus appendiculatus* y *Amblyomma variegatum* (8). Este hongo, además de infectar adultos y huevos, causa reducción en la fecundidad y emergencia de las larvas en *Boophilus microplus* (9); En Costa Rica se demostró en un estudio *in vitro* que *M. anisopliae* era efectivo en la mortalidad de la garrapata adulta *Rhipicephalus sanguineus* (7).

M. anisopliae no parece infectar a seres humanos u otros animales y se considera un insecticida seguro (8); En Cuba demostraron que diversas cepas de *Metarhizium anisopliae* no causa signos de toxicidad aguda, ni infectividad ni patogenicidad en ratas

inoculadas por el hongo con dosis única intratraqueal. Así mismo, esto no afectó en su peso, consumo de alimento y consumo de agua en comparación con el grupo control (9).

2.1.3. Clasificación taxonómica

Esta especie es un hongo entomopatógeno verdadero anamorfo y facultativo, aislado por primera vez en 1879 del escarabajo *Anisoplia austriaca*, se sugiere su uso por primera vez como agente microbiano para el control de insectos (7). Es un hongo mitospórico con reproducción asexual, clasificado anteriormente en la clase *Hyphomycetes* del filo *Deuteromycota*. La clasificación taxonómica de *Metarhizium anisopliae* actual es la siguiente (10):

Reino: *Fungi*
 Subreino: *Dikarya*
 Filo: *Ascomycota*
 Clase: *Sordariomycetes*
 Orden: *Hypocreales*
 Familia: *Clavicipitaceae*
 Género: *Metarhizium*
 Especie: *Metarhizium anisopliae*

Recientemente, se propone la existencia de nueve especies: *M. anisopliae*, *M. guizhouense*, *M. pingshaense*, *M. acridum stat. nov.*, *M. lepidiotae stat. nov.*, *M. majus stat. nov.*, *M. globosum*, *M. robertsii* y *M. brunneum* (10).

2.1.4. Características fisiológicas y morfológicas

M. anisopliae presenta la habilidad de crecer en forma saprófita, facilidad de diseminación de los conidios, capacidad de sobrevivencia en el suelo y reproducción

asexual. Se caracteriza por ser mesófilo, sensible a la radiación solar ultravioleta, con una temperatura óptima de 25 a 30 °C, a una máxima de 30 a 35°C y una mínima de 10 a 12°C, las condiciones de humedad relativa que favorecen a la penetración e infección es de 75 al 100 % (11). Los límites térmicos para la germinación de los conidios y de las hifas de *M. anisoplae* se encuentran alrededor de 37 a 40 °C respectivamente. A una humedad por debajo de 53 % se reduce la viabilidad de los conidios (12).

Los hongos presentan hifas lisas, septadas, conidias predominantemente cilíndricas, agrupados, hialinas, verde oliva, uninucleados de extremos redondeados, el tamaño promedio fue de 6,0 mm de largo (Rango 5,2 - 7,1 mm) y de 2,2 mm de ancho (rango 2,0 - 2,6 mm) (13). Los conidióforos nacen del micelio y son irregularmente ramificados con dos a tres ramas en cada septo, miden de 4 a 14 µm de longitud x 1,5 a 2,5 µm de diámetro. Las fiálides son cilíndricas en forma de clava, adelgazados en el ápice, miden de 6 a 13 µm de longitud y de 2 a 4 µm de diámetro. Las conidias se originan a partir de las fiálides, son unicelulares, cilíndricas y truncadas, formadas en cadenas muy largas, hialinas a verde oliváceo, miden de 3,5 a 9 µm de longitud x 1,5 a 3,5 µm de diámetro (14).

El crecimiento de las colonias del hongo se caracteriza por un crecimiento de micelo con borde blanco de aspecto que varía entre algodonoso, aterciopelado y compacto y con grupos de conidióforos completamente circulares que se tornan coloreados al multiplicarse las conidias, con variaciones de color de olivo a amarillo verdoso, de olivo a verde, decolorada en el envés, de color miel o amarillo pálido y pigmento amarillo que se difunde en el medio. Este pigmento no es esencial para el crecimiento y desarrollo, por ello puede considerarse un metabolito secundario; sin embargo, algunos pigmentos juegan un papel importante en la resistencia de las esporas en ambientes desfavorables (15).

2.1.5. Ciclo de vida y mecanismo de acción

Los hongos entomopatógenos a diferencia de otros agentes patógenos, tienen mecanismos de invasión únicos referenciados que no necesitan ser ingeridos por el insecto para contraer la infección sino que lo infectan por contacto y adhesión de las esporas a partes de su cuerpo como partes bucales, membranas intersegmentales, espiráculos, entre otros. En síntesis se describe el mecanismo de acción de *Metarhizium anisopliae* dividido en tres fases: Adhesión y germinación de la espora (conidia) a la cutícula del insecto, penetración en el hemocele y desarrollo del hongo lo cual generalmente resulta en la muerte del insecto (17).

Adhesión de los conidios: El primer contacto entre el hongo entomopatógeno y el insecto sucede cuando la conidia del primero es depositada en la superficie corporal de este último. Los conidios se adhieren en a la superficie del insecto veinticuatro horas después de la infección, iniciando el hongo el proceso patogénico (17).

Penetración y germinación: Una vez que los conidios se adhieren al tegumento del artrópodo, forman tubos germinativos que invaden la cutícula del artrópodo, eso ocurre en un mínimo de 12 horas y depende de las condiciones ambientales. Los tubos germinativos forman estructuras denominadas apresorios que son la dilatación de las hifas en la extremidad del tubo germinativo y de la parte inferior del apresorio se forman las estaquillas de penetración que están la superficie de la cutícula. En casos especiales la penetración se da por el aparato bucal u orificio anal y genitales pero en estos casos no se forma la estaquilla de penetración (18).

Cabe destacar que durante la penetración del hongo desde la cutícula del insecto hasta el hemocele, la hifa quedará inmersa en proteínas, quitina, lípidos, melanina, difenoles y carbohidratos; algunos de ellos son nutrimentos pero otros pueden inhibir su crecimiento, ya que el insecto activa su sistema inmune a través de procesos como la melanización, fagocitosis, nodulación y encapsulamiento. Sin embargo los hongos desarrollan una serie de actividades que les permite evitar este tipo de defensas, tales como cambios en la pared celular y producción de sustancias inmunomoduladoras o toxinas fúngicas (19).

Una vez establecido el proceso de adhesión, continua la penetración la cual es posible gracias a la acción combinada de dos mecanismos uno físico y uno químico, el primero consiste en la presión ejercida por una estructura fúngica denominada haustorio, la cual deforma primeramente la capa cuticular rompiendo luego las áreas esclerosadas y membranosas de la cutícula. El mecanismo químico consiste en la acción enzimática, principalmente de actividades hidrolíticas tales como proteasas, lipasas, amilasas y quitinasas, sintetizadas por *M. anisopliae*, las cuales degradan el tejido en la zona de penetración, facilitando la entrada del hongo, proceso que ocurre 48 horas postinfección (20).

Invasión del hemocele: Una vez dentro del insecto, el hongo se disemina vía hemolinfa y produce blastosporas y cuerpos filamentosos de hifas que invaden el sistema inmune del hospedero (16). Además producen dos familias de toxinas que son las destruxinas y las citocalacinas, la función de estas toxinas es inhibir el sistema inmunológico del artrópodo. Luego el hongo coloniza los cuerpos grasos, sistema digestivo, túbulos de Malpighi, hipodermis, sistema nervioso, músculos y tráquea produciéndose una septicemia (21).

Producción de toxinas: No todos los hongos o todas las cepas de una misma especie fúngica producen toxinas. Estas son sustancias que pueden originar la muerte del insecto debido a sus propiedades insecticidas pero además, ellas actúan como inhibidoras de las reacciones de defensa del hospedante. Por alteraciones de los hemocitos y retardo en la agregación de las células de la hemolinfa. Las toxinas pueden ser de dos tipos: Macromoléculas proteicas (son enzimas extracelulares secretadas en cantidades significativas en el interior del insecto: proteasas y quitinasas) y sustancias de bajo peso molecular (es una propiedad genética de cada hongo y las principales son ciclodepsipeptidos, protodextruxinas y dextruxinas) (20).

Muerte del hospedero: La micosis induce a síntomas fisiológicos anormales en el insecto tales como convulsiones, carencia de coordinación, comportamientos alterados y parálisis. La muerte sobreviene por una combinación de efectos que comprenden el

daño físico de tejidos, toxicosis, deshidratación de las células por pérdida de fluido, cambios patológicos en el hemocele, bloqueo mecánico del aparato digestivo, secundario al crecimiento de las hifas (22).

Emergencia: El hongo se encuentra formando una gran masa micelar en el interior del hospedante, manteniendo intacto el tegumento. Puede permanecer bajo esta forma en cuanto las condiciones de humedad relativa sean bajas. En cambio, en ambientes húmedos y cálidos logrará atravesar nuevamente el tegumento pero esta vez desde el interior del insecto. Generalmente, emerge por las regiones menos esclerosadas del tegumento (18). Una vez las hifas atraviesan el tegumento, ellas pueden quedar en esta etapa vegetativa o pasar a la reproductiva dentro de 24 a 48 horas, con formación de conidios si las condiciones de humedad relativa son altas (22).

2.1.6. Investigaciones con *M. anisopliae*

Aunque diversos bioensayos con hongos entomopatógenos han demostrado potencial para el control garrapatas en ganadería (*R. microplus*), no existen antecedentes que demuestren su efectividad en *R. sanguineus*. Hasta el momento se han reportado numerosas investigaciones efectuadas en condiciones de laboratorio, las mismas que demuestran el potencial patogénico de *M. anisopliae* para el control de distintas especies de garrapatas.

Fernández et al (2002) afirman que los hongos entomopatógenos han demostrado tener la capacidad de producir una elevada mortalidad en todas las fases evolutivas de varias especies de garrapatas y causar una disminución en la oviposición (23).

En Australia al evaluar *in vitro* la patogenicidad de *M. anisopliae* a la concentración de aproximadamente 2×10^8 conidios/ml sobre hembras no ingurgitadas de *R. microplus*, hallaron alta mortalidad de las garrapatas (100%), así como una disminución en la producción de huevos de hembras ingurgitadas recolectas a los 3 días de efectuada la aplicación, después de la pulverización del hongo sobre los bovinos (24). Esto coincide con resultados obtenidos en Brasil donde se utilizó la cepa E6S1 de *M. anisopliae*, a

una concentración de 10^7 conidios/ml, siendo patogénica contra hembras ingurgitadas de *R. microplus*, al provocar una mortalidad del 100%, pero esta mortalidad se alcanzó hasta 14 días después del tratamiento (25).

