

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

ACTUALIZACIÓN EN EL USO DEL HONGO ENTOMOPATÓGENO *Metarhizium anisopliae* PARA EL CONTROL DE *Rhipicephalus microplus*

“por”

Maria Ernestina OLHAGARAY TORRES

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de
Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Revisión monográfica

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2018**

PÁGINA DE APROBACIÓN:

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Dra. Zully Hernández

Segundo miembro (Tutor):

Dra. Eleonor Castro

Tercer miembro:

Dr. Enrique Nogueira

Fecha:

Autores:

Br. Maria Ernestina Olhagaray Torres

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, mis padres y a mi hermana Caro por ayudarme y acompañarme durante toda la carrera.

A Paco y Kiwi que me acompañaron siempre en mis horas de estudio.

A mi abuela Mirentxu que me enseñó sobre la perseverancia e insistencia.

Al gran equipo humano del Laboratorio 4, en especial a la Dra. Elinor Castro por su apoyo, dedicación y persistencia en mi formación en Parasitología.

Y a lo más importante que me dio esta carrera, mis amigas de facultad: Made, Gaby, Eli, Mily y Leo.

A la persona que, a pesar de todo, siempre creyó en mí.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
LISTA DE TABLAS Y FIGURAS.....	6
RESUMEN.....	7
ABSTRACT.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	9
2. OBJETIVOS.....	11
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	11
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	12
4.1. <i>R. microplus</i>	12
4.1.1. Generalidades.....	12
4.1.2. Biología.....	13
4.1.3. Perjuicios.....	15
4.2. Situación del control de <i>R. microplus</i> en Uruguay.....	15
4.3. Métodos de control.....	17
4.3.1. Control químico.....	17
4.3.2. Control no químico.....	18
4.3.2.1. Razas resistentes.....	18
4.3.2.2. Inmunológico.....	18

4.3.2.3. Control físico.....	18
4.3.2.4. Control biológico.....	19
4.4. Hongos entomopatógenos.....	20
4.5. <i>Metarhizium anisopliae</i>	21
4.5.1. Biología.....	21
4.5.2. Producción, selección y mantenimiento.....	25
4.5.3. Bioensayos.....	27
4.5.4. Patogenicidad.....	28
4.5.4.1. Virulencia.....	28
4.5.4.2. Concentración.....	28
4.5.4.3. Resistencia a condiciones climáticas.....	29
4.5.4.4. Conidiogénesis.....	29
4.5.5. Interacción con la garrapata.....	30
4.5.6. Combinación con otras sustancias.....	32
4.5.7. Interacción con el bovino (Ensayos <i>in-vivo</i>)	33
4.5.8. Interacción con otros organismos.....	34
4.6. Conclusiones.....	38
5. BIBLIOGRAFÍA.....	40

LISTADO DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribución mundial de <i>R. microplus</i>	12
Figura 2. Diagrama de la cutícula de <i>R. microplus</i>	13
Figura 3. Ciclo de <i>R. microplus</i>	14
Figura 4. Zonas epidemiológicas de garrapata.....	16
Figura 5. Blastosporo, Conidióforo y Conidios de <i>M. anisopliae</i>	20
Figura 6. Morfología de colonias de diferentes cepas de <i>M. anisopliae</i>	22
Figura 7. Etapas de infección de <i>M. anisopliae</i> sobre <i>R. microplus</i>	23
Figura 8. Huevo de <i>R. microplus</i> infectado con <i>M. anisopliae</i>	27
Figura 9. <i>R. microplus</i> adulta infectada con <i>M. anisopliae</i> E6.....	30

LISTADO DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Efecto <i>in-vitro</i> de <i>M. anisopliae</i> en el control de <i>R. microplus</i>	35
Tabla 2. Efecto <i>in-vivo</i> de <i>M. anisopliae</i> en el control de <i>R. microplus</i>	36

RESUMEN

La garrapata común del ganado genera millonarias pérdidas económicas en todo el mundo, estimándose para Uruguay 45 millones de dólares al año. En nuestro país, su control está legislado y se basa casi exclusivamente en el uso de productos químicos, habiéndose diagnosticado resistencia a todos los productos químicos disponibles en el mercado, excepto al fluazurón. La aparición de resistencia a los garrapaticidas, compromete el éxito de la Campaña Sanitaria por lo que deben buscarse alternativas al control químico. De esta manera se disminuirá el problema de la contaminación ambiental, residuos en carne y sus subproductos, obteniendo un alimento inocuo y seguro para los consumidores. Una de estas alternativas es el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae*, siendo fundamental conocer sus características, ventajas y desventajas para poder darle un uso correcto y eficaz.

En el mundo existen numerosos trabajos con este hongo realizados *in-vitro* pero muy pocos en condiciones *in-vivo*. En nuestro País aun no existen trabajos publicados que reporten la efectividad del hongo contra *Rhipicephalus microplus*.

La presente revisión tuvo como finalidad ampliar y actualizar los conocimientos sobre el uso de *M. anisopliae*. ya que en un futuro cercano, de probarse su eficacia en nuestras condiciones de campo, deberá ser tenida en cuenta por todos los profesionales veterinarios del Uruguay y por las autoridades del Ministerio de Gandería Agricultura y Pesca (MGAP) para incluirla en el control de *R. microplus*

Se realizaron búsquedas bibliográficas principalmente en Google Académico, PubMed, Timbó, entre los años 1997 a 2018. Se incluyeron como principales palabras claves: hongo entomopatógeno, control biológico, *M. anisopliae*, *R. microplus*. Como criterio de inclusión sólo incorporaron trabajos que tuvieran como mínimo, 3 repeticiones y 3 réplicas con un nivel de significación de $\alpha=0,05$, y todos los trabajos *in vivo*.

En la presente revisión se discuten las ventajas y desventajas del uso de *M. anisopliae* para el control de la garrapata y su posible aplicación en nuestro medio.

ABSTRACT

The cattle tick generates millionaire economic losses in the whole world. Uruguay has an estimated 45 million dollars of losses per the year. In our country, its control is legislated and is based almost exclusively on the use of chemical products, having been diagnosed resistance to all the chemical products available in the market, except fluazuron. The emergence of resistance to ticks, compromises the success of the Sanitary Campaign so that alternatives to chemical control should be sought. This will reduce the problem of environmental pollution, waste in meat and its by-products, obtaining safe food for consumers. One of these alternatives is the use of the entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae*, and it is fundamental to know its characteristics, advantages and disadvantages to be able to use it correctly and effectively.

In the world there are numerous works with this fungus made *in-vitro* but very few in *in-vivo* conditions. In our country there are still no published works that report the effectiveness of the fungus against *Rhipicephalus microplus*.

The purpose of this review was to expand and update the knowledge on the use of *M. anisopliae* since in the near future, if proven effective in our field conditions, it should be taken into account by all veterinary professionals in Uruguay and by the authorities of MGAP to include it in the control of *R. microplus*

Bibliographic searches were carried out mainly in Google Scholar, PubMed, Timbó, between 1997 and 2018. The main keywords were: entomopathogenic fungus, biological control, *M. anisopliae*, *R. microplus*. As an inclusion criterion, they only incorporated works that had at least 3 repetitions and 3 replicates with a level of significance of $\alpha=0.05$, and all *in-vivo* work.

In the present review the advantages and disadvantages of the use of *M. anisopliae* for the control of the tick and its possible application in our environment are discussed.

1. INTRODUCCIÓN

La “garrapata común del ganado” (*Rhipicephalus microplus*) genera una parasitosis considerada de las más importantes del ganado bovino a nivel mundial, principalmente en regiones tropicales y subtropicales (FAO, 2004). Sus principales acciones patógenas son la hematofagia, la transmisión de hematozoarios agentes de la Tristeza Parasitaria Bovina (*Babesia bovis*, *B. bigemina* y *Anaplasma marginale*) y daños en el cuero (Núñez y col., 1982) a lo que se suman costos que involucran los tratamientos sanitarios.

R. microplus se clasifica taxonómicamente dentro del Phylum Arthropoda, Clase Arachnida, Orden Acarina, Familia Ixodidae. Esta garrapata fue introducida desde regiones de la India hacia áreas de Asia, África, Oceanía y gran parte de América del sur y México (Estrada Peña y col., 2006), abarcando principalmente la zona entre paralelos de latitud 32°N y 35°S (Núñez y col., 1982). Su ciclo es monofásico, ya que su único hospedero es el bovino, sobre el cual cumple su fase parasitaria (Guimarães y col., 2001) y tiene estadios extra-parasitarios que se dan en el ambiente.

Estudios epidemiológicos llevados a cabo en nuestro país (Nari y col., 1979; Cardozo y col., 1984; Cuore y col., 2012) determinaron la existencia de 2,5 a 3 generaciones por año con interrupción de la fase no parasitaria en el invierno, pudiendo durar ésta entre 7 y 9 meses.

Uruguay, cuya actividad económica principal es la ganadería, cuenta con un stock vacuno de 11.732.000 (INAC, 2017), se han estimado pérdidas económicas anuales entre 32,8 millones de dólares (Ávila, 1998) y 45 millones de dólares (Muzio, 2006).

Debido a las millonarias pérdidas causadas por la garrapata, tanto mundiales como nacionales, se han desarrollado estrategias de control y de erradicación basadas, la mayoría de ellas, en el uso de ixodicidas químicos.

En la historia de nuestro país, el combate de la garrapata comienza en el año 1910 en forma indirecta con la Ley 3.606 donde se declara la erradicación de la Tristeza Parasitaria. Posteriormente en el año 1940 se aprueba la Ley 9.965 que declara obligatoria la erradicación de la garrapata, habiendo desde entonces varias reglamentaciones, hasta que el 17 de abril del 2008 se declara de interés nacional la lucha contra la garrapata *Boophilus microplus* (garrapata común del bovino) en el marco de la Ley N° 18.268, cuyas principales medidas de control se basan en el tratamiento garrapaticida. Sin embargo, durante la última década, se detectaron poblaciones de garrapatas resistentes a la mayoría de los principios activos utilizados, como también poblaciones multi-resistentes (Cuore y col., 2017).

Esta situación de resistencia a ixodicidas en el país determina una gran dificultad para cumplir con los planes de control y erradicación estipulados en la Campaña Sanitaria. Para hacer frente a estas dificultades se deben hallar y aplicar alternativas basadas en el Manejo Integrado de Plagas (MIP), el cual se fundamenta en el conocimiento de la epidemiología del parásito, así como la inclusión de otras medidas de control no químico al control químico existente (control biológico, selección de bovinos resistentes, control físico, vacunas). En el caso de la garrapata se debe buscar la integración de las medidas apropiadas que disminuyan las poblaciones al mínimo tolerable, reduciendo los riesgos de intoxicación para la salud humana y de contaminación ambiental, debiendo ser también económicamente

justificable (FAO, 1998). Obviamente, dentro del marco legal de nuestro país, el MIP podría ser aplicable, únicamente, en aquellas Zonas de Control y no en las de Erradicación.

Dentro de los controles biológicos se halla el uso de hongos entomopatógenos, microorganismos que infectan y matan específicamente insectos y artrópodos, siendo la mayoría inocuos para plantas, otros animales y para el ser humano. Aunque estos hongos son encontrados en la naturaleza, rara vez están en niveles suficientes para prevenir las pérdidas económicas causadas por la plaga (Abrol, 2013).

Existen más de 700 especies de hongos entomopatógenos, siendo los más estudiados y con resultados más promisorios: *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*. Hay muchas publicaciones al respecto, pero la mayoría de ellas están relacionadas a trabajos *in vitro*, habiendo muy pocos trabajos realizados a campo.

M. anisopliae es un hongo filamentoso que posee una amplia variedad de hospederos y fue reconocido como potencial candidato para el uso de control biológico de plagas agrícolas en 1880 (Frazzon y col., 2000).

En algunos trabajos experimentales en los que se buscó evaluar la aplicabilidad de *M. anisopliae* se vio que causaba alta mortalidad de teleóginas de *R. microplus* en el laboratorio (Frazzon y col., 2000). En otros trabajos realizados a campo en los que se contempló la compatibilidad de la cepa del hongo utilizada y aplicación en horas de la tarde (para minimizar efectos de rayos UV-B) (Braga y col., 2001) se obtuvieron muy buenos resultados en cuanto a la reducción de la carga parasitaria (Alonso Diaz y col., 2007; Webster y col., 2015). También hay experiencias favorables al combinar el uso de hongos entomopatógenos con ixodicidas químicos ya que en algunos casos poseen sinergismo (Bahense y col., 2006; Webster y col., 2015; Webster y col., 2017). Existen numerosas cepas las cuales poseen diferente virulencia, y a su vez, la misma se ve incrementada al realizar pasajes por la plaga blanco (Frazzon y col., 2000).

Aunque existen numerosos trabajos experimentales *in-vitro* con buenos resultados, hay pocos realizados *in-vivo*. Este hongo puede ser muy benéfico para el control de la garrapata, en particular, en nuestro país. Por dicha razón, es sustancial conocer cómo actúan estos hongos, su forma de críación y reproducción, así como sus resultados en el control de la garrapata. Es importante recabar esta información para que pueda ser aplicada con éxito en Uruguay.

La revisión propuesta busca compilar y analizar los trabajos realizados más recientemente con *M. anisopliae*, sobre todo aquellos de aplicación en campo, con la finalidad de ver sus ventajas y desventajas y el potencial de aplicación práctica en Uruguay.

2. OBJETIVO

Realizar una revisión de bibliografía sobre el uso del hongo entomopatógeno *Metarhizium anisopliae* asociada al control biológico de la garrapata común del ganado, *Rhipicephalus microplus*.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se basó en una revisión bibliográfica (1997-2017), utilizando bibliografía nacional, regional e internacional. Para esto se utilizó la plataforma de búsqueda del Timbó (<http://www.timbo.org.uy/>), Scielo Uruguay y Scielo Brasil (<http://www.scielo.edu.uy/scielo.php>, <http://www.scielo.br/?lng=es>), PubMed (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed), fuentes bibliográficas de bibliotecas de la UDELAR y Google Académico.

También se consultaron páginas web de organismos como Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura <http://www.fao.org/home/en/> y del MGAP <http://www.mgap.gub.uy/>.

Búsquedas realizadas en Google Académico arrojaron 24.700 resultados en búsquedas de *M. anisopliae* y 1780 resultados de trabajos combinando *M. anisopliae* y *R. microplus* (junio de 2018). Debido a tan vasta bibliografía, se utilizaron criterios de inclusión para los estudios *in vitro*. Sólo se consideraron aquellos trabajos con tres o más réplicas y por lo menos tres repeticiones, y con un nivel de significación de $\alpha=0,05$. En el caso de los trabajos con bioensayos *in vivo*, se incluyeron todos debido a que eran muy pocos.

Las palabras claves más usadas fueron: **entomopatógeno, *Metarhizium anisopliae*, garrapata, *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*, control biológico.**

Para poder comprender mejor la acción del hongo sobre la garrapata, se ha realizado una breve descripción de su ciclo y biología, para posteriormente, profundizar en la acción entomopatógena de *M. anisopliae*.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. *Rhipicephalus microplus*

4.1.1. Generalidades

Las garrapatas (Acari: Ixodida) son ectoparásitos hematófagos relativamente grandes cuyos hospedadores son variadas especies de vertebrados. Existen en el mundo 850 especies descritas las cuales se dividen en 3 familias: Ixodidae (duras), Argasidae (blandas) y Nuttalliellidae (Bates, 2012).