En Colombia reportaron, el uso de la cepa 137bm de *M. anisopliae* como agente de control biológico contra *R. microplus*, al reducir *in vitro* la capacidad reproductiva de la garrapata afectando la ovoposición entre un 90 a 96% a la concentración del hongo de 1×10^8 y 1×10^9 conidios/ml y al afectar la viabilidad de los huevos en más de un 98%. Además, estos mismos autores destacan la eficacia de la cepa 137bm al disminuir en campo en un 75% las infestaciones de garrapatas en ganado del cruce Holstein x Cebú, al rociar sobre los animales suspensiones de conidios a una concentración de 1×10^8 conidios/ml (26).

En Costa Rica se exponen resultados prometedores para el control de esta garrapata, al obtener *in vitro* un aumento en la mortalidad y en la eficacia del hongo contra larvas, la cual es directamente proporcional a la concentración de *M. anisopliae* utilizada, la mortalidad obtenida fue de 70,70; 96,03 y 98,64% a la concentración de 10^8 , 10^9 y 10^{10} conidios/l respectivamente. A estas mismas concentraciones la eficacia alcanzada fue de 67,75; 93,67 y 96,34 % después de 4 tratamientos, además evidenciaron un aumento en la inhibición de la ovoposición, el mejor resultado se observó en las concentraciones de 10^9 y 10^{10} conidios/ml con un porcentaje de 72,70 y 77,29 de inhibición (27). Sin embargo se inocularon garrapatas *R. microplus* en condiciones de laboratorio a una concentración de 500 esporas/ml obteniendo una mortalidad de 57% para *Metarhizium anisopliae*, obteniendo resultados inferiores a trabajos realizados por otros autores (16).

En Santa María, Brasil se demostró que el porcentaje de eclosión de las larvas de *R. sanguineus* era inversamente proporcional a la concentración de conidios/ml de *Metarhizium anisopliae*. El porcentaje varió de 0 a 26,66% para una concentración de 10^8 conidios/ml y 6,66 a 100% para la concentración de 10^5 conidios/ml y además sugirió que los huevos de garrapatas que se conservan en condiciones de temperatura

y humedad variables se vuelven más susceptibles a la infección que los que se crían en condiciones continuas de temperatura y humedad (28).

En Israel encontraron que *M. anisopliae* a concentración de 10^8 conidios/ml causa mortalidad de 92-96% de las larvas y ninfas sin comer en el día 7 y una mortalidad del 100% a los adultos sin alimentar y hembras repletas en el día 21; mientras que la patogenicidad en misma concentración de conidios para larvas y ninfas llenas de sangre fue de 82,6 y 60% respectivamente (29). En un estudio realizado en Costa Rica *M. anisopliae* hizo efecto a los 2 días después de que las garrapatas fueron tratadas con el hongo, pero se obtuvo una mortalidad del 100% a partir del día 21 pero no inhibió la postura de las garrapatas (7).

Un estudio *in vitro* realizado en Florida en Garrapatas y ninfas de *R. sanguineus* a humedad relativa del 90% y con temperatura de 25 a 27 °C tratadas con *M. anisopliae* a concentración de 10^8 conidios/ ml, mostraron una mortalidad de 50 a 70% en adultos a los 21 – 28 días y en ninfas mostro una mortalidad mayor a 60% a los 14 días y mayor a 90% a los 21 – 28 días post infección (30).

Metarhizium anisopliae penetra la cutícula de *R. sanguineus* entre 18 y 48 h después de la aplicación de los conidios y que este hongo no penetra a las garrapatas por las aberturas naturales como se describe en otros artrópodos infectados si no a través del tegumento; la colonización se produce entre las 48 y 72 horas y las hembras mueren entre 4 y 5 días sin realizar ovoposición después de la inoculación. La conidiogénesis en condiciones de laboratorio comienza entre los 6 y 7 días después de la infección y a los 9 días hay un intenso crecimiento del micelo (31).

2.2. *Rhipicephalus sanguineus*

2.2.1. Generalidades

R. sanguineus comúnmente llamada la garrapata marrón del perro es una de las garrapatas más ampliamente distribuida mundialmente, esta garrapata se introdujo desde la región Afrotropical a muchos países en el mundo, probablemente por la importación de perros domésticos infestados. *R. sanguineus* se encuentra generalmente en perros de entornos rurales o urbanos, además hay informes de que parasita a otros animales como conejos, gatos, ratas, y cánidos salvajes (32).

En climas cálidos es considerada ya un miembro endémico de la fauna local, se ve mayormente en las estaciones de primavera y verano, dado que sobreviven aletargados en estaciones frías. A diferencia de la mayoría de las garrapatas, las garrapatas del género *Rhipicephalus* poseen un geotropismo negativo, por lo que los adultos evitan ocultarse en el suelo. Si llegasen a caer, intencional o accidentalmente, de su hospedero, buscarán lugares altos, preferentemente entorno cercano, como pastos altos, paredes, grietas verticales en muros rocosos, etc. Donde sus anfitriones suelen transitar o dormir, a fin de dejarse caer a la primera oportunidad en un hospedador potencial que pase por ahí (33).

La garrapata marrón del perro es un ectoparásito de interés para la salud pública, debido a su capacidad para llevar y transmitir una serie de agentes patógenos para los seres humanos. A pesar de ser inusual, hay una serie de informes en relación con el parasitismo humano (34).

2.2.2. Taxonomía

R. sanguineus es un artrópodo ectoparásito hematófago de la familia *Ixodidae*, que ataca preferentemente a los perros, su clasificación taxonómica es (34):

Reino: *Animalia*
Filo: *Arthropoda*
Clase: *Arachnida*
Subclase: *Acari*
Superorden: *Parasitiformes*
Orden: *Ixodida*
Familia: *Ixodidae*
Género: *Rhipicephalus*
Especie: *Rhipicephalus sanguineus*

2.2.3. Distribución geográfica

Rhipicephalus sanguineus es una garrapata cosmopolita, pero es más común en climas cálidos dado que es sensible al frío. Originaria en África, actualmente se encuentra en todo el mundo, a excepción de las zonas con un clima rígido de bajas temperaturas (33). Las larvas y ninfas parasitan perros y roedores. El hospedador principal del adulto es el perro, pero también puede atacar equinos, bovinos, humanos, gorilas, porcinos, zorros, roedores, conejos, murciélagos, reptiles, liebres, gatos, tejones, ciervos, leones, cebras, búfalos, camellos, caprinos, ovinos y también en aves. Los estados inmaduros generalmente se fijan en el cuello. En el perro, los adultos comúnmente son encontrados en las orejas, nuca y entre los dedos, en infestaciones masivas, todos los estados pueden ser encontrados fijos a cualquier parte del cuerpo cubierto con pelos (34).

En regiones tropicales y subtropicales esta especie puede ser encontrada en el hospedador durante todo el año, pero es más abundante desde primavera a otoño, y las larvas más abundantes en verano. En los países con cuatro estaciones bien definidas son más abundantes en primavera y verano, comenzando a disminuir paulatinamente en verano y otoño (33). Es una garrapata de tres hospedadores, pero los tres estados pueden encontrarse sobre perros, incluso en el mismo perro (34).

2.2.4. Características morfológicas

El tamaño de estos organismos es variable, las hembras son generalmente más grandes que los machos, también influye el que se estén o no alimentándose, es así que si una garrapata adulta hembra se encuentra en ayuno, su cuerpo medirá cerca de tres milímetros de largo, pero cuando se alimenta esta misma hembra puede llegar a medir cerca de 12 milímetros (incluso 30 mm) de largo. Su coloración es marrón rojizo, las hembras tienen el cuerpo más oscuro, especialmente en la cara frontal del caparazón dorsal. Los cuatro pares de patas son de color marrón. Las ninfas miden cerca de un milímetro de largo, mientras que las larvas miden 0.5 milímetros (33).

Rhipicephalus Sanguineus presenta un escudo o caparazón dorsal. Este escudo cubre toda la superficie dorsal del macho y solo la porción dorsal anterior de las hembras, ninfas y larvas. El escudo de las hembras mantiene su tamaño reducido cuando el cuerpo de las mismas se va hinchando por lo que cubre una proporción progresivamente decreciente de la superficie dorsal a medida que se van alimentando, convirtiéndose en un simple punto en las hembras atiborradas de sangre y siendo apreciable con mayor claridad mirando el ejemplar desde delante que desde atrás (35).

Los ojos, en el caso de estar presentes, se sitúan uno a cada lado de los márgenes del escudo a la altura aproximada del segundo par de patas. En los adultos, por la cara ventral se observan dos aberturas; la anterior es la abertura genital y la posterior el ano. Las garrapatas tienen forma oval no están segmentadas y cuando están en ayuno son aplanadas, la ingestión del alimento conduce a un aumento del tamaño, que guarda relación con la cubierta corporal, que forma pliegues (36).

Lo que parece ser una cabeza es simplemente una serie de piezas bucales articuladas sobre un segmento basal. Estas son un hipostoma, dos quelíceros y dos palpos articulados en la base del capito. El aparato completo se denomina capitulum (37).

En las hembras, en la base del capitulum por la cara dorsal, se hallan las denominadas áreas porosas, que contienen las aberturas de unas glándulas cuya secreción

intervienen en la impermeabilización de los huevos. El hipostoma está armado con dientes curvos y sirve para permitir el anclaje de la garrapata en la dermis. Los quelíceros están dispuestos a lo largo de la línea de las pinzas dentadas y presentan denticulos móviles en las puntas, denominadas quelas, los cuales sirven para perforar el orificio en el que la garrapata introduce el hipostoma.

Los palpos son estructuras sensoriales que permanecen en la superficie de la piel. En relación con los pedipalpos su estructura rígida sirve de estuche a los quelíceros e hipostoma. Durante la toma de sangre se apartan a los lados, no interviniendo en la perforación de los tejidos. La longitud total de las piezas bucales, las longitudes relativas de los tres primeros segmentos de los palpos (el cuarto segmento es una pequeña protuberancia próxima al extremo distal del tercer segmento), la denticulación del hipostoma y la forma de la base del capítulo son importantes criterios de diagnóstico (36).

Los machos de *Rhipicephalus*, *Boophilus* y *Hyaloma* tienen uno o dos pares de placas prominentes a ambos lados del ano. La morfología de estas placas es muy variable y se encuentran una a cada lado del cuerpo detrás del último par de patas. De estas, las del primer par, además de tener una función locomotora tiene también otra sensorial haciendo las veces de antenas. Para ello llevan en el tarso el llamado órgano de Haller, en la que se encuentran varios tipos de setas que perciben la temperatura, humedad, olor y vibraciones, entre otros estímulos (37). El borde posterior del cuerpo está adornado por series regulares de áreas rectangulares denominados festones por su similitud a una guirnalda que forman curvas entre dos puntos (36).

2.2.5. Ciclo de vida

Por ser una garrapata de la familia *Ixodidae*, *R. sanguineus* presenta tres formas parasitarias dentro de su ciclo de vida: larva, ninfa y adulto, este último estadio con dimorfismo sexual. Cada estadio parasita un hospedero por algunos días (3 a 7 días para larvas y ninfas, 5 a 7 días para hembras adultas y más de 15 días para machos

adultos), estas se alimentan principalmente de sangre, linfa, restos tisulares de la dermis o epidermis lesionada por diversas enzimas proteolíticas secretadas por la saliva de la garrapata (37).

Las hembras realizan una puesta aproximada de 4000 huevos, tras un periodo de preoviposición variable de tres a 85 días, las larvas eclosionan entre 8 a 67 días y después de un periodo de maduración, están en condiciones para fijarse a un primer hospedero. Entre los tres y siete días post fijación, la larva se suelta una vez repleta o alimentada y busca un lugar resguardado donde realizar su primera muda. Las ninfas aparecen entre los 6 y 23 días posteriores a la primera ecdisis y casi de forma inmediata están preparados para subir a un segundo hospedero con el fin de volverse a alimentarse. El tiempo que necesita para alcanzar la repleción varía entre 4 y 9 días; pasado este periodo, la ninfa repleta se suelta de su hospedador, cae al suelo y busca un sitio resguardado para realizar la segunda muda a partir de la cual emergerán los adultos entre los 12 y 129 días post ecdisis. La garrapata adulta puede sobrevivir en ayuno más de 568 días en espera de su tercer hospedero. Al encontrarlo, las hembras solo se fijan y succionan sangre una vez mientras que los machos se alimentan de forma intermitente y persisten más tiempo sobre el hospedador con la finalidad de fecundar a la mayoría de las hembras. Estas una vez alimentadas, caen al suelo y buscan un refugio donde realizar la ovoposición (38).

2.2.6. Lesiones ocasionadas en el hospedador

Acción hematófaga: Las garrapatas se pueden encontrar por toda la superficie corporal pero tienen predilección por las zonas ventrales y las zonas con piel fina, como cara, orejas, axilas, y regiones interdigital, inguinal y perianal. Debido a que una garrapata hembra adulta puede ingerir hasta 2 – 4 cc de sangre en dos a cuatro horas, la pérdida de sangre en infestaciones graves y bajo algunas circunstancias, puede desencadenar anemia aguda (39).

Acciones mecánicas: La herida producida por la picadura de la garrapata puede infectarse o se pueden formar microabscesos como reacción a las piezas bucales de la garrapata, cuando ésta se extrae de forma incorrecta y parte de estas piezas quedan incluidas en la piel del hospedador (39).

Reacción de hipersensibilidad: También se puede causar fenómenos de hipersensibilidad cutánea, macroscópicamente la reacción se caracteriza por una zona eritematosa y pruriginosa, debida la liberación de aminas vaso activas contenidas en basófilos y mastocitos, principalmente histamina. En los perros, son frecuentes las reacciones granulomatosas en lugares de las picaduras, lesión que puede aumentar de tamaño y adoptar un aspecto ulceroso. La localización interdigital de garrapatas puede dar lugar a una pododermatitis (36).

Parálisis por picadura: La parálisis por garrapatas es una parálisis flácida ascendente, consecutiva a la fijación de la garrapata en el curso de 2 a 7 días. Puede estar causada por más de 40 especies de garrapatas de todo el mundo. Es posible que aniquile animales, principalmente vacas y ovejas. Los casos humanos son raros y habitualmente aparecen en niños menores de 10 años. La parálisis por garrapatas aparece cuando una garrapata hembra congestionada y grávida (cargada de huevos) produce una neurotoxina (holociclotoxina) en sus glándulas salivales y la transmite a su hospedador durante la crianza. La cantidad máxima de toxina se produce entre los días 5° y 7° de la fijación y puede sólo permanecer para ser liberada en presencia de la garrapata. Después de eliminar la garrapata, los síntomas suelen disminuir rápidamente. No obstante, en algunos casos puede aparecer una parálisis intensa que incluso llegaría a ser mortal antes de que nadie se diese cuenta de la presencia de una garrapata (40).

Ehrlichiosis transmitida por garrapatas: Estas son uno de los principales agentes infecciosos que transmite la picadura de *R. sanguineus* al alimentarse al menos por 24 a 48 horas en el animal. Tras la inoculación, *Ehrlichia* se multiplican en las células endoteliales de los pequeños vasos sanguíneos y llegan a diseminarse ampliamente por el sistema vascular. Tras un periodo de incubación de 6 a 7 días, el paciente

presenta fiebre elevada durante un periodo de hasta 2 a 3 semanas, así como una erupción maculopapular en las extremidades. La mayoría de los casos presentan trombocitopenia significativa. En ocasiones, la lesión de la picadura puede llegar a necrosarse. En pacientes con rickettsiosis potenciales es crucial la realización de una exploración clínica minuciosa y una investigación epidemiológica (36).

Hepatozoonosis canina transmitida por garrapatas: El ciclo vital del género *Hepatozoon* necesita del paso por un artrópodo y un vertebrado para completarse. La transmisión se produce por: ingestión de *Rhipicephalus sanguineus*, consumo de carne o vísceras con quistes y vía transplacentaria. El parásito puede hallarse frecuentemente en perros asintomáticos. El cuadro clínico, se hace más evidente, cuando la parasitosis se asocia con estados de inmunosupresión o defectos congénitos en la función neutrofílica. El cuadro clínico más frecuente cursa con hipertermia (39°-40°), anorexia, abatimiento, anemia, hiperestesia y dificultad en la marcha (41).

2.2.7. Métodos de control

El control de las garrapatas y de las enfermedades que éstas transmiten es un campo extremadamente difícil. La aplicación de acaricidas es la medida de uso más habitual para el control profiláctico y terapéutico de estos ectoparásitos, a continuación se describirán los métodos de control que existen para el control de garrapatas.

2.2.7.1. Control mecánico

La técnica recomendada para retirar las garrapatas fijas en el animal consiste en sujetar con una pinza, lo más cerca posible de la piel del hospedador. A continuación ejercer una tracción suave mantenida, en la misma dirección del eje de fijación, hasta que la garrapata se suelte. Una vez realizada la extracción se debe desinfectar la herida y las manos del manipulador, y colocar la garrapata en un recipiente con alcohol al 70%. Este método puede ser efectivo en caso de un número reducido de garrapatas adultas (36).

2.2.7.2. Control químico

Sus ventajas a corto plazo son notables, por lo que su uso no puede ser sustituido por ningún otro sistema por el momento. La rapidez de sus efectos y la sencillez de su aplicación son conocidos, pero hay que tener en cuenta el riesgo de toxicidad para el manipulador y para el propio animal, el coste económico de la aplicación continuada, y la aparición de resistencias, así como el riesgo de accidentes ecológicos (42). Las infestaciones por garrapatas deben de controlarse con acaricidas/insecticidas de acción residual y prolongada, pertenecientes a cualquiera de las grandes clases en las que se dividen esos compuestos, de acuerdo con su naturaleza química. Órgano-clorados, Organofosforados, Carbamatos, Piretroides, y análogos, Formamidinas, Lactonas macrocíclicas (36).

Los organoclorados se han utilizado ampliamente en todo el mundo, con gran aceptación debido a su bajo costo y gran eficacia insecticida. Son compuestos altamente liposolubles y, debido a su escasa volatilidad, son muy persistentes. Actúan por contacto, estimulando el sistema nervioso central de los artrópodos, dando lugar a excitabilidad, incoordinación, parálisis y muerte de éstos (42). Es considerablemente tóxico para muchas aves, apenas si se excreta o descompone, si no que permanece almacenado y se va acumulando si se continúa su uso (36).

Los insecticidas organofosforados actúan inhibiendo la acción de la colinesterasa a nivel de los ganglios nerviosos y bloqueando la transmisión nerviosa, causando la parálisis y muerte del parásito. Los organofosforados resultan problemáticos para el medio ambiente (42). No tienden a acumularse en los seres vivos, pero se descomponen con más facilidad que los organoclorados, tanto en el medio ambiente, como en el metabolismo de los animales y del hombre (36).

A partir de los años 70 se desarrollaron los piretroides sintéticos de segunda y tercera generación, fotoestables y que han resultado ser muy eficaces y persistentes en el tratamiento de plagas en animales (cipermetrina, permetrina, etc.) (36). Se cree que tanto las piretrinas, como varios insecticidas piretroides actúan mediante el incremento de conducción normal del ion sodio a través de la membrana nerviosa. Se conocen dos

clases de Piretroides, según los signos clínicos que provocan en animales con intoxicación aguda (42).

Las avermectinas (ivermectina, doramectina) y las milbemicinas (moxidectina) pertenecen al grupo de las lactonas macrocíclicas o macrólidos y son productos de fermentación de actinomicetos del género *Streptomyces*. Son compuestos muy potentes que muestran actividad sobre un amplio espectro de parásitos internos y externos. No causan muerte repentina a las garrapatas, ni un desprendimiento inmediato del hospedador, sino que actúan interrumpiendo su proceso de alimentación, muda y reproducción (42). Los endectocidas tienen acción sistémica (actúan a través de la sangre del hospedador), de contacto e incluso por ingestión, según cómo se aplican. La denominación endectocida deriva del hecho que, además de controlar ectoparásitos, también son altamente eficaces contra numerosos parásitos internos o endoparásitos, sobre todos helmintos nematodos (36).

Finalmente los fenilpirazoles representados por el fipronil es un antiparasitario externo con actividad insecticida y acaricida de amplio espectro que actúa por contacto y tiene un largo poder residual. Su mecanismo de acción consiste en bloquear los canales de cloro regulados por GABA en la membrana celular de las células del sistema nervioso central. Los insectos afectados muestran hiperexcitación y acaban muriendo. El bloqueo parece que es más estable en insectos que en vertebrados y mamíferos, en los que se dan también este tipo de mecanismo (36).

El desarrollo de resistencia, por parte de las garrapatas, a todos los acaricidas determina una grave amenaza. Por tanto, se necesita urgentemente que se desarrollen nuevos métodos de control contra las garrapatas de dos y de tres hospedadores, que se localizan en el hospedador durante largos períodos de tiempo (38).

2.2.7.3. Control biológico

Los agentes biológicos que potencialmente pueden ser usados para el control de garrapatas se clasifican en hongos entomopatógenos (*Lecanicillium lecani*, *Metarhizium sp*; *Beauveria sp*; etc), bacterias (*Cedecea lapagei*, *Escherichia coli* y *Enterobacter agglomerans*), nematodos entomopatógenos (*Heterorhabditidae* y *Steinernematidae* (43).

Estos hongos, cuyo uso se ha popularizado en los últimos años para el control plagas a nivel agropecuario, pertenecen a las especies *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* y tienen un efecto directo sobre las garrapatas y sus huevos, controlando la población y disminuyendo su capacidad parasitaria al contar con un efecto residual, ya que se reproducen en el ambiente. Una vez las garrapatas entran en contacto con el hongo, éste inicia un proceso invasivo mediante enzimas que rompen la cutícula protectora del insecto, para posteriormente culminar la fase infecciosa con el desarrollo del hongo al interior de la garrapata y la liberación de esporas en el medio ambiente, lo que favorecerá su propagación en las zonas donde se pueden encontrar larvas o huevos, cuya viabilidad se verá afectada, ya que al ser infectada, la garrapata se desprende del huésped y da inicio al proceso de ovoposición, facilitando así la colonización de los huevos por parte del hongo (44).