Boophilus microplus (Canestrini, 1888), actualmente *R. microplus* (Murrell y Barker, 2003), es llamada vulgarmente "garrapata común del ganado".

Se extendió desde su origen, el sudeste asiático, hacia las áreas tropicales y subtropicales (Figura 1) a las que el ganado era transportado comercialmente, distribuyéndose hacia el este y sudeste de África, Madagascar, América del Sur, América central, norte y noreste de Australia (Wharton, 1974).

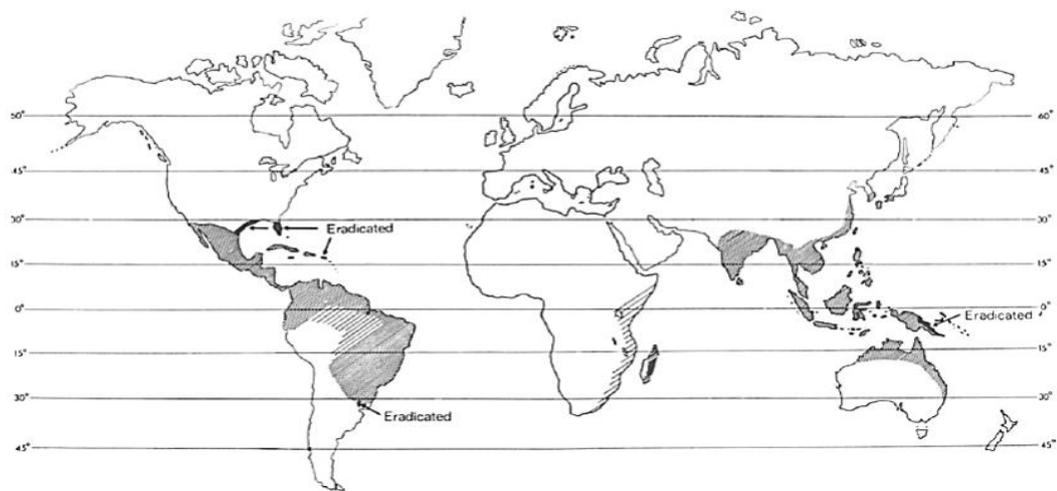


Figura 1. Distribución mundial de *R. microplus* - Wharton, R. H. 1974

4.1.2. Biología

R. microplus es una garrapata de un solo huésped (ciclo monoxeno). Pertenece a la familia Ixodidae (garrapatas duras) ya que poseen un engrosamiento en la cutícula dorsal: el escudo. Esta cutícula (Figura 2) que es la capa más externa, actúa como barrera primaria de protección y también regula, entre otras cosas, el movimiento de agua. Es secretada por la epidermis y consiste de capas de lípidos, proteínas y quitina (Hackman, 1982).

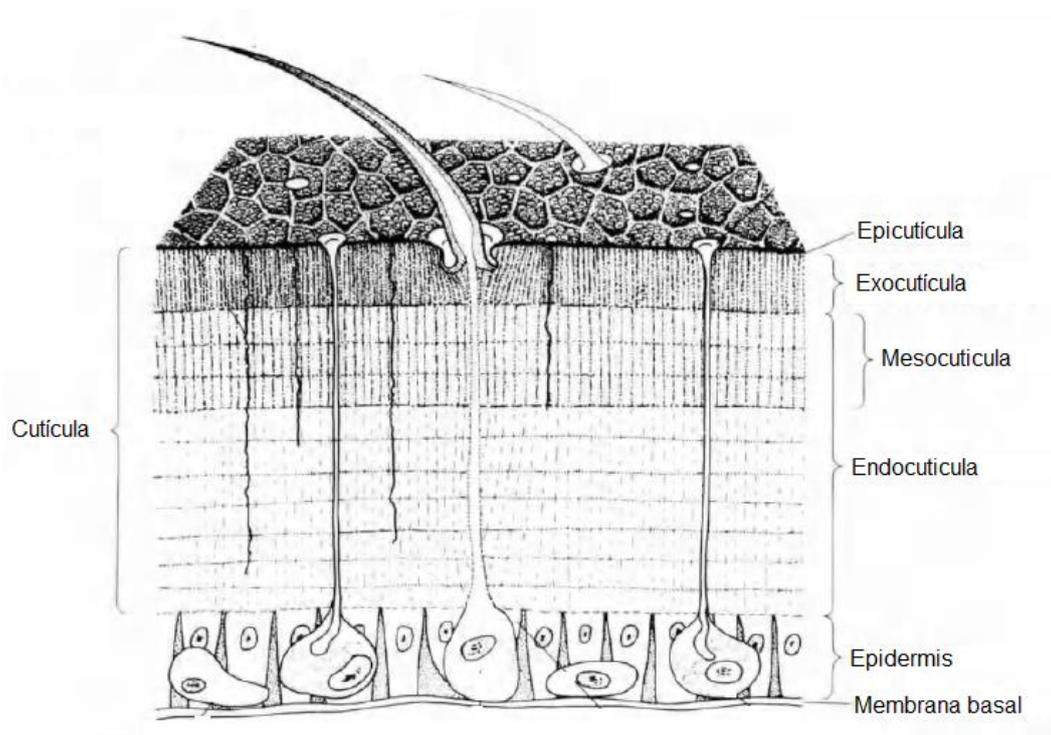


Figura 2. Diagrama de la cutícula de *R. microplus*. Modificado de Hackman, 1982

Se ha adaptado perfectamente a su hospedador principal, el bovino, aunque puede ser visto parasitando otras especies de vertebrados (equinos, ovinos, cérvidos). Su ciclo biológico comprende las fases parasitaria y extra-parasitaria (Figura 3).

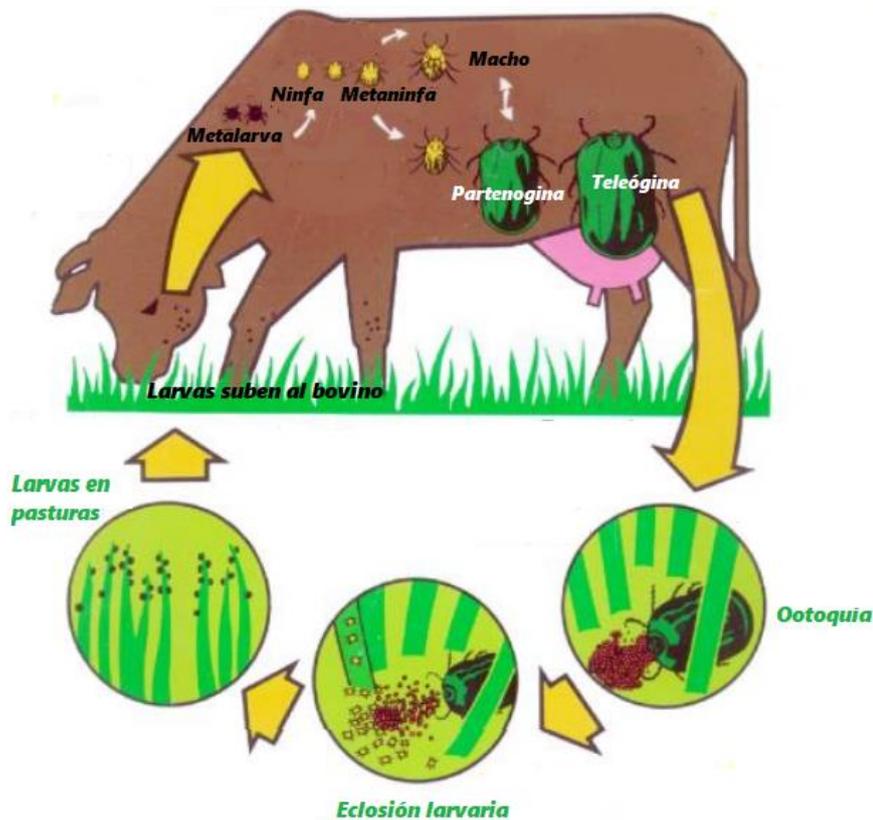


Figura 3. Ciclo de *R. microplus*. Adaptado de <https://www.daf.qld.gov.au>

La fase parasitaria, comienza cuando la larva presente en las pasturas detecta y sube a un bovino. La misma comienza a alimentarse y muda a ninfa entre los 7 - 9 días del ciclo, aproximadamente. Luego la ninfa muda nuevamente para transformarse en macho o hembra adulto a los 13-15 días. La hembra pasa por la fase de partenogina (4-6mm) a los 17-18 días del ciclo y luego teleógina (7-13mm). Las partenóginas son las que comienzan a alimentarse y esperan a ser fecundadas por un macho (Núñez y col., 1982). Los machos, que pueden vivir hasta 40 días, son muy móviles y se desprenden varias veces para poder fecundar a varias hembras las cuales permanecen fijas succionando sangre. Previo a su caída al suelo, la teleógina succiona grandes cantidades de sangre en pocas horas. Luego, la teleógina cae al suelo, a los 21-23 días del ciclo, dando inicio a la fase extra-parasitaria, cuya duración es variable según las condiciones climáticas. La ovipostura puede dar de 1000 a 4500 huevos de los que eclosionarán larvas que contaminarán las pasturas y recomenzarán el ciclo (Núñez y col., 1982).

4.1.3. Perjuicios

Por su forma de alimentación, la hematofagia, *R. microplus* genera daño directo al succionar sangre y mediante la acción traumática de sus piezas bucales. Una teleógina puede llegar a succionar 0,3 a 5 ml durante su ciclo, produciendo anemia, debilidad y merma en la producción, principalmente por la disminución en la ganancia de peso (Núñez y col., 1982). También causa daños en el cuero, depreciando el valor del mismo.

Indirectamente, genera su perjuicio mediante la transmisión de dos protozoarios (Orden: Piroplasmida) *Babesia bovis*, *B. bigemina* y una rickettsia *Anaplasma marginale*. Estos tres agentes son causales de la Tristeza Parasitaria Bovina, enfermedad que cursa con fiebre, anemia y en algunos casos ictericia y hemoglobinuria como síntomas principales. Como resultado ocurren mermas en la producción de leche, carne, abortos, mortalidad y gastos de tratamiento. Al impacto indirecto se suman las pérdidas por tratamientos sanitarios contra la garrapata.

4.2. Situación del control de *R. microplus* en Uruguay

Uruguay se localiza entre los paralelos 30° y 35° de latitud Sur y los meridianos 53° y 58° de longitud oeste, en la zona templada del hemisferio sur. Dando estas características climáticas la existencia de 2,5 a 3 generaciones de garrapata por año (Cardozo y col., 1984). Su principal actividad económica es la agro-ganadera, estando posicionado como uno de los 10 principales exportadores de carne bovina del mundo. En 2017 el stock de vacunos fue de 11.732.000 cabezas y fueron exportadas 243.666 toneladas de carne bovina, generando ingresos de 1.202,6 millones de dólares (INAC). Por lo tanto, un país tan dependiente de la actividad ganadera bovina se va a ver gravemente afectado frente a cualquier situación o patología que genere un desbalance en el stock vacuno. La vigilancia sanitaria es de vital importancia para evitar o disminuir el impacto de las enfermedades en el stock pecuario del país.

Una de las parasitosis más importantes es la generada por la garrapata común del ganado. Por lo que desde el año 1910 hasta hoy se han creado y modificado planes y estrategias para su control y erradicación.

En la actualidad bajo el marco de la Ley 18.268 se declara de interés Nacional la lucha contra *R. microplus* y obligatoriedad de denuncia. La Autoridad Sanitaria del MGAP (Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca) ha establecido Zonas Libres y Zonas de Control (Figura 4) según los factores epidemiológicos, ecológicos y geográficos, las cuales han ido variando con el tiempo. Según el Decreto N.º 9/010 Reglamentario de la Ley N.º 18.268 de 17/04/2008, también se han definido áreas de alto riesgo. Las mismas son áreas o predios determinados por la Autoridad Sanitaria, con diferentes niveles de riesgo epidemiológico según su ubicación geográfica, tipo de explotación, grado de infestación por garrapata, resistencia a los acaricidas, enfermedades asociadas al ectoparásito, perjuicios que pueda ocasionar a terceros, antecedentes sanitarios entre otros.

Actualmente la Zona Libre comprende a los Departamentos de Montevideo, Canelones, Florida, San José, Flores, Colonia, Soriano, Durazno (excepto 7° seccional policial), y la Zona de Control a Artigas, Rivera, Treinta y Tres, Salto, Tacuarembó, Maldonado, Paysandú, 7° seccional policial de Durazno, Rocha, Río Negro, Cerro Largo y Lavalleja. Esta división permite el trato diferenciado y el control del pasaje de una zona a otra tomando las medidas precautorias establecidas por Ley para el despacho de tropa.



Figura 4. Zonas epidemiológicas de garrapata. Fuente: MGAP, 2009.

De acuerdo a lo establecido en la Ley N.º 18.268 del 2008 se deberá realizar control de la parasitosis en la mayoría del territorio exceptuando los casos que ocurran en la Zona Limpia y en la Zona Endémica o de Control, cuando existan poblaciones resistentes a principios activos aún no diagnosticadas en el país, donde se deberá aumentar el número de tratamientos para lograr la erradicación (Cuore y col., 2017).

Históricamente, en nuestro País el método de elección ha sido la aplicación de acaricidas químicos a ciertos intervalos buscando una eliminación completa de la garrapata. Los productos autorizados para uso en nuestro País se encuentran en el listado de garrapaticidas del Dpto. de Control de Productos Veterinarios de la DILAVE, así como los intervalos de aplicación para la eliminación completa de la garrapata.

El método de control químico ha ido perdiendo eficacia, lo que representa un alto riesgo para la productividad.

El principal factor es la generación de resistencia hacia los principios activos además la presencia de residuos, lo que limita la exportación de productos a los mercados, cada vez más exigentes en materia de inocuidad alimentaria.

Se define como resistencia, “la habilidad de una población, en este caso de artrópodos, a tolerar una dosis de los principios activos que serían letales para la mayoría de individuos en una población normal (susceptible) de la misma especie” (Stone, 1972). Es un fenómeno genético y hereditario, de ahí su gravedad. Ocurre una mutación espontánea en la población que es seleccionada en el tiempo por el uso de principios activos. Hay un aumento en la frecuencia de genes en esa población que se refleja en un aumento significativo del número de individuos que necesitan de una dosis superior para morir y estos individuos sobrevivientes se lo transmiten a su progenie. En la mayoría de los casos los genes que confieren la resistencia están presentes, debido a esa preselección natural, pero en niveles muy bajos para ser detectados (FAO, 2004). Los mecanismos principales de resistencia son insensibilidad en el sitio blanco y aumento en la desintoxicación metabólica (Guerrero y col., 2012).