2.2.8. Resistencia a acaricidas

La resistencia se define como la capacidad adquirida por individuos de una población parásita que les permite sobrevivir a dosis de químicos que generalmente son letales para una población normal. El desarrollo de resistencia es un proceso evolutivo que aparece por selección genética. Diversas especies de insectos han logrado sobrevivir de manera natural a condiciones adversas, mediante un proceso de adaptación gradual para mantener el orden en los ecosistemas. Cuando un insecticida es utilizado intensivamente, ocasiona una fuerte presión de selección que elimina los individuos

susceptibles y el insecticida se convierte en el agente de selección más importante (45).

Para diagnosticar la resistencia a los ixodicidas, el primer signo de una infestación por garrapatas, es la persistencia del ectoparásito posterior a la aplicación de un producto garrapaticida. El diagnóstico de resistencia por signos indirectos es posible realizarlo solo si el problema está muy avanzado. Al presentarse casos sospechosos de resistencia, es importante verificar que los tratamientos ixodicidas hayan sido aplicados de forma apropiada tomando en cuenta las dosis, almacenamiento de las sustancias activas, formas, frecuencia de baños, tipo de aplicación, etc. (45)

Con el paso del tiempo se han desarrollado varios ixodicidas eficaces que permiten tanto al Médico Veterinario como al cliente disponer de un método práctico para el control de garrapatas en el perro. Por desgracia a pesar de los diferentes esquemas señalados para el combate de este ectoparásito, las garrapatas han persistido ya sea por sus mecanismos de defensa en contra de los ixodicidas, por un mal uso en la aplicación del tratamiento o por la utilización de productos químicos con un grado de toxicidad que no resulta letal para la garrapata (38).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. ESPACIO Y TIEMPO

La investigación se llevó a cabo en la Asociación de Pobladores Vista Alegre del asentamiento humano Cerro Candela, distrito de San Martín de Porres, departamento de Lima. Durante los meses de febrero a mayo del año 2017. La etapa experimental tuvo una duración de 5 semanas y se realizó en los meses de febrero y marzo en horas de baja radiación solar ya que esta afecta al crecimiento del hongo. El análisis microbiológico de las garrapatas tuvo lugar en el laboratorio de microbiología de la Universidad Alas Peruanas ubicada en el distrito de Pachacamac en los meses de marzo y abril del año 2017.

3.2. POBLACIÓN Y MUESTRA

Se trabajó con un total de 20 caninos de distintas razas y edades, todos contaban con un alto grado de infestación (46) de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus*. El método de muestreo es no probabilístico de tipo intencional y selectivo.

3.3. DISEÑO EXPERIMENTAL

La siguiente investigación fue de tipo experimental porque se evaluó el efecto del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (MA) en el control de la garrapata *R. sanguineus* (RS) en caninos domésticos.

3.4. EQUIPOS Y PROCEDIMIENTOS

3.4.1. EQUIPOS

Material biológico

- Caninos
- Hongo *Metarhizium anisopliae* bolsa por 800 gr
- *Rhipicephalus sanguineus*

Material de campo

- Aspersor
- Fichas de pacientes
- Guantes de látex
- Agua destilada
- Gorros
- Mochila
- Cintas o bozales
- Arnés para perros
- Balanza
- Balanza de gramos
- Bolsas Ziploc
- Bidones de agua
- Frascos de muestras (para garrapatas)

Material de escritorio

- Hojas bond
- Lapiceros
- Folder

- Lápiz
- Engrapador
- Corrector
- Borrador
- Regla
- Tablero
- Bloc de notas

Material de Laboratorio

- Cajas Petri
- Papel filtro
- Agua destilada estéril
- Aguja de siembra
- Lámina portaobjetos
- Cubre objetos
- Alfiler
- Aceite de inmersión
- Alcohol isopropílico
- Tijeras
- Pinza plana
- Espátula
- Azul de lactofenol
- Medio de cultivo agar saboraud dextrosa
- Mechero de alcohol
- Mandil de laboratorio
- Mascarilla
- Cofia
- Cinta paraflim

Equipos

- Cámara fotográfica (Sony Cybershot W520, 14.1 MP)
- Laptop (Toshiba Satellite C45-ASP4206FL)
- Estereoscopio (Leica zoom 2000, modelo N° Z45V)
- Microscopio (Leica, modelo DM 750/4)
- Cámara de flujo laminar

Servicios

- Impresión
- Transporte
- Laboratorio de microbiología
- Biblioteca

Recursos humanos

- Investigadores

3.4.2. PROCEDIMIENTOS

a. Obtención de materiales

En diciembre del 2016 se adquirió el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en una presentación comercial de sustrato de maíz partido a una concentración de $1,8 \times 10^9$ conidias/g. Los demás materiales se adquirieron en el mercado local en enero del 2017, una parte de los materiales fueron tomados como préstamo del laboratorio de microbiología de la Universidad Alas Peruanas.

b. Selección de la muestra y determinación del nivel de infestación

Los caninos seleccionados para esta investigación vivían en zonas no urbanas pero todos tenían propietario, se buscó perros que tengan un alto nivel de infestación de garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* (46), realizando un conteo del total de garrapatas que los caninos tenían sobre toda su superficie corporal de acuerdo a los siguientes parámetros: La infestación se valoró del 1 al 3, donde 0 es 1 es una infestación baja con presencia de 1 a 10 garrapatas, 2 es una infestación moderada de garrapatas con presencia de 11 a 30 garrapatas y 3 es una infestación alta con presencia de 31 a más garrapatas (anexo 1).

c. Dilución del hongo

- El hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* se adquirió en presentación de sustrato de maíz partido, es decir el hongo se encontraba esporulado sobre el maíz a concentración de $1,8 \times 10^9$ /conidias por gramo de sustrato.
- Según las indicaciones del fabricante para garrapatas de la especie *Rhipicephalus microplus* (garrapata del ganado bovino) se debe realizar una dilución de 8 gramos

(8000 ppm) del producto por un litro de agua y agregar 0,5 gr. de detergente no enzimático para lavar el sustrato de maíz y desprender todas las esporas del hongo que se encuentren sobre él, de esta dilución se aplica un litro por cada 100 kilos, es decir 10 ml/Kg (47). Cabe resaltar que la dilución del hongo y la dosis a usar por animal fue facilitada por parte del laboratorio productor del hongo.

- Para lavar el sustrato se utilizó agua destilada porque tiene un pH neutro que es óptimo para el hongo.

d. Método de evaluación

Los caninos seleccionados para realizar la investigación presentaron diversos rangos de número de garrapatas que fueron: < 100 garrapatas, de 101 a 200 garrapatas, de 201 a 300 garrapatas y > 300 garrapatas. Los datos obtenidos semana a semana en los conteos fueron registrados en fichas individuales, para así poder evaluar el progreso en cuanto a la eficacia del hongo *Metarhizium anisopliae*.

e. Aplicación de tratamientos y conteo de garrapatas

- Para la aplicación *Metarhizium anisopliae*, se utilizó el protocolo realizado por Muñoz Medina en Honduras, donde realiza baños de aspersion con insecticidas biológicos una vez por semana durante cuatro semanas (48).
- En el día 0 se hizo el conteo inicial de garrapatas sobre toda la superficie corporal de los 20 caninos (anexo 2), acto seguido se aplicó el tratamiento que consistió la dilución indicada anteriormente del hongo y se calculó la dosis para cada perro según su peso.

- Cada 7 días se repetía el conteo de las garrapatas a los perros y se aplicaba el tratamiento por método de aspersión, este procedimiento se realizó durante 4 semanas. A los cachorros se les peso semanalmente y la dosis vario cada semana.
- En día 28 se hizo el último conteo de garrapatas y no se aplicó ningún tratamiento, también se realizó el porcentaje de eficacia individual (anexo 3).

f. Colecta y conservación de garrapatas

Las garrapatas *Rhipicephalus Sanguineus* fueron recolectadas para realizar el análisis microbiológico donde a partir de estas se aisló el hongo *Metarhizium anisopliae* para confirmar que la muerte de las garrapatas fue a causa de la micosis provocada por el hongo inoculado, ya que podrían existir otros factores de manejo que también pudieran causar la muerte de la garrapatas. Se recolectaron aquellas garrapatas que tenían características de micosis como deshidratación, cambio de coloración y poca respuesta a los impulsos externos (49). Las garrapatas fueron colectadas en frasco de plástico estériles y se conservaron en refrigeración hasta que culminó la fase experimental donde se procedió a realizar el aislamiento de *Metarhizium anisopliae*.

g. Montaje de cámara húmeda (50)

- Para realizar el aislamiento de *Metarhizium anisopliae* las muestras fueron remitidas al laboratorio de microbiología de la Universidad Alas Peruanas local Pachacamac donde se llevó a cabo la fase de aislamiento e identificación del hongo.
- En el laboratorio se observaron las garrapatas contaminadas por el hongo en el estereoscopio.
- La apariencia de las garrapatas infectadas por el hongo vistas por bajo el estereoscopio, mostraban momificación, rigidez en toda la superficie corporal, la

mayoría mostraban pequeñas zonas de esporulación micótica de coloración verde olivácea, característico de *M. anisopliae*. Entre las zonas donde se observó más este crecimiento del hongo fue en el tegumento surcos laterales, base del capitulum y en las patas (anexo 6).

- Luego llevó a cabo el montaje de la cámara húmeda, las muestras de *Rhipicephalus sanguineus* se remojaron durante 5 minutos en hipoclorito de sodio al 0.5%.
- Se enjuagó tres veces con agua destilada estéril y se colocaron sobre papel filtro estéril para extraer el exceso de humedad.
- En cada caja Petri se colocó un papel filtro humedecido en agua destilada estéril.
- Sobre el papel filtro húmedo se colocaron dos portaobjetos en forma de cruz y sobre estas las garrapatas (5 muestras por caja Petri).
- Las cámaras húmedas fueron selladas con Parafilm e incubadas a 20° C durante 7 días.

h. Aislamiento de *Metarhizium anisopliae* a partir de *Rhipicephalus sanguineus* (50)

- Este paso se realizó en la cámara de flujo laminar.
- Para los aislamientos se tomaron las garrapatas de la cámara húmeda que presentaron una esporulación uniforme y libre de contaminantes.
- Con un aro de siembra previamente esterilizado en un mechero de alcohol, se tocó ligeramente el hongo a propagar y fue sembrado mediante la técnica del rayado en la caja Petri conteniendo el medio de cultivo Agar Sabouraud Dextrosa.