En la última década, en Uruguay, se han sumado al diagnóstico de resistencia de la garrapata a los organofosforados y piretroides sintéticos (Cardozo, 1995; Fiel-Nari, 2013) el diagnóstico a moléculas acaricidas más nuevas y de uso más reciente en el país: diagnóstico de resistencia a fipronil (Cuore y col., 2007, Castro-Janer y col., 2009, 2010), resistencia a ivermectina (Castro-Janer y col., 2011) y amitraz (Cuore y col., 2012). Recientemente se han encontrado poblaciones multirresistentes (Cuore y col., 2017). Actualmente el único principio activo para el que no se ha diagnosticado resistencia en el país, es el fluazurón, aunque ya existe reporte en Rio Grande do Sul, Brasil (Reck y col., 2014). Como método paliativo frente a esta situación, el MGAP propuso la metodología de tratamientos generacionales, en la que se plantea la rotación del grupo químico del acaricida entre generaciones.

Es de destacar que la presencia de garrapatas resistentes compromete el éxito de la campaña sanitaria por lo que es fundamental buscar otras alternativas de control.

4.3. Métodos de control

El control de *R. microplus* es necesario por dos razones principales, evitar la pérdida de peso por el efecto directo de la garrapata y prevenir la infección con agentes de Tristeza Parasitaria Bovina. Teóricamente, el control de *R. microplus* debería ser relativamente sencillo, ya que cumple todo su ciclo en un solo hospedero.

Los métodos de control se pueden clasificar en químicos y no químicos.

4.3.1. Control químico

Consiste en el uso de productos químicos en determinado intervalo de tiempo donde se pretende eliminar la garrapata. Existen varios productos comerciales, pero todos se formulan en base a 6 grupos químicos principales: organofosforados (OF), piretroides sintéticos (PS), lactonas macrocíclicas (LM), amidinas (amitraz), fenilpirazoles (fipronil) y benzoilureas (fluazurón).

Es importante conocer el mecanismo de acción de las distintas moléculas para disminuir la presión de selección ya que se sabe que grupos químicos diferentes, pero con el mismo mecanismo de acción, favorecen la aparición de resistencia.

El mecanismo de acción de los OF es la inhibición de la acetilcolinesterasa, de los PS la modulación de los canales de sodio, de la LM, actúan sobre el receptor GABA

aumentando la permeabilidad de la membrana celular al cloro dando hiperpolarización y parálisis, el amitraz es antagonista de los receptores de la octopamina, fipronil es inhibidor del GABA, actúa bloqueando estos receptores regulados por cloro produciendo hiper-excitabilidad nerviosa, y el fluazurón es un inhibidor de la síntesis de quitina (Rodríguez-Vivas y col., 2010).

4.3.2. Control no químico

4.3.2.1. Razas resistentes

En un trabajo realizado en Australia en 1978 por Utech, se vio que *Bos indicus* era la raza más resistente, seguida por sus cruza y por último *Bos taurus* con baja y muy baja resistencia frente a infestaciones. Dentro del ganado lechero la raza Jersey es más resistente que la Holando (Núñez y col., 1982).

4.3.2.2. Inmunológico (vacunas)

Los intentos de desarrollar una vacuna contra *R. microplus* se basaron en trabajos en los que se observó que frente a infestaciones repetidas ocurría una reacción de hipersensibilidad y respuesta humoral, lo que evidenció la participación de anticuerpos frente al desarrollo de la inmunidad. (Willadsen y col., 1978). Por lo que en posteriores infestaciones el número de garrapatas era cada vez menor. Se ensayaron vacunas con antígenos provenientes de garrapatas completas o de diferentes partes de las mismas, siendo el antígeno oculto Bm86, una glicoproteína intestinal, el más efectivo. Estas investigaciones dieron lugar a productos comerciales bajo los nombres de TickGARD™ (Australia) y Gavac™ (Cuba). Su uso sigue siendo controvertido ya que no demostraron grandes porcentajes de eficacia, 56% en comparación con los no tratados (Jonsson y col., 2000).

La búsqueda de antígenos continúa. Sin embargo, hasta ahora no se han conseguido porcentajes de eficacia relevantes (Akhtar y col., 2011). Por dicha razón, otros trabajos proponen el desarrollo de vacunas multiantigénicas, las cuales serían más eficaces por actuar frente a diferentes tipos de antígenos (Parizi y col., 2012).

4.3.2.3. Control Físico

El control físico ha sido estudiado desde el siglo pasado y frente a la dispersión de la quimiorresistencia ha sido retomado en el presente siglo. De Jesus (1934) observó los efectos hostiles de pasturas en base a *Melinis minutiflora* frente a *R. annulatus*, ya que su follaje posee pequeños pelos y glándulas que secretan un líquido pegajoso con un olor dulce (CABI). Ésta y otras especies de pasturas estudiadas como *Andropogon gayanus* (Thompson y col., 1978) o *Panicum maximum* (Morel y col., 2017) poseen la característica de repeler las larvas, dificultar su movilidad y favorecer su desecación y muerte.

También se mencionan en la bibliografía métodos de eficacia no comprobada y poco sencillos como por ejemplo la quema de pastos para eliminar la población en su fase extra-parasitaria (Flechtmann, 1973) y la remoción manual sobre el animal (Muhammad y col., 2008). La quema de pasturas es un manejo muy extendido en productores de regiones tropicales, con un impacto negativo para el ambiente.

4.3.2.4. Control biológico

Partiendo de la premisa de que todos los organismos tienen un enemigo natural el control biológico se ha definido como la “reducción de la densidad...de un parásito mediante uno o más organismos, lograda de manera natural o a través de la manipulación del ambiente, del hospedador o del antagonista natural o por la introducción masiva de uno o más antagonistas” (Baker y Cook,1974) o como “la introducción intencional de un biológico, generalmente co-evolucionado, para el establecimiento permanente y el control de plagas a largo plazo” (Eilenberg y col., 2001).

La legislación de nuestro País entiende como control biológico “...cualquier enemigo natural, antagonista o competidor u otro organismo utilizado para el control de plagas” y hasta la fecha sólo está regulado el control biológico para algunas plagas agrícolas (Decreto N° 170/007).

Los trabajos iniciales de control biológico en América Latina fueron contra plagas de los cítricos, a comienzos del siglo veinte, pero luego de la segunda guerra mundial el interés decayó frente al mayor desarrollo de plaguicidas químicos.

Sin embargo, en la actualidad, en varios países se ha retomado el interés por el control biológico, sobre todo como una herramienta más del MIP (Altieri y col., 1989).

Poseen como ventaja el ser compatibles con otras formas de control, tener espectro limitado frente a determinado tipo de patógenos y ser, en comparación con los grupos químicos, inocuo para el ambiente. Aunque esto no quita la necesidad de realizar estudios sobre sus potenciales riesgos ya que se trata de la aplicación masiva de un enemigo natural y existe la probabilidad de que utilice organismos alternativos no-blanco.

Un organismo ideal para utilizar en control biológico debería ser inocuo frente a la flora y fauna no patógenas (alta especificidad), eficaz a concentraciones bajas, compatible con otros métodos de control, apto para formulaciones comerciales y sobre todo, de fácil reproducción en el laboratorio.

Existen varios microorganismos entomopatógenos: virus, bacterias, nematodos, protozoarios y hongos; como también organismos predadores: artrópodos (arañas, moscas, hormigas, escarabajos), anfibios, reptiles y aves (Samish y Rehacek, 1999).

Los agentes de control biológico se pueden clasificar en parásitos y parasitoides, depredadores y patógenos. Los parásitos atacan una sola presa u hospedero debiendo mantenerlo con vida para vivir a sus expensas, mientras que los parasitoides acaban con la vida de su hospedero. Los depredadores difieren de los parasitoides porque atacan a varias presas durante su vida y suelen ser de mayor talla, pero no son tan eficientes como los primeros. Dentro de los patógenos, en este caso entomopatógenos, existen bacterias, hongos, virus, nemátodos y protozoos. Su mecanismo de acción es mediante ingestión y penetración a través del tubo digestivo, o por contacto (Badii y Abreu, 2006).

Por lo tanto, el control biológico no busca erradicar totalmente las plagas, sino regularlas/controlarlas (disminuir la población) antes de que las pérdidas rebasen el umbral económico (Carrillo-Rayas y Blanco-Labra., 2009), debiendo ser aplicado en un plan de manejo integrador como el MIP.

4.4. Hongos entomopatógenos

En la naturaleza existen especies de hongos que poseen acción patógena sobre los artrópodos, cuyos efectos pueden reducir naturalmente a las poblaciones (Estrada-Peña y col., 1990). Existen más de 700 especies de hongos entomopatógenos, de las cuales 58 han sido encontradas infectando varias especies de artrópodos (Chandler y col., 2000).

Dentro los más estudiados están *Beauveria* sp y *Metarhizium* sp pertenecientes al Phylum Ascomycota. Estos poseen mecanismos de reproducción tanto sexual como asexual. La reproducción sexual, mediante la formación de ascas raramente se produce o nunca se produce. Mientras que la reproducción asexual ocurre mediante la formación de esporas asexuales, los conidios (Figura 5C), desde el conidióforo (Figura 5B) el cual se ubica en los extremos de las hifas. Pueden darse diferentes formas de propagación según las condiciones del medio, como blastosporos (forma vegetativa) (Figura 5A), conidios aéreos o conidios sumergidos (Vega y col., 2012). Es muy importante conocer los tipos de propágulos, ya que de esto dependerán los futuros estudios para su uso.

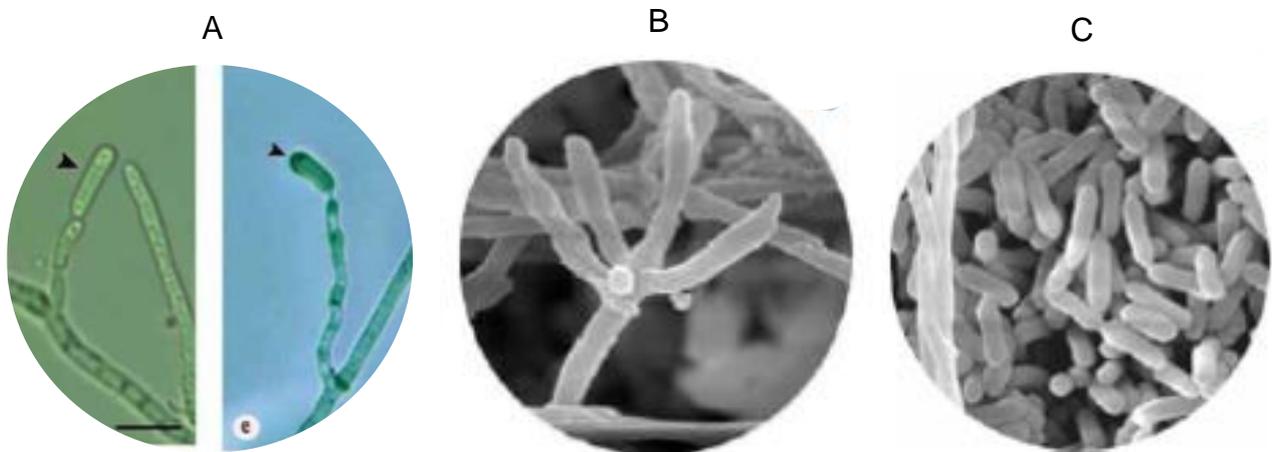


Figura 5. *M. anisopliae*: A) Blastosporo. B) Conidióforo. C) Conidios.
Fuente: Modificado de: Arruda y col., 2005 y Moslim y Kamarudin, 2014.

Poseen una amplia distribución geográfica, rango de hospederos, adaptabilidad al medio y capacidad de causar brotes enzoóticos y epizoóticos (Alves y col., 1998). Además, son relativamente sencillos de producir y formular (Vega y col., 2009). Sin embargo, su eficacia se puede ver limitada debido a que son dependientes de factores medioambientales como la temperatura, humedad relativa y radiaciones UV.

Algunos trabajos se han enfocado en estudiar la eficacia de estos hongos contra otros parásitos de importancia veterinaria como la mosca *Stomoxys calcitrans* (Watson y col., 1995; Cruz y col., 2015) y también contra dípteros de importancia sanitaria mundial como el mosquito *Aedes aegypti* (Manisha y col., 2013; Wondmeneh y col., 2018). En Uruguay hay trabajos con hongos entomopatógenos sobre todo contra insectos que son plagas agrícolas (Corallo, 2016).

De Faria y Wraight (2007) realizaron un trabajo con el objetivo de listar y clasificar de forma completa e internacional los tipos de formulaciones comerciales de micoinsecticidas y micoacaricidas. El mismo contempla 171 productos, de los cuales un 43% originario es de Sudamérica y un 33,9% es formulado en base a *M. anisopliae*. Del total de los productos, 28 se comercializan como acaricidas.

Metarhizium anisopliae es uno de los hongos más comúnmente utilizados para el control de artrópodos (Leger y col., 1988; Bittencourt y col., 1994; Kaaya y col., 1995; Kirkland y col., 2004; Wekesa y col., 2006; López y col., 2009; Santi y col., 2010; Fernandes y col., 2012; Webster y col., 2015). El mismo ha estado bajo estudio desde hace más de 100 años (Roberts y St Leger, 2004).

4.5. *Metarhizium anisopliae*

Fue primariamente descrito por el microbiólogo ruso Metschnikoff (1879), uno de los primeros en prestarle atención como posible agente de control biológico contra la plaga *Anisoplia austriaca*, un escarabajo que estaba causando grandes pérdidas en los cultivos de cereales. Metschnikoff se refirió a el hongo como la “muscardina verde”, llamándolo *Entomophthora anisopliae*. Posteriormente, Sorokin (1883) lo clasifica como *Metarhizium anisopliae* (Zimmerman, 1993).

4.5.1. Biología

Es patógeno de un amplio grupo de artrópodos, se lo puede encontrar en los suelos, la rizófora de plantas, cadáveres de artrópodos y como saprófito y parásito de varios insectos y garrapatas (Schrank y Vainstein., 2010).

M. anisopliae es muy diverso genéticamente. Para llegar a la identificación del mismo existen claves micro y macro morfológicas (Brady,1979) como también técnicas más precisas de caracterización molecular. Fernandes y col. (2010) en un trabajo sobre caracterización de especies de *Metarhizium* mencionan que las colonias sembradas en medio PDA (Papa dextrosa agar) son aterciopeladas, miden >70 mm, predominantemente de color verde oscuro, verde claro, blanco o marrón y la gran mayoría de aislamientos presentaban un borde blanco de espesor variable (Figura 6). En un comienzo son de color blanco y se tornan amarillentas durante el desarrollo de los conidios para pasar a verde hacia los 10-14 días, con la maduración de los conidios (Bischoff y col., 2009). *M. anisopliae* también se

desarrolla bien en SDA (Sabouraud dextrosa agar). El examen microscópico se basa en morfología de conidios y conidióforos.

La especie posee cuatro variedades que forman un complejo: *M. anisopliae* var. *anisopliae*, *M. anisopliae* var. *majus*, *M. anisopliae* var. *acridum* y *M. anisopliae* var. *lepidiotae*. Las mismas se diferencian por el tamaño de sus conidios y por la especificidad de hospederos, teniendo mayor espectro de hospederos *M. anisopliae* var. *anisopliae* (Bischoff y col., 2009).

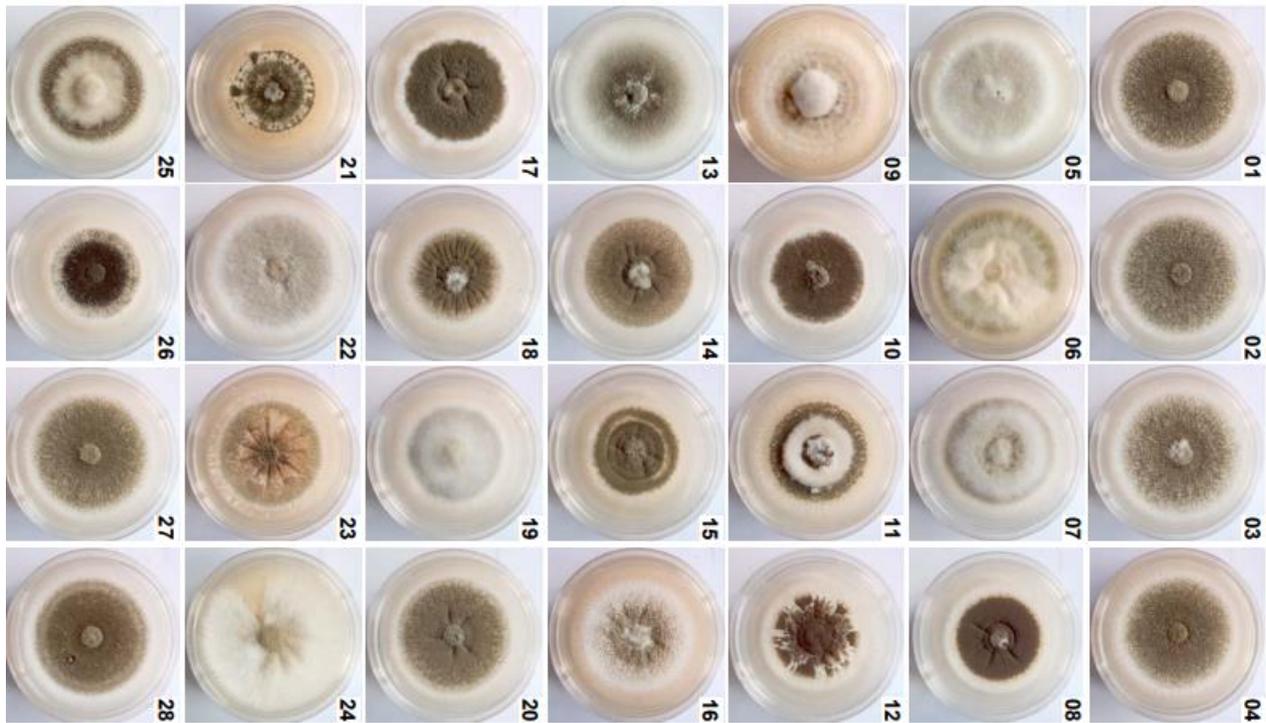


Figura 6. Morfología de colonias de diferentes cepas de *M. anisopliae*. Fuente: Arruda y col., 2005.

Al existir una alta variabilidad genética, hay numerosos aislados y cepas (Figura 6) con diversos grados de virulencia, especificidad, capacidad de conidiación y resistencia. Por lo tanto, se deben realizar ensayos para seleccionar la cepa más virulenta contra el hospedero específico que queremos controlar (Zimmermann, 1993; Webster y col., 2017).

Las condiciones ambientales abióticas óptimas para el desarrollo son principalmente la temperatura, entre 25-30°C, ya que ésta es determinante en los tiempos de crecimiento, esporulación y germinación; humedad relativa, entre 85 y 100% y la menor exposición a radiaciones UV-A y sobre todo a UV-B ya que los conidios son susceptibles a las mismas (Fargues y col., 1997; Ouedraogo y col., 1997; Carrillo-Rayas y Blanco-Labra., 2009). Su forma más importante de dispersión son los conidios (Figura 5C) los cuales se adhieren al exoesqueleto de sus hospederos comenzando así la infección. La forma de infección más común es por contacto directo con el hongo, aunque también existe la transmisión horizontal, de un individuo infectado a uno sano (Gutiérrez y col., 2016).

Las fases del ciclo biológico de *M. anisopliae* son adhesión, germinación, penetración, colonización, muerte y emergencia (Figura 7).

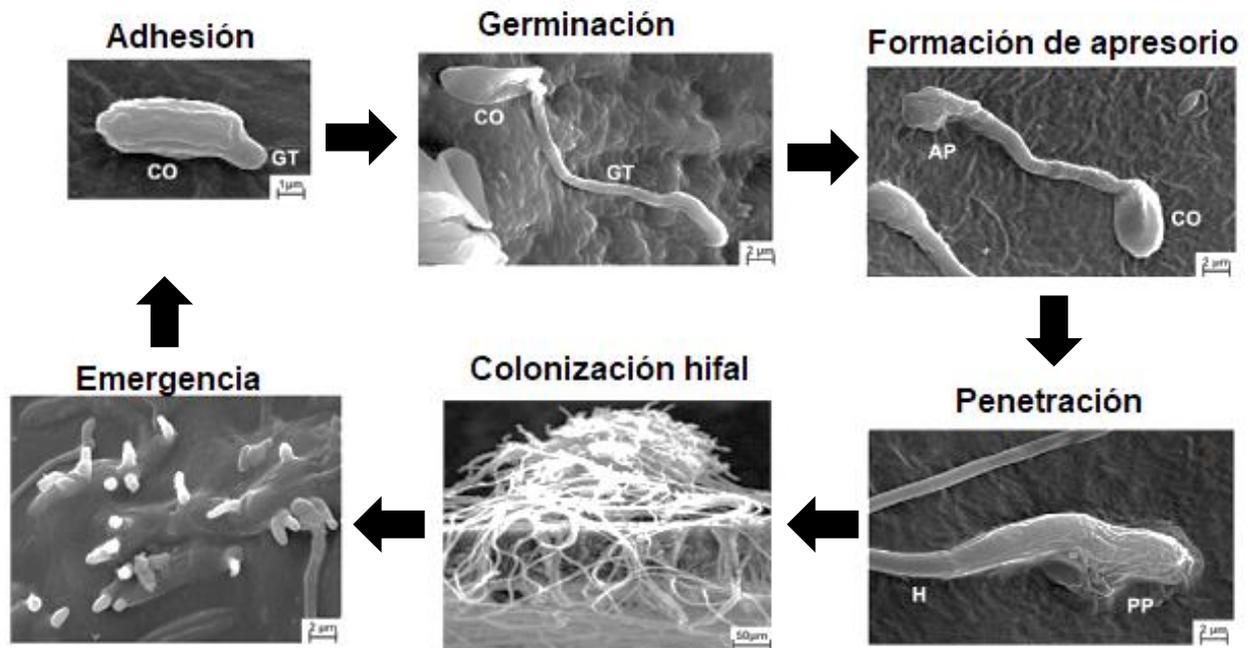


Figura 7. Etapas de infección de *M. anisopliae* hospedero. Fuente: Modificado de Schrank y Vainstein, 2010.

CO: Conidio, GT: Tubo Germinativo, AP: Apresorio, H: Hifa.

La infección comienza cuando una espора toma contacto y se adhiere al tegumento de la plaga (Bittencourt y col., 1995), ayudado por la adhesina MAD1 (Wang y St Leger, 2007). Al no requerir ser ingeridos tienen la ventaja de poder infectar estadios que no se alimentan, como los huevos. Como desventaja, si el parásito está mudando, la germinación se perderá con la muda (Vega y col., 2012).

Generalmente invaden sitios con alta humedad local y poco esclerosados como espiráculos, piezas bucales, o pliegues intersegmentales.

Continúa con la germinación, que da lugar a la formación del tubo germinativo. Para la penetración se ponen en marcha mecanismos mecánicos y enzimáticos. El tubo germinativo forma una estructura llamada apresorio, la cual da fijación y ejerce presión mecánica hacia el interior. Este proceso es coadyuvado por la excreción de enzimas muy importantes ya que actúan destruyendo los principales compuestos de la cutícula: quitina, proteínas y lípidos (Leger y col., 1986). La quimio-elastasa Pr1 es una de las enzimas clave en la penetración (Leger y col., 1988).

Una vez dentro del organismo el hongo desarrolla cuerpos hifales los cuales colonizan la hemolinfa donde comienzan a consumir sus nutrientes. Como metabolitos secundarios se producen unas toxinas, las destruxinas, las que también

son responsables de los efectos patógenos, ya que afectan los procesos de excreción, generan dificultad en la movilización y disminuyen la capacidad de alimentación (Schrank y Vainstein, 2010). Los principales síntomas sobre la garrapata son incoordinación, parálisis, pérdida de sensibilidad y muerte (Alves, 1998).

Al ser hemibiotrófos, continúan viviendo en el cadáver como saprófitos, las hifas invaden órganos internos hasta agotar los nutrientes y luego, en condiciones favorables, emergen y forman nuevamente las esporas (Lemke, 1994) las que podrán diseminarse por el ambiente para recomenzar el ciclo en otros individuos (Araújo, 2017).

Este proceso de infección no pasa desapercibido para el sistema inmune del invertebrado. Aunque existen variaciones en la respuesta inmune según la cepa de *R. microplus*, las mismas poseen varios mecanismos de defensa: químicos, físicos y fisiológicos. Varias reacciones humorales y celulares son iniciadas cuando un patógeno toma contacto con el artrópodo, por ejemplo, la desgranulación celular y la activación en cascada de la pro-fenol-oxidasasa (Webster y col., 2017). Estos mecanismos intentan controlar y eliminar agentes infectivos (Posadas, 2010). También se ha comprobado que las distintas poblaciones de garrapatas tienen una gran variación en cuanto a la susceptibilidad frente al hongo (Perinotto y col., 2012; Webster y col., 2017). Las garrapatas tienden a ser naturalmente más tolerantes a las infecciones fúngicas ya que se sabe que se requieren mayores concentraciones de conidios para alcanzar la mortalidad y a su vez no existen reportes de epizootias naturales (Ángelo y col., 2010; Fernandes y col., 2012). Tal vez ésta sea la causa más limitante para el control de la garrapata.

4.5.2. Producción, selección y mantenimiento.

Para realizar un control en base a *M. anisopliae* se deben preparar grandes cantidades de conidias, que son las que serán aplicadas sobre el animal.

Para la producción masiva se mencionan dos grandes formas, una *in-vivo*, utilizando al artrópodo hospedero y la otra *in-vitro* mediante el uso de medios de cultivo líquidos, sólidos o combinados.

Las ventajas de la primera son el mantenimiento e incremento de la virulencia del hongo, pero con un bajo rendimiento y altos costos de mantenimiento y mano de obra. En cambio, en la producción *in-vitro* se logran obtener grandes cantidades de propágulos en un tiempo relativamente corto y económicamente rentable, pero debiendo utilizar medios que provean fuentes de carbono, nitrógeno, sales minerales y factores de crecimiento, perdiéndose paulatinamente la virulencia tras varios pasajes (Alves, 1998).

En los métodos de producción *in-vitro* se pueden usar medios sólidos, líquidos (fermentación) y líquido/sólido (bifásica).

De los medios sólidos obtendremos conidios. Los más comúnmente usados son las placas con medios de cultivo (PDA o SDA) y el arroz. El utilizar como sustrato sólido al arroz nos permite mayor producción a costos accesibles. El mismo debe ser autoclavado y luego inoculado con la suspensión. Para que ocurra la esporulación se incuban a 26-27°C entre 12 y 16 días. Para separar los conidios del arroz se puede realizar tamizaje o también pueden ser molidos y usado como inerte en la formulación final (Alves, 1998).

Los medios líquidos se utilizan en producciones a grandes escalas y requieren equipamientos más sofisticados para procesos de fermentación. Los mismos permiten la producción de blastosporas, cuerpos hifales, micelios y conidios. La principal ventaja que presentan es que generan elevadas cantidades de biomasa en un pequeño espacio físico y poco tiempo. Un ejemplo de ello es el producto patentado Bio1020® (Alves 1998).

También posterior a la producción en masa se deben hacer controles de calidad para evaluar concentración de conidios (cámara de Neubauer), viabilidad de los conidios (% de germinación en placa PDA), pureza de las UFC y agresividad de la cepa. Los ensayos para verificar la virulencia deben considerar, además de la mortalidad de adultos, datos como producción y eclosión de huevos (Alves, 1998).

Otro factor muy importante a tener en cuenta en el proceso de producción es la sustancia en la cual se van a suspender. Esto determinará la forma de aplicación y dará o no cierta protección a las formas de diseminación.

Las formulaciones líquidas son normalmente a base de agua, aceite o emulsiones. Si el portador para los conidios es agua, debe usarse un agente surfactante, el más mencionado en los trabajos es el Tween 80. Estos se utilizan para reducir la tensión superficial, lo que permite la dispersión de los conidios.

Para seleccionar el más correcto debemos basarnos en el tipo de propágulo que usaremos. Los más comunes, los conidios, son lipofílicos, por lo tanto, se utilizan aceites derivados de vegetales y petróleo. Además, el uso de aceites brinda mejor adhesión a la cutícula y menor efecto evaporativo, en contraste con la formulación del agua (Vega y col., 2012) por lo que aumenta su efecto patógeno (Polar y col., 2005; Leemon y Jonsson, 2008; Camargo y col., 2012; Camargo y col., 2016). La

formulación en aceite es esencial para aplicaciones de volumen ultra-bajo (ULV, gotas de 50 a 100 μm de diámetro). Los volúmenes bajos tienen la ventaja de reducir el peso que debe llevarse en el campo y son ventajosos en áreas donde el agua no está fácilmente disponible.

Sumado al medio que portará los propágulos se menciona el uso de otros aditivos como bloqueantes UV, por ejemplo, el Tinopal® (Butt y Goettel, 2000).

Para el almacenamiento del producto final, Alves y col. (2002) determinaron que en general se puede almacenar el hongo en el propio arroz a -5°C durante un máximo de tres meses. En tanto que esporas cosechadas y mantenidas a 5°C duran 9 meses y si son formuladas en aceite emulsionable compatible duran al menos cuatro meses a temperatura ambiente (alrededor de 25°C).

Como se mencionó previamente, *M. anisopliae* posee una gran diversidad genética, existen diferentes cepas las que varían en su grado de virulencia, capacidad de esporulación, resistencia a condiciones ambientales, rayos UV, pH y especificidad de hospedero (Alves, 1998; Schrank y Vainstein, 2010). Por dicha razón, se sugiere realizar pruebas previas de compatibilidad antes de recomendar su uso para el control a campo (Webster y col., 2017).