- Las cajas Petri se introdujeron a una incubadora a una temperatura de 25° C durante 15 días.
- Las colonias tuvieron inicialmente un color blanco uniforme de textura algodonosa y con poca elevación, algunas de las ellas comenzaban a tener porciones de pigmentos verdes muy claro (anexo 7A y 7B). Por el revés las colonias presentaban color crema, alguna de las cajas Petri tenían el centro de las colonias de amarillentas. Posteriormente estas cambiaron a un color completamente verde oliváceo, algunas tenían pequeñas zonas de coloración blanquecina verdosa (anexo 7C y 7D), en ambos casos las colonias presentaban textura polvorosa, de superficie semi-elevada. El revés de estas colonias era de color mostaza.

i. Identificación del entomopatígeno (50)

- En una lámina portaobjetos, se coloca una gota de azul de lactofenol.
- Con un alfiler minutum se tomó una pequeña muestra del tejido hifal y se dispersó en un portaobjetos sobre una gota del colorante, se colocó un cubreobjetos y se observó la muestra bajo el microscopio.
- Las conidias de *Metarhizium anisopliae* aisladas a partir de las garrapatas recolectadas, microscópicamente tenían aspecto hialino, uninucleadas, forma cilíndricas, levemente anchas con los extremos redondeados, estaban dispuestas en cadenas y al agruparse tomaban una coloración verdosa (anexo 8).
- . Las conidias median un promedio de 6.91 micras de largo con un rango de 5.805 a 8.358 micras y las dimensiones del ancho de estas vario de 2.453 a 3.102 micras con un promedio de 2.804 micras.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos que se obtenidos durante la investigación se estructuraron en una hoja de cálculo en Microsoft Excel, la que se utilizó para la determinación de los diversos parámetros (conteos de garrapatas semanales, repeticiones del tratamiento).

La eficacia del hongo entomopatógeno se calculó mediante la prueba de reducción de recuento de garrapatas, la cual considera una relación porcentual entre la reducción de la media de garrapatas (\bar{X}) en el grupo tratado con respecto a la media del día 0, mediante la siguiente fórmula (51):

$$\text{Eficacia (\%)} = \frac{(\bar{X}d=0) - (\bar{X}d=7,14,21,28)}{(\bar{X}d=0)} \times 100$$

La eficacia se evaluó en base a los siguientes parámetros: Altamente efectivo $\geq 98\%$, efectivo = 98 – 90%, ayuda en el control = 89 – 80% e insuficientemente activo $\leq 80\%$ (52).

IV. RESULTADOS

4.1. EFICACIA SEMANAL DEL TRATAMIENTO CON MA PARA EL CONTROL DE RS, SEGÚN EL RANGO DE NÚMERO DE GARRAPATAS PRESENTES EN LOS CANINOS

Para poder observar la eficacia según el número de garrapatas por caninos, está fue evaluada en grupos según el rango de número de garrapatas que tenían los caninos (4 grupos). En el cuadro 1 se puede observar el promedio (\bar{x}) del número de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* (RS) que tuvo cada grupo antes de iniciar las aplicaciones del tratamiento con el hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (MA). Al día 7 post tratamiento el grupo 3 mostro la menor eficacia con 0,4% y el grupo 2 la mayor eficacia con 23,9%; se observa al día 14 que con una segunda aplicación del tratamiento la eficacia aumenta para todos los grupos, llegando a alcanzar la mayor eficacia para el grupo 4 con un 50%; al día 21 la mayor eficacia la muestra el grupo 1 con un 70,1%; y finalmente el día 28 se muestra una eficacia máxima del producto en el grupo 4.

Cuadro 1. Promedios del número de RS y porcentajes de eficacia de los días 0, 7, 14, 21 y 28, de los caninos tratados con el hongo MA, estos fueron divididos en 4 grupos según la cantidad de garrapatas que tenía cada uno de ellos.

Grupo	Rango de número de (RS)	Número de caninos	\bar{X} de (RS) al inicio del tto	N° de días post tratamiento con MA							
				Día 7		Día 14		Día 21		Día 28	
				\bar{X} de RS	% de eficacia	\bar{X} de RS	% de eficacia	\bar{X} de RS	% de eficacia	\bar{X} de RS	% de eficacia
1	< 100	5	87	74	14,9	50	42,5	26	70,1	16	81,6
2	De 101 - 200	6	142	108	23,9	74	47,9	46	67,6	27	80,9
3	De 201 - 300	6	240	239	0,4	140	41,7	91	62,1	42	82,5
4	> 300	3	336	296	11,9	168	50,0	101	69,9	50	85,1

4.2. EFICACIA SEMANAL DEL TRATAMIENTO CON *Metarhizium anisopliae* (MA) PARA EL CONTROL DE *Rhipicephalus sanguineus* (RS)

La eficacia del tratamiento con *Metarhizium anisopliae* a perros infectados con garrapatas de la especie *Rhipicephalus sanguineus* tuvo porcentajes de eficacia que aumentaron progresivamente tras cada aplicación del tratamiento, esto se explica en el cuadro 2, donde se observa que a los 7 días post primera aplicación del tratamiento se obtuvo una eficacia del 10,67 %; a los 14 días se realizó otro conteo y aplicación del producto donde se encontró una eficacia del 45,64 %; a los 21 la eficacia aumento al 66,60 % y en el último conteo del día 28 después de 4 aplicaciones del hongo entomopatógeno se obtuvo una eficacia final del 82,81%.

Cuadro 2. Porcentaje de eficacia del tratamiento con el hongo *Metarhizium anisopliae* (MA) para el control de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* (RS) en caninos en un periodo de 28 días con 4 aplicaciones del tratamiento, utilizando la prueba de reducción de recuento de garrapatas.

Día post infección de (RS) con (MA)	Número de aplicaciones	% de Eficacia de (MA) sobre (RS)
0	1	-----*
7	2	10,67%
14	3	45,64%
21	4	66,60%
28	---**	82,81%

*primer conteo y aplicación del tratamiento a base de (MA).

**último conteo, no se aplicó el tratamiento.

4.3. PORCENTAJES DE EFICACIA INDIVIDUAL DE MA SOBRE RS AL DÍA 28

Los porcentajes de eficacia individual (PEI) con el tratamiento de MA para el control de RS en el día 28 variaron del 62.07% (mínimo) al 90% (máximo), con la siguiente distribución: 1 individuo presento un PEI entre 98-90% 12 individuos presentaron un PEI entre 89-80% y 7 individuos presentaron un PEI \leq 80% (cuadro 3).

Cuadro 3. Número de perros que presentaron distintos porcentajes de eficacia con el tratamiento con *Metarhizium anisopliae* en el control de *Rhipicephalus sanguineus* individual al finalizar los 4 tratamientos.

PEI de (MA) sobre (RS) al día 28	Número de caninos Tratados
98 – 90%	1
89 – 80%	12
\leq 80%	7

4.4. ANÁLISIS DE COSTOS DEL TRATAMIENTO CON EL HONGO MA

Finalmente en el cuadro 4 se realizó un análisis de costos del tratamiento con *Metarhizium anisopliae* para un canino de peso promedio de 14,51 Kg con frecuencia de una semana donde el costo por aplicación fue de S/. 0,16 y las 4 aplicaciones tuvieron un costo total de S/. 0,64; estos costos no incluyen la mano de obra ni otros materiales.

Cuadro 4. Análisis de costos del tratamiento con *M. anisopliae* (MA) para un canino de peso promedio de 14.51 Kg.

	Precio AD* (S/.)	Precio MA (S/.)	Costo total por dosis (S/.)	Costo total de 4 aplicaciones (S/.)
Media de dosis individual	0,14	0,018	0,16	0,64
Costo total de 20 perros			3,20	12,80

*AD: Agua destilada

V. DISCUSIÓN

En la evaluación por rango de número de garrapatas, es notorio que la eficacia aumenta tras cada aplicación del tratamiento proporcionalmente en los 4 grupos, esto es similar a un estudio *in vitro* donde se evaluó a *Metarhizium anisopliae*, y se vio que los 5 grupos tratados con el hongo mostraron una eficacia que aumentaba proporcionalmente en todos los grupos (53). Sin embargo a los 7 días observamos que uno de los grupos tratados tuvo un 0,4% de eficacia, lo cual difirió de la eficacia de los demás grupos al día 7, esto se dio porqué dos caninos de ese grupo tuvo un gran aumento del número de garrapatas, lo cual influyó en la media del número de garrapatas.

La eficacia del tratamiento con *Metarhizium anisopliae* sobre la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* obtuvo un aumento progresivo del porcentaje de eficacia, teniendo una eficacia mínima al día 7 con 10,67%, y en los días 7, 14, 21 y 28 post tratamiento la eficacia fue de 45,64%, 66,60% y 82,81% respectivamente, lo cual se traduce en una disminución de garrapatas que se encontraban sobre el animal. No existen estudios que demuestren la eficacia de *Metarhizium anisopliae* sobre *R. sanguineus* en campo sobre caninos; sin embargo en evaluaciones de este hongo sobre *R. microplus*, en Yucatán observaron que con una combinación de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* que provenían de lugares distintos se obtuvieron eficacias que variaron del 30,9 al 87,7% al día 7 post aplicación (54). En otro estudio la eficacia fue del 87% a la tercera semana post tratamiento (55), y en Brasil obtuvieron el mismo porcentaje de eficacia al día 35 post aplicación (26). Se expone en los distintos ensayos que los resultados son variables a pesar de que todos los autores utilizan concentraciones que varían de 10^7 a 10^9 conidias/ml, logrando disminuir la infestación de garrapatas en un porcentaje mayor al 80%.

En este estudio también se puede ver que en el día 28 (conteo final) se obtuvo que la eficacia individual tuviera variaciones del 62 al 90%, en tanto en una investigación realizada en México sobre bovinos al pastoreo la eficacia del hongo entomopatógeno varió del 40% al 91% de manera individual (56).

La eficacia que obtuvimos fue de 82,81% al día 28 post tratamiento, mientras que en otros estudios realizados *in vitro* se obtienen eficacias más elevadas, esto quiere decir que existe una diferencia significativa de los estudios realizados *in vitro* como *in vivo*. En distintos países como en Costa Rica que se obtiene una eficacia del 100% de garrapatas *Rhipicephalus sanguineus* al día 20 (7), Samish que obtuvo un 100% de eficacia al día 30 post tratamiento (29), lo mismo se obtuvo en Brasil al lograr una mortalidad del 100% (57), todos los estudios mencionados anteriormente realizados *in vitro*.

Los resultados que otros estudios han obtenido, en contraste con los resultados que se obtuvo en esta investigación y en otros ensayos realizados en campo, confirman que la patogenicidad de *Metarhizium anisopliae* depende de factores externos, sobre todo ambientales (temperatura, humedad y exposición a rayos ultravioleta) los cuales pueden ser optimizados en condiciones *in vitro* para obtener el máximo potencial patógeno del hongo sobre las garrapatas, a diferencia de las condiciones de campo donde las condiciones ambientales son imposibles de controlar. Esto se ajusta a lo reportado por Arruda, el cual indica que la patogenicidad de los hongos entomopatógenos está influenciada por factores ambientales los cuales pueden disminuir el potencial de penetración del hongo a la cutícula de las garrapatas (18), por su parte Leemon indica que hay baja mortalidad de garrapatas sobre los animales a comparación de los resultados *in vitro*, esto también puede deberse a factores micro climáticos de los animales como el pH y la temperatura de la piel que pueden afectar negativamente a la germinación de las esporas (24). También está demostrado que una exposición directa de los hongos entomopatógenos a radiación ultravioleta intensa por 20 minutos disminuye en un 64,9% su supervivencia (3).