Para la selección de la misma se puede partir desde cepas mantenidas en laboratorios o realizar la colecta y aislamiento desde el medio ambiente, tanto del suelo como de artrópodos. Si el hongo ya ha esporulado se puede recuperar por raspaje directamente de la superficie de los cadáveres (previa asepsia de los mismos con hipoclorito de sodio). Si no ha esporulado se puede estimular este proceso utilizando cámara húmeda. Luego se debe aislar y purificar en un medio selectivo como PDA (Alves, 1998). Posteriormente a este paso, es recomendable realizar la reactivación. Esto es hacer un pasaje por el artrópodo, ya que varios autores confirman que este proceso incrementa la virulencia de la cepa (Frazzon y col., 2000; Arruda y col., 2005; Fernandes y col., 2012). Después de la reactivación y antes de la conservación es conveniente realizar una batería de pruebas de calidad. En las mismas se evaluará viabilidad y potencia (Alves, 1998).

La cepa se puede mantener entre 4°C y -20°C en tubos con medio de cultivo y aceite mineral sellados, debiendo repicarse cada dos años. Los mejores y más duraderos métodos de conservación de conidios son la criopreservación en nitrógeno líquido y la liofilización (Butt y Goettel, 2000).

Luego de seleccionada y evaluada la cepa, es ideal tener en cuenta ciertos factores que permitirán la producción y por lo tanto su uso masivo como control biológico. De nada sirve una cepa muy virulenta en el laboratorio si tiene baja conidiación o si no resiste las condiciones a campo ni es rentable su producción masiva.

4.5.3. Bioensayos.

El hongo, al tratarse de un organismo vivo, es influenciado por muchos factores que condicionan su ciclo y evolución. Para lograr un buen control hay que contemplar todas las interacciones hongo-garrapata-ganado-ambiente. Para eso se deben ensayar y probar distintas alternativas y combinaciones para obtener el mayor provecho posible de un método de control biológico. Existen numerosos ensayos realizados *in-vitro* en todo el mundo buscando evaluar la eficacia de diferentes aislados de *M. anisopliae* sobre *R. microplus* (Bittencourt y col., 1994; Frazzon y col., 2000; López y col., 2009; Ojeda-Chi y col., 2010; Quinelato y col., 2012; Ren y col., 2012). Se ha estudiado su acción directa frente a huevos (Figura 8), larvas, hembras ingurgitadas (Figura 9) y también la alteración de los parámetros biológicos e índices reproductivos de las teleóginas. En la Tabla 1 se agrupan diferentes resultados de algunos de los trabajos más relevantes realizados *in-vitro* donde se evalúa la influencia de diferentes variables como: la cepa del hongo, su concentración y combinación con otras cepas, la población de la garrapata, el medio en el que se realiza la suspensión, la etapa evolutiva afectada, etc.



Figura 8. Huevo de *R. microplus* infectado con *M. anisopliae*, Columnas: agregados de conidios. Fuente: Posadas, 2010.

En cambio, existen pocos ensayos realizados a campo (Tabla 2). Entre ellos se encuentran los que aplican los tratamientos en animales estabulados, en animales a campo, y sobre las pasturas. Los ensayos a campo se diferencian de los realizados en boxes principalmente porque el conteo que se realiza no es tan preciso. Además, los boxes generalmente son techados, no incidiendo el sol directamente como lo haría en campo. También al no poder colectarse las teleóginas como se hace en los boxes se corre con la desventaja de que ocurran reinfestaciones que alteren los resultados.

Cabe destacar que en todos los análisis *in-vitro* las condiciones ambientales que se le otorgan a los procesos son reguladas y mantenidas lo más constantes posible,

difícilmente ocurriendo esta constancia en el medio ambiente, quedando esto ejemplificado en el trabajo de Correia y col., (1998). Por ello aun teniendo resultados buenos en pruebas de laboratorio es menester realizar los ensayos *in-vivo*.

4.5.4. Patogenicidad

La patogenicidad por definición es la capacidad de causar una enfermedad (Thomas y Elkinton, 2004). La misma está determinada por varios factores como la virulencia, la concentración y la tolerancia a diferentes condiciones ambientales. Aunque es muy influyente, la virulencia por sí sola no determina el éxito del control, ya que hay más factores que determinarán si ocurre la micosis en la garrapata. También es importante considerar la conidiogénesis como se discutirá más adelante.

4.5.4.1. Virulencia

La virulencia está dada por factores genéticos propios los que regulan la codificación de distintas enzimas clave (adhesinas, proteasas, quitinasas, lipasas, etc.) en la infección ya que degradan constituyentes principales de la garrapata. La virulencia también está dada por la producción de toxinas, por ejemplo, las destruxinas las cuales bajan las defensas, dañan el sistema muscular y afectan la excreción.

La misma aumenta tras pasajes por la plaga blanco (Frazzon y col., 2000; Arruda y col., 2005; Fernandes y col., 2012). Esto se comprobó en el trabajo de Frazzon y col., (2000) donde reaislaron la cepa M5 luego de uno y de dos pasajes en teleóginas. Al segundo día de tratamiento, para la cepa reaislada de un solo pasaje la mortalidad fue de 1,8%, mientras que la misma cepa al ser reaislada luego de dos pasajes generó mortalidad de 84%. En contraposición, múltiples pasajes en medios artificiales o en condiciones inapropiadas reducen la virulencia (Alves, 1998).

4.5.4.2. Concentración

Otro factor que aumenta la patogenicidad es la concentración del inóculo. Las suspensiones de conidios que se preparan para los ensayos pueden ajustarse a diferentes concentraciones de conidios/ml. Varios autores comprobaron que a mayores concentraciones mejores resultados. Frazzon y col. (2000) evaluaron varias cepas, siendo la E6S1 la más patógena, ya que cuando usaron 1×10^8 conidios/ml obtuvieron mortalidades de 100% a los 8 días, y a los 5 días cuando usaron concentraciones de 1×10^9 conidios/ml. Además, a esta última concentración los huevos fallaron al eclosionar. Esto es muy significativo, ya que a pesar de que las teleóginas tratadas con la concentración menor murieron a los 8 días, hubo postura de huevos viables con una capacidad alta de eclosionar, lo que afectaría el control.

Lo mismo sucedió en el trabajo de López y col., (2009) con la cepa 137bm. La probaron a diferentes concentraciones viendo que el aumento del efecto patógeno era directamente proporcional al aumento de la concentración. También se vio que las hembras que habían sido tratadas con 1×10^8 conidios/ml pusieron huevos de los que eclosionó un 1,67%, pero de las tratadas con 1×10^9 el porcentaje de eclosión fue 0,5%.

4.5.4.3. Resistencia a condiciones climáticas

Con respecto a las condiciones ambientales los factores temperatura, humedad y radiaciones UV-B son muy influyentes sobre la patogenicidad.

En la mayoría de los ensayos se usan estufas de incubación que mantienen una constancia de 28°C. Esta temperatura es ideal para la germinación fúngica, pero no es la realidad con la que se van a encontrar los hongos luego de su aplicación sobre la piel de un mamífero, donde la temperatura superficial puede alcanzar los 41°C según la región anatómica. Para ello Polar y col. (2005b) compararon la patogenicidad de distintas cepas a 28°C y a 31-35°C. La cepa MI386697, que tenía una temperatura óptima más alta en su perfil de crecimiento, fue la más patógena.

En cuanto a las radiaciones, las UV-B son las más nocivas para los sistemas biológicos porque produce daños en el ADN. En el caso de *M. anisopliae* genera una inactivación de conidios y retraso en los tiempos de germinación (Braga y col., 2001).

Braga y col. (2001) determinaron que existe una correlación inversa significativa entre la tolerancia a la radiación UV-B y la latitud desde donde fueron obtenidas. Esto nos sugiere que algunas cepas de *M. anisopliae* que estuvieron expuestas a diferentes niveles de radiación UV-B durante algunas fases de su ciclo de vida parecen haber sufrido una selección para la adaptación a los rayos UV-B. Es el caso de la cepa ARSEF 324 obtenida de Australia, paralelo 19°S. Como al momento de aplicar la cepa la misma va estar expuesta a las radiaciones es sensato seleccionar una con mayor resistencia a los rayos UV-B y realizar las aplicaciones en últimas horas de la tarde.

4.5.4.4. Conidiogénesis

Quinelato y col. (2012), en la búsqueda de la “mejor cepa”, estudiaron la patogenicidad de 30 cepas de *M. anisopliae* contra larvas de *R. microplus*. No se limitaron a determinar la mortalidad larvaria sino también la producción de conidios. En concordancia con los demás autores, a mayor concentración mayor eficacia. Sin embargo, observaron que algunas cepas tuvieron excelentes valores de mortalidad, pero con una baja formación de conidios y viceversa. Desde el punto de vista práctico esto puede ser un inconveniente a la hora de producción en forma masiva, ya que la producción de conidios va a ser una limitante. No encontraron ningún patrón que relacionara a ambas, por lo que sería erróneo seleccionar una cepa como la mejor sólo por su virulencia. En el trabajo mencionado, las cepas IBCB481 y CG37 se consideraron como las mejores por tener valores altos de producción de conidios (100×10^6 conidios en 0,5cm de PDA) y generar elevada mortalidad larvaria a los 20 días, 100% con IBCB481 y 69,9% con CG37.

Todos estos factores influyentes nos dan la pauta de que hay varias características que se deben considerar, no solamente la virulencia.

4.5.5. Interacción con la garrapata

Como se vio anteriormente es importante la selección de la cepa en base a diferentes características que la hacen mas o menos patógena. Sin embargo hay factores referidos a la garrapata que pueden darnos variaciones en la respuesta al tratamiento.

Como mencionan De la Fuente y col. (2000), las garrapatas han sufrido procesos evolutivos asociados con la adaptación al hábitat y separación biogeográfica, lo que resulta en cepas con marcadas diferencias morfológicas. Por lo tanto, sería correcto pensar que las diferentes cepas de garrapatas vayan a reaccionar distinto a la acción fúngica. Esta característica motivó a estudios que relacionan el efecto del hongo entomopatógeno con el origen de las garrapatas. Dos grandes trabajos que se han realizado en la región son los de Perinotto y col. (2012) y de Webster y col. (2017). En el primero se aplicaron tratamientos iguales a dos poblaciones distintas de garrapatas. Aunque se obtuvieron buenos resultados en comparación con los controles, las teleóginas obtenidas de un establecimiento tuvieron sus parámetros biológicos más intensamente afectados en comparación a las del otro establecimiento, usando la misma cepa de *M. anisopliae*. En el segundo trabajo se usaron larvas de garrapatas provenientes de 67 establecimientos distintos de Brasil. Los resultados de mortalidad fueron considerablemente diferentes según la población de *R. microplus* sobre la que se aplicó la suspensión. También se estudió que no sólo hay diferencias entre el efecto sobre las distintas poblaciones sino también, dentro de la misma especie diferencias según el estadio. Ojeda-Chi y col. (2010) estudiaron las cepas Ma34 y Ma14 y una mezcla de ambas a 1×10^8 conidios/ml. Al analizar la mortalidad de teleóginas y sus parámetros biológicos a los 14 días post-tratamiento, la mortalidad generada por las cepas solas y su combinación produjo una mortalidad total.



Figura 9. *R. microplus* adulta infectada con *M. anisopliae* E6. Fuente: Arruda y col., 2005.

Pero al usarse una concentración menor de conidios (1×10^6) sí se observaron diferencias en la mortalidad entre las dos cepas, teniendo menor mortalidad la Ma14, un 60% menos que con la Ma34. En cambio, para el estadio de larvas, la Ma14 se comportó mejor que la Ma 34, duplicando casi la mortalidad, independientemente de la concentración usada. En este estadio la mortalidad para Ma14 fue de aproximadamente 42% y de la Ma 34 de aproximadamente 20%. En este caso, la utilización de la mezcla de ambas cepas fue mejor ya que la mortalidad aumentó a 84%. De estos resultados se desprende que algunas cepas actúan mejor sobre ciertas etapas evolutivas de *R. microplus*, y que la combinación de algunas cepas pueden potenciar su efecto.

Castro y col. (1997), buscando dar continuidad al trabajo realizado en laboratorio por Bittencourt y col. (1992), realizaron un ensayo experimental *in-vivo* con la misma cepa de *M. anisopliae*, 959. Se usó un total de nueve animales estabulados individualmente en boxes con piso de madera para la recolección de teleóginas.

Como también se buscó evaluar la eficacia según el estadio de la garrapata. Se realizaron infestaciones artificiales con larvas de *R. microplus* comenzando desde el día -23 y repitiéndolas 3 veces por semana las dos primeras semanas y 4 veces por semana la última semana previa al tratamiento. Así el día del tratamiento se estaría aplicando el mismo sobre todos los estadios. En total se infectaron con 80.000 larvas aproximadamente. Para poder determinar la eficacia del control (EC) se contaron los diferentes estadios que tenía el animal en diferentes días. Los contajes se comenzaron 3 días antes del tratamiento hasta el día 22 post tratamiento (PT). Pero también se determinaron otros valores teniendo en cuenta los parámetros reproductivos para las teleóginas que sobrevivían.

Se hicieron 3 grupos conformados por tres animales cada uno. A cada uno se le pulverizaron, como única aplicación, 5 litros de las suspensiones al día 23 desde la primera infestación. El control con agua y Tween 80, el grupo 1 con suspensión de 10^7 conidios/ml y el grupo 2 con 10^8 conidios/ml. Las colectas y contajes fueron diarias. También desde el día 1 PT se separaron 10 teleóginas de cada bovino para incubar en laboratorio y evaluar ovipostura y eclosión.

Sus resultados, algunos expresados en la Tabla 2, dicen que el EC medio fue de 54,8% y 50,4% para el grupo 2 y 1 respectivamente, no habiendo diferencias estadísticas entre ambos, pero sí con el control. Como era de esperarse, la eficacia fue menor a la obtenida en laboratorio, en contraste con los resultados de Bittencourt y col. (1992) de 96,6% y 86,15% para las mismas concentraciones de 10^8 y 10^7 respectivamente. Al cotejar los resultados con el día de las colectas se determinó que las fases más afectadas por el tratamiento fueron las ninfas seguidas de las larvas y adultos. En cuanto a la capacidad reproductiva, datos significativos se obtuvieron al determinar el porcentaje de reducción estimado de la reproducción (PREP), siendo mejor la concentración aplicada al grupo 2. Otro dato interesante que se obtuvo, fue que la fase más afectada reproductivamente fue la de ninfa, ya que entre los días +9 y +14 el PREP fue el mayor de los obtenidos, con valores de 60% y una media de 36,9%.

En cambio, en un trabajo de Bahiense y col. (2007) los estadios más afectados fueron las larvas. En su ensayo utilizaron la cepa ESALQ-959 y aplicaron la misma en una concentración de 8×10^8 conidios/ml para el grupo tratado. Los animales, 4 becerros, fueron infestados 24 días antes del tratamiento, y también a los días 3, 5 y 7 PT para poder evaluar el efecto residual sobre reinfestaciones. Los contajes se

hicieron diariamente desde el día 3 antes del tratamiento hasta el día 28 luego del mismo. Con estos datos de 3 días previos se pudo calcular la eficacia del control. Durante el total de días que se hizo el conteo, se reportó un 33% de mortalidad media, teniendo aumentos luego del día 17, coincidiendo con la etapa larvaria y también al día 25 PT, demostrando un efecto residual. Con respecto a los parámetros reproductivos medidos en laboratorio, posterior a la colecta de las teleóginas, se observa que el índice de eficiencia reproductiva presenta diferencias significativas con el control a los 2 días PT, 58,6% contra 39,4%.

Estos resultados sugieren que se deben realizar varios estudios de interacción hongo/garrapata para poder aplicar la cepa más adecuada para cada caso, teniendo en cuenta tanto el origen de la población de garrapata como el estadio evolutivo.

4.5.6. Combinación con otras sustancias

Puesto que los conidios de *M. anisopliae* tienen la característica de ser lipofílicos y a su vez la cutícula de *R. microplus* tiene su capa más externa con una cubierta cerosa, lo más conveniente para su distribución sería una sustancia oleosa. A su vez esto provee de protección física contra la desecación.

Para comprobarlo Marciano y col. (2013) evaluaron la efectividad de un producto comercial desarrollado para plagas agrícolas: Metarril WP Organic® (cepas ESALQ 1037 y ESALQ E9) tanto en agua como en aceite. Las suspensiones se realizaron con 1×10^8 conidios/ml utilizando como medio agua, aceite mineral Vetec® al 1%, 3% y 5%. Parte de las teleóginas se seleccionaron para el bioensayo y otra parte para obtener su descendencia y así evaluar el efecto de aplicación directo sobre huevos y larvas. La formulación que se comportó mejor fue la oleosa al 5%, dando un porcentaje de control en el bioensayo sobre teleóginas de 97,35%. Estos autores detectaron un porcentaje de eclosión de 2,2% y un 100% de mortalidad larvaria a los 5 días con el formulado oleoso al 3% y 5%, obteniendo la misma mortalidad recién a los 25 días cuando era usado formulado acuoso. Esto coincide con lo observado por otros autores (Polar y col., 2005; Leemon y Jonsson, 2008; Camargo y col., 2012; Camargo y col., 2016), a mayor concentración de aceite mineral mayor mortalidad y en menos tiempo. Esto se explicaría por una mayor propagación y adherencia del aceite a la cutícula, posiblemente alcanzando membranas intersegmentales, en contraste con el agua.

Con respecto a la combinación de acaricidas químicos con *M. anisopliae* existen trabajos, aunque escasos, con resultados promisorios. Bahiense y col., (2006) estudiaron la asociación de la cepa ESALQ 959 junto con la deltametrina sobre larvas de *R. microplus* resistentes a la misma. Mientras que la deltametrina sola (6,25ppm) dio resultados medios de mortalidad de 36,5% y el hongo sólo, 55%, cuando se aplicaron juntos obtuvieron valores de 100%. Webster y col. (2017) como parte de un ensayo a campo determinaron primero, en laboratorio, la compatibilidad de algunos acaricidas comerciales con la cepa TIS-BR03. Las combinaciones menos viables fueron con amitraz y diazinón. Los acaricidas que no alteraron la viabilidad del hongo, y por lo tanto se eligieron para el ensayo a campo, fueron la combinación de cipermetrina y clorpirifós.

4.5.7. Interacción con el bovino (Ensayos *in-vivo*)

Al ser el propósito final de los ensayos *in-vitro* seleccionar la mejor cepa para poder aplicarla sobre animales a campo, hay que considerar también la interacción con el microambiente de la piel del animal.

Correia y col. (1998) no observaron reducción en los conteos de las teleóginas en su ensayo a campo. El mismo se realizó en una zona de Brasil con temperatura media 21,2° y Humedad 77%. Usaron 15 animales con los que hicieron 5 grupos de 3 cada uno. Los animales estuvieron estabulados y fueron infestados artificialmente los días -21, -14 y -7 al tratamiento. La cepa usada fue E9, la cual previo a su germinación en arroz, fue doblemente pasada por hembras de *R. microplus*. Se aplicaron 5 litros de suspensiones con $7,5 \times 10^8$, $7,5 \times 10^7$, $7,5 \times 10^6$, $7,5 \times 10^5$ conidios/ml. No se menciona si algo se aplicó al grupo control. Los días 0, 1, 7, y 16 PT se contaron las hembras mayores a 4mm presentes en el lado izquierdo de los bovinos. Además, durante los 15 días siguientes al tratamiento las 4 hembras más ingurgitadas se colectaron manualmente en días alternos y se llevaron a incubar al laboratorio.

De los conteos visuales no se tuvieron diferencias estadísticas con el control, en ninguna de las concentraciones. En cuanto que las hembras que fueron colectadas e incubadas llegaron a tener mortalidad de 79% cuando se había aplicado la concentración mayor. Este valor fue decayendo a medida que pasaron los días desde el tratamiento. Una aclaración realizada por los autores es que cuando aplicaron la suspensión de mayor concentración tuvieron problemas con el difusor, que se les tapaba y además observaron una baja humectación de esporas a pesar del uso de un surfactante. El hecho de que las hembras incubadas tuvieron mortalidades elevadas, a diferencia de las que permanecieron en los animales podría estar indicándonos que, aunque sí se logró un contacto entre el hongo y la garrapata, las condiciones posteriores a la aplicación no fueron favorables para que el hongo continuara su ciclo.

Alonso y col. (2007) llevaron a cabo un experimento en México en 2005, (temperatura media: 24°C, humedad relativa: 85%) sobre bovinos naturalmente infestados los cuales no habían recibido ningún tratamiento en los 90 días previos. Realizaron 2 grupos con 10 bovinos en cada uno, distribuidos homogéneamente según conteo por visualización de hembras (entre 4,5 y 8mm) del lado izquierdo. Prepararon masivamente, en arroz, conidios de la cepa Ma34 ajustando su concentración final a 1×10^8 conidios/ml, la que luego suspendieron en agua y Tween 80. Entre las 6 y 7 horas de la tarde aplicaron por pulverización 5 litros de esta suspensión a uno de los grupos. Al grupo control se le pulverizó solamente con Tween 80 y agua. Estas aplicaciones se repitieron a los 15, 30 y 45 días. Los conteos los hicieron los días 0, 3, 5, 7 y 14 luego de cada uno de los 4 tratamientos.

Sus resultados los expresaron como porcentaje de eficacia (PE). Recién luego del segundo tratamiento tuvieron reducciones significativas de infestación. En promedio de todas las mediciones se tuvieron valores mayores a 45%, aunque al quinto día del conteo luego del cuarto tratamiento, osea al día 50 del ensayo, registraron un valor mas elevado de eficacia, 91%.

Para comprobar la eficacia en campo de los formulados oleosos sobre el bovino, Camargo y col. (2016) ensayaron con el mismo producto que Marciano y col. (2013) pero en condiciones de campo. Para el mismo separaron 30 animales naturalmente infestados en 3 grupos de 10. Se aplicó tratamiento en dos instancias día 0 y día +3,

los mismos consistieron de 4 litros de Metarril 10^8 conidios/ml formulados en aceite mineral, un control solo con aceite mineral y un control sin tratamiento. Los conteos de hembras comenzaron el día -3 y fueron cada 3 y 4 días hasta el día 24 luego del primer tratamiento. También se colectaron hembras para evaluar parámetros reproductivos en laboratorio. Recién al día 17 se vio una reducción en los contajes sobre el grupo tratado con Metarril. Con el correr de los días esta reducción se incrementó llegando a una eficacia de 90,53% en relación con el control, al día 21. En contradicción a otros resultados, los parámetros reproductivos de las hembras colectas no se afectaron significativamente, esto se puede explicar porque las colectas se hicieron días mas tarde PT (7, 14 y 21) y no inmediatamente a la aplicación como en otros trabajos.

Como se puede ver, al aumentar las frecuencias de aplicación aumenta la eficacia. Lo mismo se comprobó en un ensayo (Lopez y col., 2009) donde se hicieron 3 tratamientos con la cepa 137bm a concentración de 1×10^8 conidio/ml. Las aplicaciones fueron de 1 litro/100kg PV y se repetían cada semana. Los conteos también se hicieron semanalmente y las colectas de hembras para incubar a las 48hs PT. En este caso la acción tampoco fue inmediata, teniendo recién luego de la segunda aplicación datos relevantes de control. Este efecto no se prolongó más allá de la 5 semana. En total se tuvo una reducción del 75% en la infestación.

En todos los trabajos mencionados previamente, se vieron reducciones significativas con respecto al control pero en general no fueron reducciones muy altas como para poder ser aplicadas como único recurso. Solamente en un trabajo de Webster y col., (2015) donde se aplico *M. anisopliae* cepa TIS-BR03 junto con cipermetrina y clorpirifós hubo reducciones medias tan elevadas como 97,7%.

Los tratamientos se aplicaron 7 veces con intervalos de 21 a 28 días sobre animales infestados artificialmente a los 21, 14 y 7 días previos al tratamiento y luego 1 semana antes de cada reaplicación del tratamiento. Los conteos por visualización directa fueron semanales durante toda la duración del ensayo, 6 meses. Por lo tanto se puede deducir que existe compatibilidad entre estos productos químicos y biológicos, ya que bajas dosis de los acaricidas químicos generan una depresión en la respuesta inmune, por lo tanto aumenta la patogenicidad del hongo. Desafortunadamente no existen demasiados trabajos similares y con resultados tan promisorios.

4.5.8. Interacción con otros organismos.

Como se planteó en la definición de control biológico, el uso de *M. anisopliae* no debe generar daños a organismos no blanco. Particularmente no debe afectar a organismos benéficos como abejas, predadores y parasitoides de otros insectos que mantienen las poblaciones controladas. Tampoco sería deseable el desarrollo de respuestas alérgicas en los operadores. Afortunadamente existen estudios que concluyen que según la cepa de *M. anisopliae* hay baja mortalidad en colmenas tratadas y además no tiene efectos sobre larvas ni las características de las colonias. Inclusive, *M. anisopliae* se plantea como útil para el control del acaro *Varroa destructor*, siempre dependiendo de la cepa utilizada (Kanga y col., 2003; Hamiduzzaman y col., 2012). Con relación a reacciones alérgicas no existen reportes en la literatura médica, pero sí dos casos de queratitis fúngica y dos de

infección sinusal en humanos con pronóstico favorable al ser tratados con Itraconazol y natamycin 5% (Roberts y St Leger, 2004).

Es importante que, si realmente se desean llevar a cabo planes de control que incluyan al control biológico, las autoridades pertinentes regulen y testeen los productos previo a su comercialización.

Tabla 1. Efecto *in-vitro* de *M. anisopliae* en el control de *R. microplus*

Autores	Cepa	Conidios/ml	Efecto sobre Teleoginas			Efecto directo sobre Huevos	Efecto directo sobre Larvas
			%Mortalidad	EPI	%EH	%EH	%Mortalidad
Frazzon y col., 2000	E6S1	1x10 ⁸	100, en 14 días.	17%	89	nd	nd
		1x10 ⁹	100, en 5 días.	nd	0	nd	nd
Bahiense y col.,2006	ESALQ 959	2,2x10 ⁷ +deltametrina (6,25ppm)	nd	nd	nd	nd	100, en 10 días
López y col., 2009	137bm	1x10 ⁸	nd	5%	1,67	nd	nd
		1x10 ⁹	nd	2%	0,5	nd	nd
Ojeda Chi y col., 2010	Ma34+Ma14	1x10 ⁸	78, en 12 días	33,9%	nd	nd	90, en 20 días
	Ma34	1x10 ⁸	100, en 12 días	25%	nd	nd	57, en 20 días
Quinelato y col., 2011	IBCB481	1x10 ⁸	nd	nd	nd	nd	100, en 20 días.
Marciano y col., 2013	Metarril WP Organic®	1x10 ⁸	nd	55,09%	96,50	94,1	62, en 5 días. 100, en 25 días.
		1x10 ⁸ en Vetec® 5%	nd	2,12%	15,76	2,2	100, en 5 días.

EH, porcentaje de eclosión; EPI, índice de producción de huevos=[peso de la masa de huevos(g)/peso inicial de teleogina(g)]*100; nd, no determinado.

Tabla 2. Efecto *in-vivo* de *M. anisopliae* en el control de *R. microplus*

Autor	Cepa	Bovinos		Conidio/ml	Volumen	Aplicaciones	EC
		Grupos	Dotación				
Castro y col.,1997	959	3 de 3 animales	Box individual	1x10 ⁷	5 l	1	EC=50,4% ^a
				1x10 ⁸	5 l	1	EC=54,8% ^a
Correia y col., 1998	E9	5 de 3 animales	Box	7,5x10 ⁸	5 l	1	nd
Alonso Díaz y col., 2007	Ma34	2 de 10 animales	1 animal/5ha de campo	1x10 ⁸	5 l	4	PE=51%
Bahiense y col., 2007	ESALQ959			8x10 ⁸		1	Mt=33%
Camargo y col., 2016	MetarrillM2	3 de 10 animales	1 grupo/2ha			2	EC=75,09%
López y col., 2009	137bm	2 de 10 animales		1x10 ⁸	1l/kg	3	
Webster y col., 2015	TIS-BR03	4 de 5 animales	1 grupo/ha	1x10 ⁸ +0.02% cipermetrina, 0.05% clorpirifós	8 l	7	EC=97,7%

EC (Eficacia del control)=1 – (n° de teleoginas grupo tratado PT*n° de teleoginas grupo control al día-3/n° de teleoginas grupo tratado al día-3*n° de teleoginas grupo control PT)]*100; PE=(Porcentaje de eficacia)=[promedio de teleoginas en grupo control-promedio de teleoginas en grupo tratado/promedio de teleoginas en grupo control]*100; Mt= Mortalidad

4.6 Conclusiones

Frente a las grandes pérdidas que genera la garrapata común del ganado (*R. microplus*) y a la pérdida de eficacia de la mayoría de los principios activos acaricidas en nuestro País, es necesario buscar otras alternativas no químicas para poder mitigar su daño.

Dentro de estas alternativas podemos destacar el uso del hongo entomopatógeno *M. anisopliae*, como una de las más factibles a ser aplicadas en nuestro medio.

Si bien hay muchos trabajos experimentales realizados en condiciones de laboratorio, no todos han sido sometidos a estudios de campo. Aquellos que han sido realizados a campo, han tenido resultados variables. Sin embargo, algunos de ellos han tenido resultados muy promisorios, principalmente cuando son aplicados en conjunto con garrapaticidas en garrapatas resistentes a los mismos.

Las ventajas de su uso son la fácil y económica producción del hongo, es un producto amigable con el medio ambiente y que no tiene la problemática de dejar residuos en productos/subproductos cárnicos como sucede con los garrapaticidas químicos. Como todo tratamiento, debe ser planeado y aplicado estratégicamente dentro del marco de un MIP.

Existen numerosas cepas de *M. anisopliae*, las cuales tienen diferentes características y comportamientos sobre diferentes poblaciones de garrapatas, que, si no se consideran en el momento de la elección del entomopatógeno, pueden interferir con el éxito del control de la garrapata. Una cepa de *M. anisopliae* de origen tropical o subtropical, con una eficacia comprobada en garrapata, tal vez no se adapte a nuestro ambiente y por ende no sea eficaz. Por dicha razón, una de las opciones para nuestro país sería la búsqueda de nuestras propias poblaciones de hongos que controlar nuestras poblaciones de garrapatas.