La temperatura de Lima en los meses de febrero y marzo varió de 22,6 a 29,5 ° C, la humedad relativa varió del 93% al 62% y los tratamientos se aplicaron a partir de las 5 pm donde disminuye la radiación ultravioleta, todos estos factores fueron importantes para la germinación y penetración de las esporas de *Metarhizium anisopliae* en la cutícula de las garrapatas, ya que su temperatura óptima de penetración es de 25 a 30°C , la humedad relativa que favorece su patogenicidad es de 75 a 100% y es sensible a la radiación ultravioleta (13). Sin embargo, a pesar de que la época del año donde se realizó la investigación tuvo mucho potencial en favorecer la patogenicidad del hongo, el clima no siempre es estable lo cual pudo afectar a la penetración de *Metarhizium anisopliae*, aunque se notó que a mayor número de tratamientos y mayor frecuencia de exposición de la garrapata a la solución del hongo entomopatógeno la eficacia aumentaba.

Otro factor que influye en la efectividad del hongo y el cual puede también explicar la variación en las eficacias de este estudio con otros realizados anteriormente es la cepa usada y la concentración, la cepa que se utilizó fue proveniente del departamento de Trujillo a una concentración sugerida por el fabricante. Las variaciones de virulencia y patogenicidad están influenciadas por factores como la concentración utilizada (a mayor concentración mayor eficacia), etapa de desarrollo de la garrapata, hay cepas que tienen mayor eficacia en garrapatas adultas que en larvas, otras afectan a las ninfas de *R. microplus*, hay cepas que reducen la eclosión, otras tienen efecto sobre la ovoposición. Además se ha visto que el lugar de procedencia de las cepas influye en su tolerancia a la luz UV (4).

En cuanto al análisis de costo, cada aplicación tuvo un costo promedio de S/. 0,16 y el costo total de las cuatro aplicaciones del tratamiento fue de S/. 0,64 por canino, estos costos se pueden comparar con el costo de otros productos que se aplican para el control de garrapatas en caninos, como la cipermetrina que tiene un costo en el mercado local de S/. 5,00 a S/. 8,00, el amitraz que cuesta aproximadamente S/. 8,00 a S/. 10,00 y la ivermectina que tiene un costo de aproximadamente S/. 10,00 a S/. 15,00 por animal en veterinarias localizadas en el distrito de San Martín de Porres. Realizando esta comparación en los costos se establece que los tratamientos con

Metarhizium anisopliae tienen precios similares a los de la cipermetrina y el amitraz, sin embargo los hongos entomopatógenos no produce intoxicaciones ni efectos negativos en el medio ambiente.

El ensayo realizado demuestran que *Metarhizium anisopliae* tiene potencial en el control de *Rhipicephalus sanguineus* el cual puede ser aprovechado realizando posteriores estudios donde se fortifique su efecto entomopatógeno, ya sea con concentraciones más elevadas hongo, formulaciones que protejan de las condiciones ambientales a las conidias de *M. anisopliae* y favorezcan su germinación o potenciando su efecto en combinación con otros productos.

VI. CONCLUSIONES

- De acuerdo a los resultados de esta investigación, se confirma la acción entomopatógena de *Metarhizium anisopliae* actuando como un agente biocontrolador de la garrapata adulta del perro, *Rhipicephalus sanguineus*, obteniendo un 82,81% de eficacia tras cuatro aplicaciones del tratamiento, lo que representa un método biológico promisorio para el control de plagas en medicina veterinaria.

VII. RECOMENDACIONES

- Continuar los estudios donde se evalué el efecto de *Metarhizium anisopliae*, durante más días después de la última aplicación del tratamiento para comprobar si este presenta residualidad.
- Realizar investigaciones con hongos entomopatógenos donde se consideren formulaciones con sustancias que protejan al hongo de las condiciones ambientales que limitan su efecto, o probar si existe sinergismo al combinarse con otras especies entomopatógenas u otros agentes biológicos de control de ectoparásitos.

VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Evans CHR, Samson JP, Latge. Atlas of entomopathogenic fungi. Berlin: Springer; 1998.
2. Zimmermann G. Review on safety of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. Biocontrol Science and Technology. 2007; 17(9): 879-920.
3. Samish M, Ginsberg H, Glazer I. Biological control of ticks. Vet Parasitol. 2004; 129: 389-403.
4. Pucheta Díaz M, Flores Macias A, Rodrigues Navarro S, De La Torre M. Mecanismo de acción de los hongos entomopatógenos. INCI. 2006;31 (12): 856-860,
5. Sepúlveda PA. Efecto de *Steinernema sp* y *Heterorhabditis bacteriophora* sobre *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae) [Tesis de Maestría]. Medellín, Colombia: Universidad Nacional de Colombia Sed Medellín; 2007.
6. Téllez Jurado, Cruz R M, Flores M, Asaff T, Arana-Cuenca A. Mecanismos de acción y respuesta en la relación de hongos entomopatógenos e insectos. Revista mexicana de micología. 2009; 30: 73-80.
7. Mora Jiménez L, Rodríguez Rojas C, Quiroz Cortés A, Amador Soto C, Jimenez-Rocha A. Efectos de los Hongos *Metarhizium anisopliae*, *Lecanicillium lecanii* y *Paecilomyces lilacinus* en garrapatas del grupo *Rhipicephalus sanguineus*. UNA. 2015; 16 (1): 1-3.

8. Kaaya GP, Mwangi EN, Ouna EA. Prospects for biological control of livestock ticks, *Rhipicephalus appendiculatus* y *Amblyomma variegatum*, are using the Entomogenous Fungi *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2000; 67: 15-20.
9. Escobar A, Gavas MA, Ranzani MRT, Caldas Costa C, Peruca AP, Figueredo A et al. Estudio de la toxicidad/ patogenicidad aguda pulmonar en ratas tratadas con *Metarhizium anisopliae*. *SCIELO*. 2015; 37 (1): 27-38.
10. Driver F, Milner RJ, Trueman WHA. A taxonomic revision of *Metarhizium* based on phylogenetic analysis of rDNA sequence data. *Mycological Research*. 2000; 104: 135-151.
11. Kurtti T, Keyhani N. Intracellular infection of tick cell lines by the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*. *Microbiol*. 2008; 154: 1700-1709.
12. Dantigny P, Nanguy S. Significance of the physiological state of fungal spores. *Int J Food Microbiol*. 2009; 134: 16-20.
13. Guerrero JC, Carrillo RL, Aguilera P. Caracterización morfológica y germinación de cepas del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* var *anisopliae*, asociado a larvas de *escarabaeidos* y *curculionidos*. *Agro sur*. 1999; 27 (2): 23-34.
14. Gonzales Castillo M, Aguillar CN, Rodríguez Herrera R. Control de insectos plaga en la agricultura utilizando hongos entomopatógenos: retos y perspectivas. *Acta Química Mexicana*. 2012; 4(8).
15. Padilla Melo GN, Bernal Uribe MG, Vélez Arango PE, Montoya-Restrepo EC. Caracterización patogénica de aislamientos de *Metarhizium anisopliae* obtenidos de diferentes órdenes insectiles. *Cenicafé*. 2000. 51 (1): 28-40.

16. Ramirez HJ, Betancourt V. Identificación biológica y molecular de hongos entomopatógenos de garrapatas *Rhipicephalus microplus* asociadas a bovinos en el departamento de Caldas. Invest UNISARC. 2012; 10: 31 – 43.
17. Alean Carreño I. Evaluación de la patogenicidad de diferentes hongos entomopatógenos para el control de la mosca blanca de la yuca *Aleotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) bajo condiciones de invernadero [Tesis]. Bogotá: Pontífica Universidad Javeriana; 2003.
18. Arruda W, Lübeck I, Acharnk IA, Henninh M. Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. Exp Appl Acarol. 2005; 37: 231-244.
19. Leger RJ, Roberts DW. Engineering improved mycoinsecticides. Trens Biotechnol. 1997; 15: 83-87.
20. Monzón A. Producción, uso y control de calidad de hongos entomopatógenos en Nicaragua. Manejo Integral de Plagas. CATIE. 2001; 63:95–103.
21. Bittencourt VREP, Mascarenhas A, Horacio J. Mecanismo de infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* no carrapato *Boophilus microplus* em condições experimentais. Ciência Rural. 1999; 29: 351-354.
22. Bustillo A. Hongos en insectos y posibilidades de uso en el control biológico de plagas en Colombia. En: seminario Uso de entomopatógenos en Colombia. Bogotá: Sociedad Colombiana de Entomología. 2001: 30–53.
23. Fernández C, Juncosa R. Biopesticidas: ¿la agricultura del futuro? Phytoma. 2002; 141: 14-19.

24. Leemon D, Turner D, Jonsson N. Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Vet Parasitol.* 2008; 156: 248-260.
25. Frazzon APG, Vaz Junior IDS, Masuda A, Schrank A, Vainstein MH. *In vitro* assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Vet Parasitol.* 2000; 94 (2): 117-125.
26. Lopez E, Lopez G, Orduz S. Control de la garrapata *Boophilus microplus* con *Metarhizium anisopliae*, estudios de laboratorio y campo. *Revista Colombiana de Entomología.* 2009; 35 (1): 42-46.
27. Arguedas M, Alvares V, Bonilla R. Eficacia del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* en el control de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (ACARI: IXODIDAE). *Agronomía Costarricense.* 2008; 32(2): 137-147.
28. Gonzales Moteiro S, Pinheiro Bittencourt VR, Daemon E, Horacio Faccini JL. Efeito dos fungos entomopatogenicos *Metarhizium anisopliae* e *Beauveria bassiana* em ovos de *Rhipicephalus sanguineus* (acari: ixodidae). *Ciencia Rural Santa Maria.* 1998; 28 (3): 461-466.
29. Samish M, Gindin G, Aleskeev E, Glazer I. Pathogenicity of entomopathogenic fungi to different developmental stages of *Rhipicephalus sanguineus* (acari: ixodidae). *Journal of parasitology.* 2001; 87 (6): 1355-1359.
30. Kirklan BH, Westwood GS, Keyhani NO. Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus* and *Ixodes scapularis*. *Journal of Medical Entomology.* 2004; 41 (4): 705-711.