Para sacar el máximo provecho al uso de *M. anisopliae* se pueden utilizar las concentraciones altas, ya que el aumento de la eficacia es directamente proporcional al aumento de la concentración, aunque tampoco sería adecuado usar concentraciones mayores de 1×10^9 conidios/ml ya que esto conlleva a problemas prácticos como la oclusión de los aplicadores.

También está comprobado que los mejores resultados se tienen al utilizar suspensiones en medios oleosos, ya que se genera una mejor adhesión entre el conidio y la garrapata, y además es sabido que los aceites interfieren con la

fisiología y respiración de los artrópodos. A su vez el aceite le brinda cierta protección al conidio, sobre todo contra los rayos UV-B, frente a los cuales los conidios son muy sensibles, siendo otra herramienta práctica contra estos el aplicar el producto en las últimas horas de la tarde.

Aunque encontrar una cepa útil para aplicar a campo y considerar todas las variables que pueden afectar la efectividad del hongo no son procesos rápidos ni sencillos, considero desde mi punto de vista que se debe investigar más profundamente sobre esta temática en nuestro País, sobre todo realizando estudios a campo, con un enfoque multidisciplinario que integre conocimientos y experiencias del área de micología, entomología, epidemiología y veterinaria.

5. BIBLIOGRAFÍA

1. Abrol, D. P. (Ed.). (2013). Integrated pest management: current concepts and ecological perspective. San Diego, Academic Press, 561 p.
2. Akhtar, M., Muhammad, F., Lodhi, L. A., Hussain, I., Anwar, M. I. (2011). Immunity against Ticks-A Review. Pakistan Veterinary Journal, 31(1): 9-16.
3. Alonso-Díaz, M. A., García, L., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutierrez, R., Angel-Sahagún, C. A., Rodríguez-Vivas, R. I., Fragoso-Sánchez, H. (2007). Evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Hyphomycetes) for the control of *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) on naturally infested cattle in the Mexican tropics. Veterinary parasitology, 147(3-4): 336-340.
4. Altieri, M. A., Trujillo, J., Campos, S., Klein Koch, C., Gold, C. S., Quezada, J. R. (1989). El control biológico clásico en América Latina en su contexto histórico. Manejo Integrado de Plagas 12:82-107.
5. Alves, S. B. (1998). Controle microbiano de insetos. 2ª ed. Piracicaba. Fealq, 1163p.
6. Alves, R. T., Bateman, R. P., Gunn, J., Prior, C., Leather, S. R. (2002). Effects of different formulations on viability and medium-term storage of *Metarhizium anisopliae* conidia. Neotropical entomology, 31(1): 91-99.
7. Angelo, I. C., Gôlo, P. S., Camargo, M. G., Kluck, G. E. G., Folly, E., Bittencourt, V. R. E. P. (2010). Haemolymph protein and lipid profile of *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* infected by fungi. Transboundary and Emerging Diseases, 57(1-2): 79-83.
8. Arruda, W., Lübeck, I., Schrank, A., Vainstein, M.H., (2005). Morphological alterations of *Metarhizium anisopliae* during penetration of *Boophilus microplus* ticks. Experimental and Applied Acarology 37: 231–244.
9. Avila D. (1998) Análisis Cuantitativo de los Costos a Nivel del País y del Productor por la Presencia de la Garrapata en el Uruguay. Consultoría MGAP – IAEA. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Dilave.htm>.
Fecha de consulta: 17 de agosto de 2018

10. Badii, M. H., Abreu, J. L. (2006). Control biológico una forma sustentable de control de plagas (Biological control a sustainable way of pest control). *Daena. International Journal of Good Conscience*, 1(1): 82-89.
11. Bahiense, T. C., Fernandes, É. K. K., Bittencourt, V. R. E. P. (2006). Compatibility of the fungus *Metarhizium anisopliae* and deltamethrin to control a resistant strain of *Boophilus microplus* tick. *Veterinary parasitology*, 141(3-4): 319-324.
12. Bahiense, T. C., Fernandes, É. K., Angelo, I. D. C., Perinotto, W. M. D. S., & Bittencourt, V. R. (2007). Avaliação do potencial de controle biológico do *Metarhizium anisopliae* sobre *Boophilus microplus* em teste de estábulo. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 16(4): 243-245.
13. Baker, K. F., Cook, R. J. (1974). *Biological control of plant pathogens*. San Fransisco, APS, 433p.
14. Bates P. (2012) *External parasites of small ruminants. A practical guide to their prevention and control*. Londres, CABI, 256p.
15. Bischoff, J. F., Rehner, S. A., & Humber, R. A. (2009). A multilocus phylogeny of the *Metarhizium anisopliae* lineage. *Mycologia*, 101(4): 512-530.
16. Bittencourt, V. R. E. P., Massard, C. L., Lima, A. F., Viegas, E. C., & Alves, S. B. (1992). Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). Rio de Janeiro, 105 p.
17. Bittencourt, V. R. E. P., Massard, C. L., Lima, A. F. (1994). Ação do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, em ovos e larvas do carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Revista Universidade Rural-Série Ciências da Vida*, 16: 41-47.
18. Bittencourt, V. R. E. P., Massard, C. L., Lima, A. F. (1995). Dinâmica da infecção do fungo *Metarhizium anisopliae* (Metschnikoff, 1879) Sorokin, 1883, sobre o carrapato *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887). *Revista Universidade Rural-Série Ciências da Vida*, 17: 83-88.

19. Bittencourt, V. R. E. P., Mascarenhas, A. G., Faccini, J. L. H. (1999). The penetration of the fungus *Metarhizium anisopliae* on *Boophilus microplus* in experimental conditions. *Ciencia Rural*, 29(2): 351-354.
20. Brady, B. L. K. (1979). *Metarhizium anisopliae*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria, (609): 1-2.
21. Braga, G. U., Flint, S. D., Miller, C. D., Anderson, A. J., Roberts, D. W. (2001). Variability in response to UV-B among species and strains of *Metarhizium* isolated from sites at latitudes from 61 N to 54 S. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78(2): 98-108.
22. Butt, T. M., Goettel, M. S. (2000). Bioassays of entomogenous fungi. *Bioassays of entomopathogenic microbes and nematodes*, 141-195.
23. Cámara Mercantil, Informe Agronegocios. Disponible en: http://www.camaramercantil.com.uy/uploads/cms_news_docs/Informe-Agronegocios-Diciembre-2016-Uruguay-XXI.pdf Fecha de consulta: 17 de agosto de 2018.
24. CABI, Ficha técnica Datasheet *Melinis minutiflora* (molasses grass) Disponible en: <https://www.cabi.org/isc/datasheet/32983>. Consultado el 16/7/2018 Fecha de consulta: 7 de setiembre del 2018.
25. Camargo, M. G., Golo, P. S., Angelo, I. C., Perinotto, W. M., Sá, F. A., Quinelato, S., Bittencourt, V. R. (2012). Effect of oil-based formulations of acaripathogenic fungi to control *Rhipicephalus microplus* ticks under laboratory conditions. *Veterinary Parasitology*, 188(1-2): 140-147.
26. Camargo, M. G., Nogueira, M. R., Marciano, A. F., Perinotto, W. M., Coutinho-Rodrigues, C. J., Scott, F. B., Bittencourt, V. R. (2016). *Metarhizium anisopliae* for controlling *Rhipicephalus microplus* ticks under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 223: 38-42.
27. Campos, R. A., Boldo, J. T., Pimentel, I. C., Dalfovo, V., Araújo, W. L., Azevedo, J. L., Vainstein, M.H., Barros, N. M. (2010). Endophytic and entomopathogenic strains of *Beauveria* sp to control the bovine tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Genetics and Molecular Research*, 9(3): 1421-1430.

28. Canestrini, G. (1888). Intorno ad alcuni Acari ed Opilioni dell'America. Atti della Società Veneto – Trentina di Scienze Naturali (Padua) Ser 1, 11 (1): 100-111.
29. Cardozo, H., Nari, A., Franchi, M., Lopez, A., Donatti, N. (1984) Estudios sobre la ecología de *Boophilus microplus* en tres áreas enzoóticas del Uruguay. *Veterinaria* 20 (86/87): 4-10.
30. Cardozo H. (1995). Situación de resistencia del *Boophilus microplus* en Uruguay. Seminario Internacional de Parasitología Animal, Acapulco, México, 30-38.
31. Carrillo-Rayas, M. T., Blanco-Labra, A. (2009). Potencial y Algunos de los Mecanismos de Acción de los Hongos Entomopatógenos para el Control de Insectos Plaga. *Acta Universitaria*, 19(2): 40-49.
32. Castro, A. D., Bittencourt, V. R. E. P., Daemon, E., Viegas, E. D. C. (1997). Eficácia do fungo *Metarhizium anisopliae* sobre o carrapato *Boophilus microplus* em teste de estábulo. *Revista Universal Rural Ser Ciencia Vida*, (19): 73-82.
33. Castro-Janer, E., Rifran, L., Piaggio, J., Gil, A., Miller, R. J., Schumaker, T. T. S. (2009). In vitro tests to establish LC50 and discriminating concentrations for fipronil against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) and their standardization. *Veterinary parasitology*, 162(1-2): 120-128.
34. Castro-Janer, E., Rifran, L., González, P., Piaggio, J., Gil, A., Schumaker, T. T. S. (2010). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) resistance to fipronil in Uruguay evaluated by in vitro bioassays. *Veterinary Parasitology*, 169(1-2): 172-177.
35. Castro-Janer, E., Rifran, L., González, P., Niell, C., Piaggio, J., Gil, A., Schumaker, T. T. S. (2011). Determination of the susceptibility of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) to ivermectin and fipronil by Larval Immersion Test (LIT) in Uruguay. *Veterinary Parasitology*, 178(1-2): 148-155.

36. Chandler, D., Davidson, G., Pell, J. K., Ball, B. V., Shaw, K., Sunderland, K. D. (2000). Fungal biocontrol of Acari. *Biocontrol Science and Technology*, 10(4): 357-384.
37. Corallo, B. (2016). Selección y caracterización de hongos entomopatógenos para controlar a *Thaumastocoris peregrinus* en *Eucalyptus* spp.
38. Correia, A. D. C. B., Fiorin, A. C., Monteiro, A. C., Veríssimo, C. J. (1998). Effects of *Metarhizium anisopliae* on the Tick *Boophilus microplus* (Acari: Ixodidae) in Stabled Cattle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 71(2): 189-191.
39. Cruz-Vázquez, C., Márquez, J. C., Lezama-Gutiérrez, R., Vitela-Mendoza, I., Ramos-Parra, M. (2015). Efficacy of the entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* in the control of infestation by stable flies *Stomoxys calcitrans* (L.), under natural infestation conditions. *Veterinary Parasitology*, 212(3-4): 350-355.
40. Cuore, U., Trelles, A., Sanchís, J., Gayo, V., Solari, M. A. (2007). Primer diagnóstico de resistencia al Fipronil en la garrapata común del ganado *Boophilus microplus*. *Veterinaria (Montevideo)*, 42: 35-41.
41. Cuore, U.; Cicero, L.; Trelles, A.; Nari, A. Solari, M.A. 2009 b. Tratamiento generacional de la garrapata. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/DILAVE/Dilave.htm> Fecha de consulta: 5 de setiembre de 2018
42. Cuore, U., Altuna, M., Cicero, L., Fernández, F., Luengo, L., Mendoza, R., ... Trelles, A. (2012). Aplicación del tratamiento generacional de la garrapata en la erradicación de una población multirresistente de *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 48(187): 5-13.
43. Cuore, U., Solari, M. A., Trelles, A. (2017). Situación de la resistencia y primer diagnóstico de poblaciones de garrapatas *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* resistente a cinco principios activos en forma simultánea en Uruguay. *Veterinaria (Montevideo)*, 53(205): 2-2.
44. De Faria, M. R., Wraight, S. P. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: a comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biological Control*, 43(3): 237-256.

45. De Jesús, Z. (1934). The Repellent and Killing Effects of Gordura Grass on the Larvae of the Cattle Tick *Boophilus australis*. *Philippine Journal of Animal Industry*, 1(4): 193-207.
46. De la Fuente, J., García-García, J. C., González, D. M., Izquierdo, G., & Ochagavía, M. E. (2000). Molecular analysis of *Boophilus* spp. (Acari: Ixodidae) tick strains. *Veterinary Parasitology*, 92(3): 209-222.
47. Eilenberg, J., Hajek, A., Lomer, C. (2001). Suggestions for unifying the terminology in biological control. *BioControl*, 46(4): 387-400.
48. Estrada-Pena, A., Gonzalez, J., Casasolas, A. (1990). The activity of *Aspergillus ochraceus* (Fungi) on replete females of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) in natural and experimental conditions. *Folia Parasitologica*, 37(4): 331-336.
49. Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J. L., Guglielmone, A., Horak, I., Jongejan, F., Latif, A., Pegram, R. Walker, A. R. (2006). The known distribution and ecological preferences of the tick subgenus *Boophilus* (Acari: Ixodidae) in Africa and Latin America. *Experimental & Applied Acarology*, 38(2-3): 219-235.
50. Flechtmann, C. H. (1973). *Ácaros de importância médico-veterinária*. São Paulo: Nobel, 192 p.
51. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (1987) Control de las garrapatas y de las enfermedades que transmiten. Manual práctico de campo, FAO (1): 5-20.
52. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (1998). Disponible en: <http://www.fao.org/Noticias/1998/ipm-s.htm>. Fecha de consulta: 5 de agosto de 2018
53. FAO, Food and Agriculture Organization of the United Nations (2004). Ticks: acaricide resistance: diagnosis, Management and prevention. Disponible en: <http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/010/ag014e/ag014e05.pdf> Consultado [14/7/2018](http://www.fao.org/tempref/docrep/fao/010/ag014e/ag014e05.pdf) Fecha de consulta: 31 de agosto de 2018

54. Fargues, J., Rougier, M., Goujet, R., Smits, N., Coustere, C., Itier, B. (1997). Inactivation of conidia of *Paecilomyces fumosoroseus* by near-ultraviolet (UVB and UVA) and visible radiation. *Journal of Invertebrate Pathology*, 69(1): 70-78.
55. Fernandes, É. K., Keyser, C. A., Chong, J. P., Rangel, D. E., Miller, M. P., Roberts, D. W. (2010). Characterization of *Metarhizium* species and varieties based on molecular analysis, heat tolerance and cold activity. *Journal of Applied Microbiology*, 108(1):115-128.
56. Fernandes, É. K., Bittencourt, V. R., & Roberts, D. W. (2012). Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Experimental Parasitology*, 130(3): 300-305.
57. Fiel, C., Nari, A. (2013). Enfermedades parasitarias de importancia clínica y productiva en rumiantes.: fundamentos epidemiológicos para su diagnóstico y control. Montevideo, Hemisferio Sur, 752p.
58. Frazzon, A. P. G., Junior, I. D. S. V., Masuda, A., Schrank, A., & Vainstein, M. H. (2000). In vitro assessment of *Metarhizium anisopliae* isolates to control the cattle tick *Boophilus microplus*. *Veterinary Parasitology*, 94(1-2): 117-125.
59. Guerrero, F. D., Lovis, L., Martins, J. R. (2012). Acaricide resistance mechanisms in *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus*. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 21(1): 1-6.
60. Guimarães, J. H., Battesti, D. M. B., Tucci, E. C. (2001). Ectoparasitos de importância veterinária. São Paulo, Plêiade. 218p.
61. Gutiérrez, M. E. M., Cárdenas, Y. G., Lequerque, A. (2016). El género *Metarhizium* Sorokin y su aplicación en el control de insectos plagas/*Metarhizium* Sorokin genus and the microbial control of pests insects. *Revista Cubana de Ciencias Biológicas*, 5(2): 15.
62. Hackman, R. H. (1982). Structure and function in tick cuticle. *Annual Review of Entomology*, 27(1): 75-95.
63. Hamiduzzaman, M. M., Sinia, A., Guzman-Novoa, E., Goodwin, P. H. (2012). Entomopathogenic fungi as potential biocontrol agents of the ecto-parasitic

mite, *Varroa destructor*, and their effect on the immune response of honey bees (*Apis mellifera* L.). *Journal of Invertebrate Pathology*, 111(3): 237-243.

64. INAC, Stock Vacuno 2017. Disponible en: <https://www.inac.uy/innovaportal/v/5542/10/innova.front/series-de-stock>.

Fecha de consulta: 20 de octubre de 2018

65. Jonsson, N. N., Matschoss, A. L., Pepper, P., Green, P. E., Albrecht, M. S., Hungerford, J., Ansell, J. (2000). Evaluation of TickGARDPLUS, a novel vaccine against *Boophilus microplus*, in lactating Holstein–Friesian cows. *Veterinary Parasitology*, 88(3-4): 275-285.

66. Kaaya, G. P., Munyinyi, D. M. (1995). Biocontrol potential of the entomogenous fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* for tsetse flies (*Glossina* spp.) at developmental sites. *Journal of Invertebrate Pathology*, 66(3): 237-241.

67. Kanga, L. H. B., Jones, W. A., James, R. R. (2003). Field trials using the fungal pathogen, *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycetes: Hyphomycetes) to control the ectoparasitic mite, *Varroa destructor* (Acari: Varroidae) in honey bee, *Apis mellifera* (Hymenoptera: Apidae) colonies. *Journal of Economic Entomology*, 96(4): 1091-1099.

68. Kirkland, B. H., Cho, E. M., Keyhani, N. O. (2004). Differential susceptibility of *Amblyomma maculatum* and *Amblyomma americanum* (Acari: Ixodidea) to the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*. *Biological Control*, 31(3): 414-421.

69. Leger, R. S., Charnley, A. K., Cooper, R. M. (1986). Cuticle-degrading enzymes of entomopathogenic fungi: synthesis in culture on cuticle. *Journal of Invertebrate Pathology*, 48(1): 85-95.

70. Leger, R. S., Durrands, P. K., Charnley, A. K., Cooper, R. M. (1988). Role of extracellular chymoelastase in the virulence of *Metarhizium anisopliae* for *Manduca sexta*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 52(2): 285-293.

71. Lemke, P. A. (1994). *The Mycota*. Berlin, Springer-Verlag, 401 p.

72. Leemon, D. M., Jonsson, N. N. (2008). Laboratory studies on Australian isolates of *Metarhizium anisopliae* as a biopesticide for the cattle tick *Boophilus microplus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 97(1): 40-49.
73. Leemon, D. M., Turner, L. B., Jonsson, N. N. (2008). Pen studies on the control of cattle tick (*Rhipicephalus (Boophilus) microplus*) with *Metarhizium anisopliae* (Sorokin). *Veterinary parasitology*, 156(3-4): 248-260.
74. López, E., López, G., Orduz, S. (2009). Control of the cattle tick *Boophilus microplus* with *Metarhizium anisopliae*, laboratory and field studies. *Revista Colombiana de Entomología*, 35(1): 42.
75. Lord, J. C. (2005). From Metchnikoff to Monsanto and beyond: the path of microbial control. *Journal of Invertebrate Pathology*, 89(1): 19-29.
76. Manisha, K., Pawar, P. V., Mary, J., Avalokiteswar, S., Deshpande, M. V. (2013). Evaluation of biocontrol potential of *Metarhizium anisopliae* strains against larvae and adults of *Aedes aegypti* (L.). *Journal of Biological Control*, 27(3): 194-203.
77. Maranga, R. O., Kaaya, G. P., Mueke, J. M., Hassanali, A. (2005). Effects of combining the fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on the mortality of the tick *Amblyomma variegatum* (ixodidae) in relation to seasonal changes. *Mycopathologia*, 159(4): 527-532.
78. Marciano, A. F., de Paulo, J. F., de Souza, L. A., Camargo, M. G., de Souza Perinotto, W. M., da Costa Angelo, I., Bittencourt, V. R. E. P. (2013). Eficiência in vitro de uma formulação oleosa de *Metarhizium anisopliae* sensu lato no controle de *Rhipicephalus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Medicine*, 35 (2): 28-34.
79. MGAP Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. (2009) Mapa de Zonas Epidemiológicas Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/sites/default/files/zonas-epidemiologicas-de-garrapata.pdf> Fecha de consulta: 15 de julio de 2018.
80. Morel, N., Signorini, M. L., Mangold, A. J., Guglielmone, A. A., Nava, S. (2017). Strategic control of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* infestation on

beef cattle grazed in *Panicum maximum* grasses in a subtropical semi-arid region of Argentina. *Preventive Veterinary Medicine*, 144: 179-183.

81. Moslim, R., Kamarudin, N. (2014). The use of palm kernel cake in the production of conidia and blastospores of *Metarhizium anisopliae* var. major for control of *Oryctes Rhinoceros*. *Journal of Oil Palm Research*, 26(2): 133-139.
82. Muhammad, G., Naureen, A., Firyal, S., Saqib, M. (2008). Tick control strategies in dairy production medicine. *Pakistan Veterinary Journal*, 28(1): 43.
83. Murrell, A., Barker, S. C. (2003). Synonymy of *Boophilus Curtice*, 1891 with *Rhipicephalus Koch*, 1844 (Acari: Ixodidae). *Systematic Parasitology*, 56(3): 169-172.
84. Muzio, F. (2006). Programa de la lucha contra la garrapata. Jornadas Aportes a la lucha contra la garrapata, FAO – TCP– DGSG – MGAP.
85. Najjar-Rodriguez, A. J., Lavidis, N. A., Mensah, R. K., Choy, P. T., Walter, G. H. (2008). The toxicological effects of petroleum spray oils on insects—Evidence for an alternative mode of action and possible new control options. *Food and Chemical Toxicology*, 46(9): 3003-3014.
86. Nari, A., Cardozo, H., Berdié, J., Canabez, F., Bawden, R. (1979). Estudio preliminar sobre la ecología de *Boophilus microplus* en Uruguay. Ciclo no parasitario en un área considerada poco apta para su desarrollo. *Veterinaria* 15(69): 25-31.
87. Núñez, J. L., Cobeñas, M. E. M., Moltedo, H. L. (1982). *Boophilus microplus*: la garrapata común del ganado vacuno. Buenos Aires, Hemisferio Sur, 184p.
88. Ojeda-Chi, M. M., Rodriguez-Vivas, R. I., Galindo-Velasco, E., Lezama-Gutiérrez, R. (2010). Laboratory and field evaluation of *Metarhizium anisopliae* (Deuteromycotina: Hyphomycetes) for the control of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) in the Mexican tropics. *Veterinary Parasitology*, 170(3-4): 348-354.

89. Ouedraogo, A., Fargues, J., Goettel, M. S., Lomer, C. J. (1997). Effect of temperature on vegetative growth among isolates of *Metarhizium anisopliae* and *M. flavoviride*. *Mycopathologia*, 137(1): 37-43.
90. Parizi, L. F., Reck Jr, J., Oldiges, D. P., Guizzo, M. G., Seixas, A., Logullo, C., da Silva Vaz Jr, I. (2012). Multi-antigenic vaccine against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: a field evaluation. *Vaccine*, 30(48): 6912-6917.
91. Perinotto, W. M. S., Angelo, I. C., Golo, P. S., Quinelato, S., Camargo, M. G., Sá, F. A., Bittencourt, V. R. E. P. (2012). Susceptibility of different populations of ticks to entomopathogenic fungi. *Experimental Parasitology*, 130(3): 257-260.
92. Polar, P., Kairo, M. T., Moore, D., Pegram, R., John, S. A. (2005a). Comparison of water, oils and emulsifiable adjuvant oils as formulating agents for *Metarhizium anisopliae* for use in control of *Boophilus microplus*. *Mycopathologia*, 160(2): 151-157.
93. Polar, P., de Muro, M. A., Kairo, M. T., Moore, D., Pegram, R., John, S. A., Roach-Benn, C. (2005b). Thermal characteristics of *Metarhizium anisopliae* isolates important for the development of biological pesticides for the control of cattle ticks. *Veterinary parasitology*, 134(1-2): 159-167.
94. Posadas, J. (2010). Selección de cepas de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* virulentas para el control microbiano de la garrapata *Rhipicephalus microplus*.
95. Quinelato, S., Golo, P. S., Perinotto, W. M., Sá, F. A., Camargo, M. G., Angelo, I. C., Bittencourt, V. R. (2012). Virulence potential of *Metarhizium anisopliae* sl isolates on *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* larvae. *Veterinary parasitology*, 190(3-4): 556-565.
96. Ren, Q., Liu, Z., Guan, G., Sun, M., Ma, M., Niu, Q., Yin, H. (2012). Laboratory evaluation of virulence of Chinese *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* isolates to engorged female *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* ticks. *Biological Control*, 63(2): 98-101.

97. Reck, J., Klafke, G. M., Webster, A., Dall'Agnol, B., Scheffer, R., Souza, U. A., de Souza Martins, J. R. (2014). First report of fluazuron resistance in *Rhipicephalus microplus*: a field tick population resistant to six classes of acaricides. *Veterinary Parasitology*, 201(1-2): 128-136.
98. Roberts, D. W., St Leger, R. J. (2004). *Metarhizium* spp., cosmopolitan insect-pathogenic fungi: mycological aspects. *Advances in Applied Microbiology*, 54(1): 1-70.
99. Rodríguez-Vivas, R. I., Quiñones, A. F., Fragoso, S. H. (2005). Epidemiología y control de la garrapata *Boophilus* en México. *Enfermedades de importancia económica en producción animal*. Rodríguez-Vivas, RI editor. México DF: McGraw-Hill, 571-592.
100. Rodríguez-Vivas, R. I., Arieta-Román, R. J., Perez-Cogollo, L. C., Rosado-Aguilar, J. A., Ramírez-Cruz, G. T., Basto-Estrella, G. (2010). Uso de lactonas macrocíclicas para el control de la garrapata *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* en el ganado bovino. *Archivos de Medicina Veterinaria*, 42(3): 115-123.
101. Samish, M., Rehacek, J. (1999). Pathogens and predators of ticks and their potential in biological control. *Annual Review of Entomology*, 44(1): 159-182.
102. Santi, L., Silva, W. O., Pinto, A. F., Schrank, A., Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* host-pathogen interaction: differential immunoproteomics reveals proteins involved in the infection process of arthropods. *Fungal Biology*, 114(4): 312-319.
103. Schrank, A., Vainstein, M. H. (2010). *Metarhizium anisopliae* enzymes and toxins. *Toxicon*, 56(7): 1267-1274.
104. Singh, D., Raina, T. K., Singh, J. (2017). Entomopathogenic Fungi: An Effective Biocontrol Agent for Management of Insect Populations Naturally. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 9(6): 833.
105. Stone, B.F. (1972). The genetics of resistance by ticks to acaricides. *Australian Veterinary Journal* 48: 345-350

106. Thomas, S. R., Elkinton, J. S. (2004). Pathogenicity and virulence. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(3): 146-151.
107. Thompson, K. C., Roa, J. E., Romero, T. N. (1978). Anti-tick grasses as the basis for developing practical tropical tick control packages. *Tropical Animal Health and Production*, 10(1): 179-182.
108. Utech, K. B. W., Wharton, R. H., Kerr, J. D. (1978). Resistance to *Boophilus microplus* (Canestrini) in different breeds of cattle. *Australian Journal of Agricultural Research*, 29(4): 885-895.
109. Vega, F. E., Goettel, M. S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M. A., Keller, S., Pell, J. K. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology*, 2(4):149-159.
110. Vega, F. E., Meyling, N. V., Luangsa-ard, J. J., Blackwell, M. (2012). Fungal entomopathogens. *Insect Pathology*. 171-220.
111. Walker, A. R. (2003). Ticks of domestic animals in Africa: a guide to identification of species (pp. 3-210) Edinburgh: Bioscience Reports.
112. Wang, C., St Leger, R. J. (2007). The MAD1 adhesin of *Metarhizium anisopliae* links adhesion with blastospore production and virulence to insects, and the MAD2 adhesin enables attachment to plants. *Eukaryotic cell*, 6(5): 808-816.
113. Watson, D. W., Geden, C. J., Long, S. J., Rutz, D. A. (1995). Efficacy of *Beauveria bassiana* for controlling the house fly and stable fly (Diptera: Muscidae). *Biological Control*, 5(3): 405-411.
114. Wharton, R. H. (1974). Ticks with special emphasis on *Boophilus microplus*. In *Control of arthropods of medical and veterinary importance*. Springer, Boston, 35-52
115. Webster, A., Reck, J., Santi, L., Souza, U. A., Dall'Agnol, B., Klafke, G. M., Schrank, A. (2015). Integrated control of an acaricide-resistant strain of the cattle tick *Rhipicephalus microplus* by applying *Metarhizium anisopliae* associated with cypermethrin and chlorpyrifos under field conditions. *Veterinary Parasitology*, 207(3-4): 302-308.

116. Webster, A., Pradel, E., Souza, U. A., Martins, J. R., Reck, J., Schrank, A., Klafke, G. (2017). Does the effect of a *Metarhizium anisopliae* isolate on *Rhipicephalus microplus* depend on the tick population evaluated? *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 8(2): 270-274.
117. Webster, A. (2017). Mecanismos de interação do carrapato *Rhipicephalus microplus* com o fungo acaropatogênico *Metarhizium anisopliae*. Tesis Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 130p.
1. Willadsen, P., Williams, P. G., Roberts, J. A., Kerr, J. D. (1978). Responses of cattle to allergens from *Boophilus microplus*. *International Journal for Parasitology*, 8(2): 89-95.
 2. Wekesa, V. W., Knapp, M., Maniania, N. K., Boga, H. I. (2006). Effects of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* on mortality, fecundity and egg fertility of *Tetranychus evansi*. *Journal of Applied Entomology*, 130(3): 155-159.
 3. Wondmeneh, J., Hill, S., Rännbäck, L. M., Ondiaka, S., Nagappan, R., Ignell, R. (2018). Evaluation of entomopathogenic fungi *Metarhizium anisopliae* against dengue virus mosquitoes *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Entomon*, 43(1): 7-18.
 4. Zimmermann, G. (1993). The entomopathogenic fungus *Metarhizium anisopliae* and its potential as a biocontrol agent. *Pesticide Science*, 37(4): 375-379.