31. García MV, Monteiro AC, Szabó MPJ. Colonização e lesão em fêmeas ingurgitadas do carrapato *Rhipicephalus sanguineus* causadas pelo fungo *Metarhizium anisopliae*. *Ciencia Rural Santa Maria*. 2004; 34 (5): 1513-1518.
32. Evans DE, Martins JR, Guglielmone AA. A review of the ticks (Acari: *Ixodidae*) of Brazil, their hosts and geographic distribution. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2000; 95: 453-470.
33. Heile C, Schein E. Verhinderung der erregerübertragung durch blut saugende vektoren bei hunden. *DVG*. 2007.
34. Muñoz LE, Casanueva ME. Estado Actual de las garrapatas (Acari: *Ixodidae*) asociadas a *Canis familiaris L.* *Scielo*. 2001; 65 (2): 193 – 210.
35. Parasitología de las garrapatas [sede web]. Perú: blogspot.com; 2011 [actualiza 5 de enero del 2011; acceso 28 de octubre del 2016]. Disponible en: <http://parasitogarrapatas.blogspot.pe/2011/01/morfologia-de-las-garrapatas.html>
36. Cordero del Campillo M, Rojo Vásquez FA. *Parasitología Veterinaria*. España: Interamericana; 1999.
37. Georgi JR, Gorgi ME. *Parasitología Clínica canina*. España: Interamericana McGraw; 1994.
38. Izquierdo Najera CA. Importancia de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* como vector de enfermedades infecciosas en la clínica de perros y en la salud pública: Estudio Recapitulativo. Veracruz: Universidad Veracruzana; 2012.
39. Consejo Europeo para el control de parasitosis de los animales de compañía. Ectoparásitos control de insectos y garrapatas que parasitan a perros y gatos. Madrid: ESCCAP; 2006.

40. Acero EJ, Calixto OJ, Prieto AC. Garrapatas (Acari: Ixodidae) prevalentes en caninos no migrantes del noroccidente de Bogotá. NOVA. 2011; 19 (15): 113 – 214.
41. Morales Amella MJ, Serrano M, Sanchez A, Saez-Benito JM, Jáuregui E, López M. Caso clínico: Hepatozoonosis canina. Clínica veterinaria de pequeños animales. 1993; 13 (4): 243-251.
42. García Pérez AL, Barral M. Métodos de control de las garrapatas. Ovis. 1999; 65.
43. Cjeda Chi MM, Rodríguez Vivas RI, Galindo Velasco E, Lezama Gutierrez R, Cruz Vasquez R. Control de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) mediante el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* (Hypocreales: Clavicipitaceae). Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias. 2011; 2 (2): 177-192.
44. Garavito Henao A, Arango Buitrago R. Control biológico de la garrapata mediante la utilización de hongos entomopatógenos: Revisión del caso de la hacienda el tesoro. Revista Normando Colombiano. 2010.
45. Fernandez FF. Toxicological effects and resistance to pyrethroids in *Boophilus microplus* from Goias, Brazil. Arq Bras Med Vet Zootec. 2001; 53(5): 538 – 543.
46. Flores Egocheaga R, Méndez Visag S, Nina Carpio Y. Estudio de la Eficacia de Free Dog Spray sobre pulgas, garrapatas y ácaro *Sarcoptes scabiei*. Revista de Ciencias Veterinarias. 2008; 24 (4): 1-3.
47. Soluciones Agrosostenibles. Metarhisol, *Metarhizium anisopliae* con. Min. 1x10⁹ conidias/gr. La Libertad: SOLAGRO; 2016.
48. Muñoz Medina AG. Eficiencia de BAZAM (*Beauveria bassiana*) y METAZAM (*Metarhizium anisopliae*) en el control de garrapatas (*Boophilus microplus*) en ganado lechero de Zamorano, Honduras: Zamorano, Carrera de ciencia y producción agropecuaria; 2007.

49. Kaaya GP, Hebimdi M, Gindin M, Glazer G. Control of tick populations by spraying *Metarhizium anisopliae* conidia on cattle und field conditions. Ex Appl Acarol. 2011; 55: 273-281.
50. Cañedo Verónica, Ames Teresa. Manual de laboratorio para el manejo de hongos entomopatógenos. Lima, Perú: Centro Internacional de la Papa (CIP); 2004: 28-35.
51. Llacuachaqui Castillo CR. Evaluación e tres formulaciones comerciales de aplicación pour on bajo condiciones de campo y su efecto in vitro en el control de *Boophilus microplus*, en bovinos de ceja de selva. EAP. 2014.
52. Lamberti JC. Reglamento Técnico Pruebas de Eficacia para registro de Antiparasitarios. Argentina: Caprove; 2010.
53. Addisu S, Sori W, Dawd M. Laboratory evaluation of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* against termine, *Macrotermes*. Asian J. Plant Sci. 2013; 12 (1): 1 – 10.
54. Rodríguez-Alcocer UJ, Rodríguez-Vivas RI, Ojeda-Chi MM, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R. Eficacia de la mezcla de dos cepas de *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: *Hyphomycetes*) para el control de *Rhipicephalus microplus* en infestaciones naturales en bovinos. Tropical and Subtropical Agroecosystems [en línea] 2014, 17: [Fecha de consulta: 17 de septiembre de 2017] Disponible en: <<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=93931761008>> ISSN
55. Pulido-Medelín MO, Rodríguez-Vivas RI, García-Corredor DJ, Díaz-Anaya AM, Andrade-Becerra RJ. Evaluación de la eficacia de la cepa MA1309 de *Metarhizium anisopliae* en el control biológico de garrapatas adultas de *Rhipicephalus microplus* en Tunja, Colombia. Rev. Fac. 2015; 56 (2): 75 – 81.

56. Alonso Díaz MA, García L, Galindo-Velasco E, Lezama-Gutiérrez R, Angel-Sahagún C, Rodríguez-Vivas RI, Fragoso-Sánchez H. Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (*Hyphomycetes*) for the control of *Boophilus microplus* (*Acari: Ixodidae*) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. *Vet Parasitol.* 2007; 147: 336-340.
57. Monteiro SG, Bittencourt VREP, Daemon E, Faccini JLH. *R Rev. Bras. Parasitol. Vet.* 1998; 7 (2): 113-116.

ANEXOS

Anexo 1. Cuadro de grados de infestación de la garrapata *Rhipicephalus sanguineus* en caninos domésticos.

Grado de infestación	Puntuación	Número de garrapatas
Baja	1	$n \leq 10$
Moderada	2	$10 < n \leq 30$
Alta	3	$n > 31$

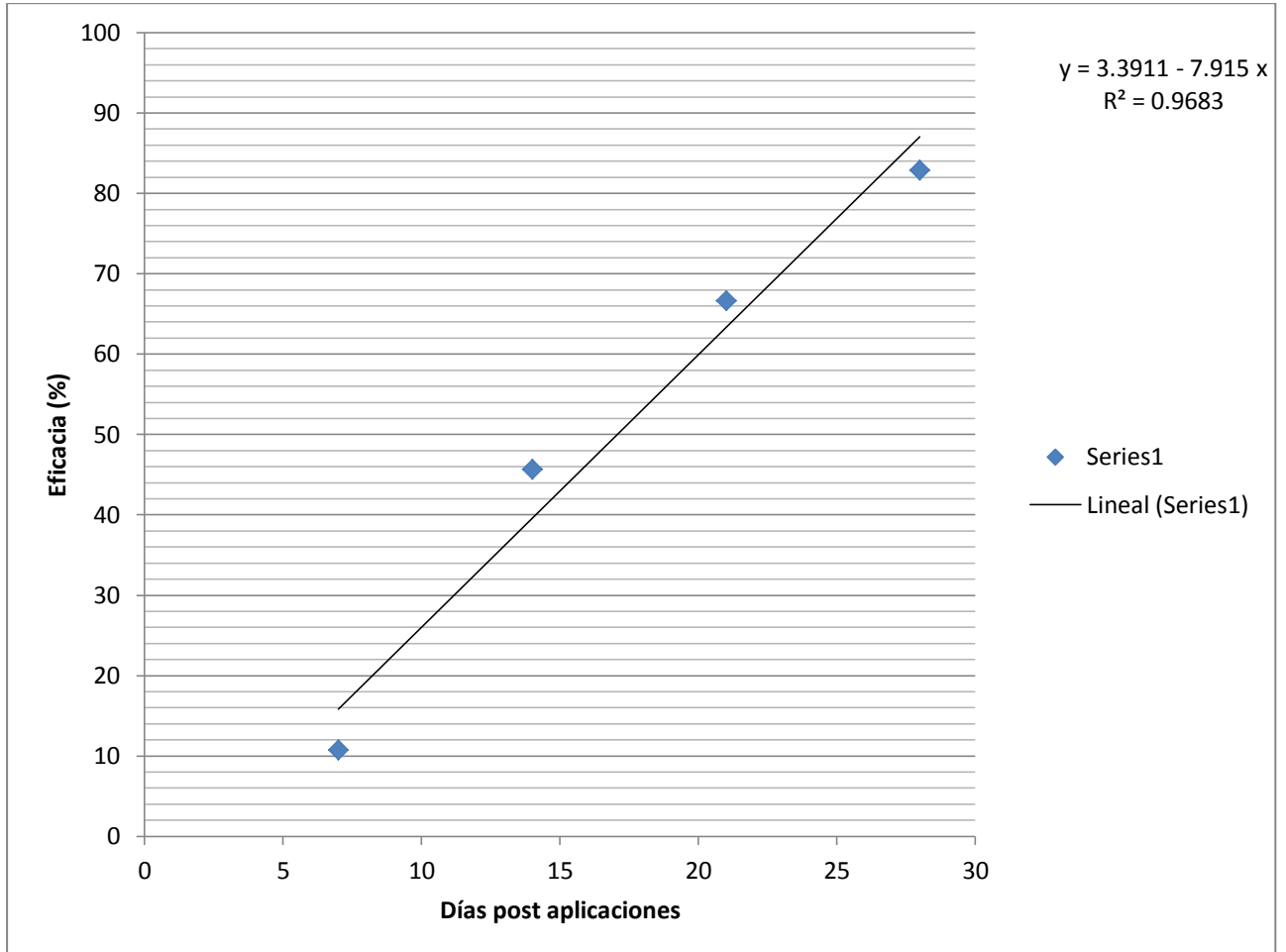
Anexo 2. Conteo del número de garrapatas *Ripicephalus sanguineus* (RS) para medir el control del tratamiento con *Metarhizium anisopliae* (MA) en caninos. Se realizaron los tratamientos y conteos los días 7, 14, 21 y 28 post tratamiento, agrupando a los pacientes en rangos según el número de garrapatas sobre su superficie corporal.

Rango de número de garrapatas (RS)	Número de caninos	Paciente	Número de garrapatas (RS)/día				
			Día 0	Día 7	Día 14	Día 21	Día 28
< 100	5	Chato Negro	70	59	39	13	7
		Chato Pac	80	65	42	13	9
		Rosalinda	87	79	65	49	33
		Candy	99	87	48	19	10
		Calata	100	79	54	34	20
		Negrta	105	69	48	32	28
101 - 200	6	Guacho	105	81	64	41	12
		Gringa	106	84	68	44	22
		Peluchina	168	133	77	51	45
		Negra	183	136	85	44	29
		Jalapisco	187	146	100	62	28
		Flaco	204	144	87	42	26
201 - 300	6	Arnold	209	310	146	100	48
		Negro	235	182	114	93	40
		Mylo	243	365	236	127	62
		Rubí	256	207	128	79	39
		Mini	294	228	128	102	35
		Chato	302	212	169	84	35
> 300	3	Amarillo	302	212	169	84	35
		Bethoven	326	286	173	125	60
		Giacó	381	389	162	94	55

Anexo3. Porcentajes de eficacia individual al finalizar los 4 tratamientos (PTT) por aspersión de *Metarhizium anisopliae*, sobre caninos con presencia de garrapata *Rhipicephalus Sanguineus*.

Canino	# garrapatas (RS) inicial	#garrapatas (RS) final	% eficacia individual al día 28 (PTT)
Gringa	106	22	79,25
Rosalinda	87	33	62,07
Peluchina	168	45	73,21
Negro	235	40	82,98
Bethoven	326	60	81,59
Mini	294	35	88,09
Negra	183	29	84,15
Mylo	243	62	74,49
Calata	100	20	80,00
Negrita	105	28	73,33
Arnold	209	48	77,03
Chato Pac	80	9	88,75
Candy	99	10	89,89
Chato Negro	70	7	90,00
Giacco	381	55	85,56
Chato Amarillo	302	35	88,41
Rubí	256	39	84,76
Jalapisco	187	28	85,03
Guacho	105	12	88,57

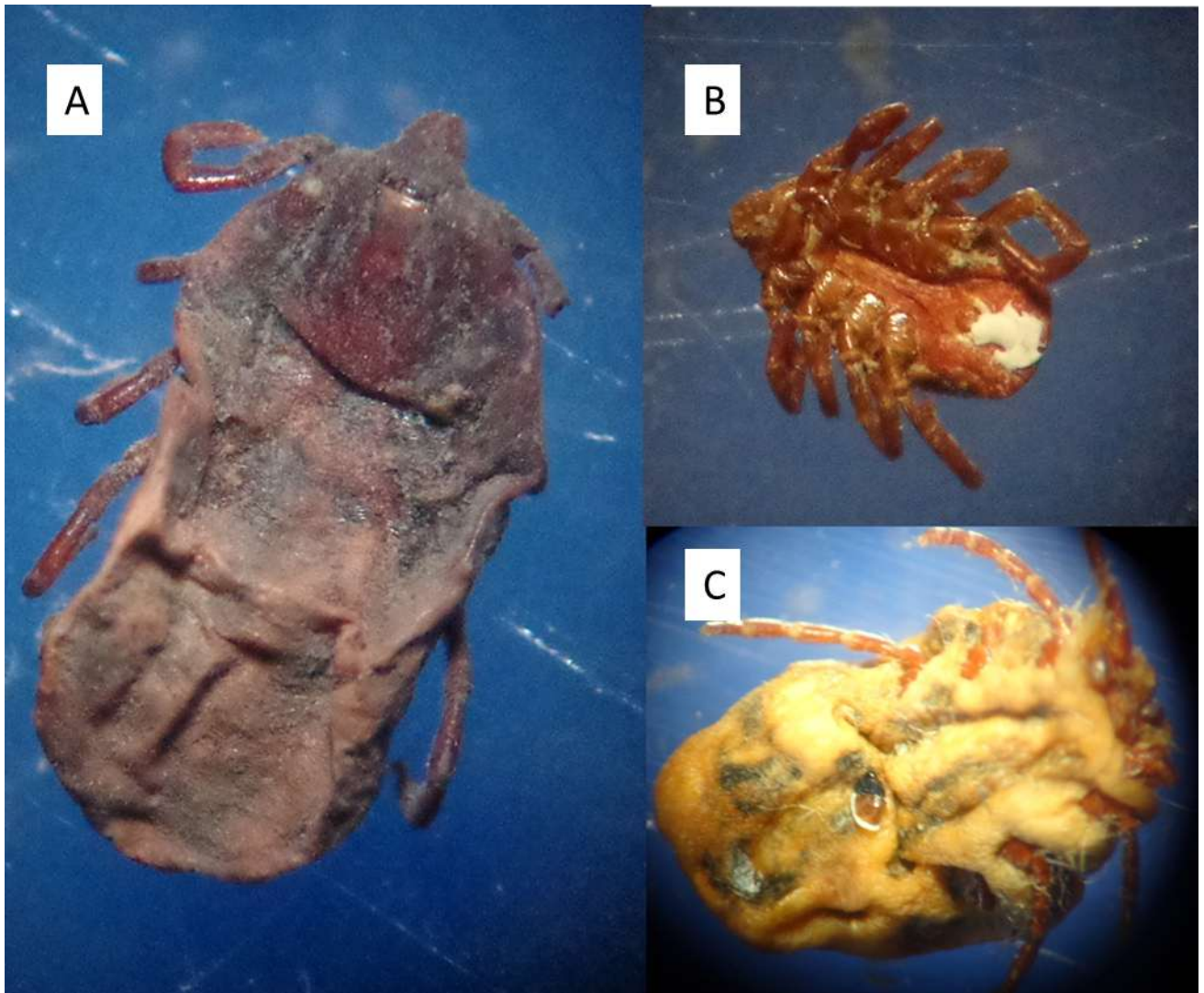
Anexo 4. En este modelo de regresión lineal se muestra que al pasar más días post tratamiento, la eficacia aumenta en 3.3911.



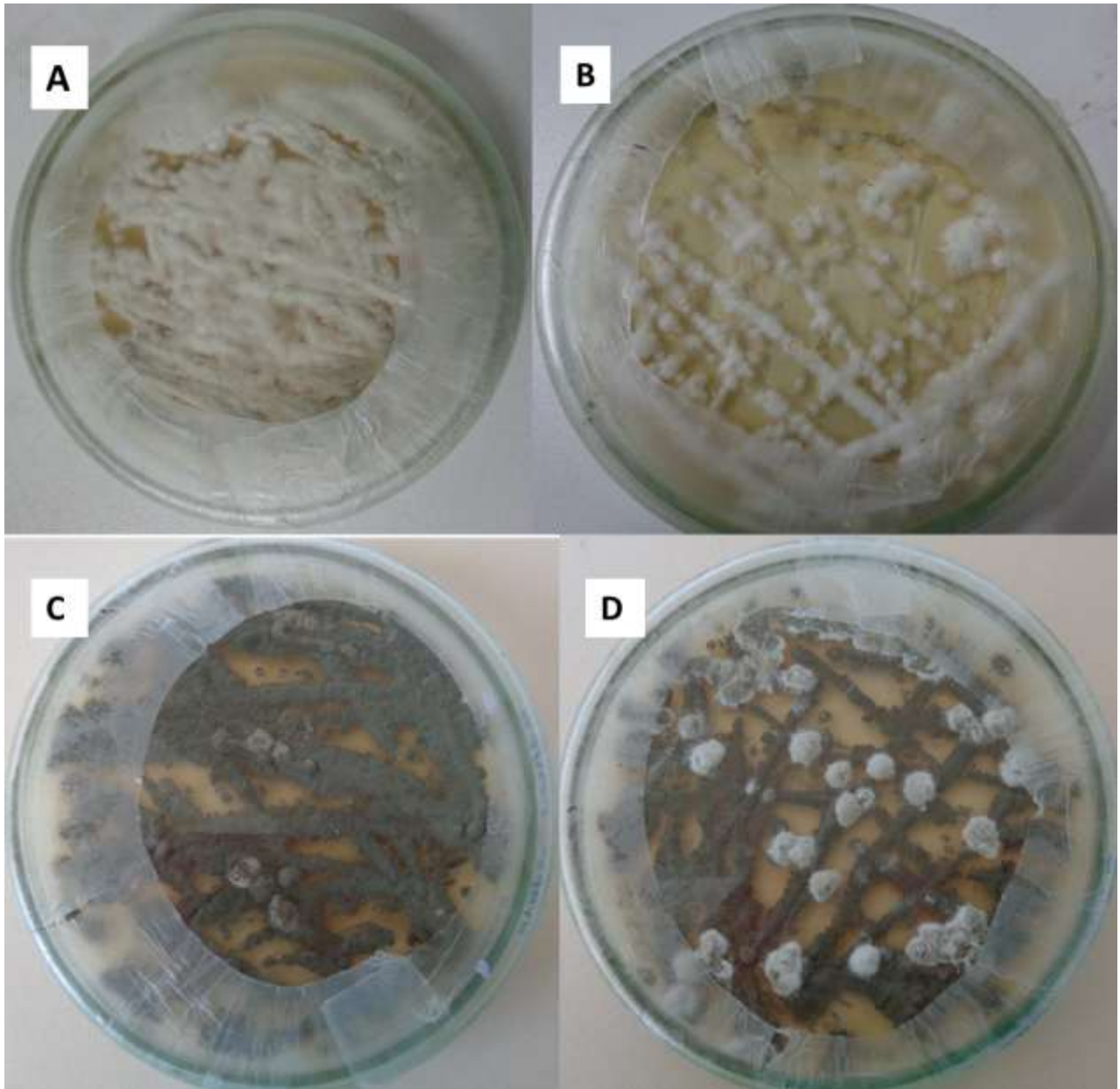
Anexo 5. Comparación del costos y eficacia de *Metarhizium anisopliae*, con insecticidas químicos, estos son, amitraz, cipermetrina, ivermectina.

Producto	Costo/dosis	Eficacia
Amitraz	0,50	85%
Cipermetrina	0,60	96,7%
M. anisopliae	0,64	82,81%
Ivermectina	15,00	90%

Anexo 6. Fotografías de *Rhipicephalus sanguineus* infectadas con el hongo *Metarhizium anisopliae* vistas bajo estereoscopio. A) Garrapata hembra que presenta crecimiento micótico en la base del capitulum, escudo dorsal, y en algunas zonas del cuerpo. B) Garrapata macho en posición ventral que presenta pequeño crecimiento micótico en la base de las coxas. C). Hembra que presenta poco crecimiento micótico en el surco genital y cerca del ano.



Anexo 7. Colonias de *Metarhizium anisopliae* aisladas a partir de *Rhipicephalus sanguineus*. A,B) Crecimiento micótico después de cinco días presenta coloración blanquecina e textura algodonosa y superficie semi elevada. C, D) Las colonias después de quince días de incubación presentaron color verde oliváceo que evidencia el crecimiento de los conidios, la textura se vuelve polvorosa y superficie semi elevada.



Anexo 8. Vista microscópica de conidias de *Metarhizium anisopliae*. A) (x40) Conidias agrupadas en cadenas que presentan coloración verde oliváceo. B) (x100) Longitud de las conidias que presentan 7.097 micras y 6.852 micras. B) Conidias agrupadas, presentan aspecto hialino, forma cilíndrica y extremos redondeados.

