

**Universidad Zamorano**  
**Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria**  
**Ingeniería Agronómica**



Proyecto Especial de Graduación  
**Uso de *Beauveria bassiana* B.y *Metarhizium anisopliae* M. como  
Biopesticidas para el Control de Garrapatas (*Rhipicephalus microplus*  
C.) en Época Seca en la Unidad de Ganado de Leche de Zamorano,  
Honduras**

Estudiante

Sinakan Tomás Saquic Mejía

Asesores

Rogelio Trabanino, M. Sc.

Marielena Moncada, Ph. D.

Honduras, octubre de 2025

**Autoridades**

**KEITH L. ADREWS**

Rector a. i.

**ANA M. MAIER ACOSTA**

Vicepresidenta y Decana Académica

**CELIA O. TREJO RAMOS**

Directora Departamento de Ciencia y Producción Agropecuaria

**JULIO NAVARRO**

Secretario General

## **Agradecimientos**

A mis donantes FONAGRO Y AGROBECA por su apoyo financiero en mis años de estudio.

## Contenido

Resumen .....	8
Abstract.....	9
Introducción.....	10
Materiales y Métodos.....	14
Ensayo I, Parte I. Determinación de la Efectividad en Campo de <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> y una Combinación de Ambos Hongos Entomopatógenos Frente al Control Químico con Amitraz sobre <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	14
Variable Medida.....	15
Diseño Estadístico .....	15
Ensayo I, Parte II. Determinación de la Infección Biológica <i>In Vitro</i> de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Metarhizium anisopliae</i> Sobre Adultos de <i>Rhipicephalus microplus</i> Recolectados Después de Aplicación en Campo.....	16
Variable Medida.....	16
Diseño Estadístico .....	17
Ensayo II. Determinación de la Efectividad Biológica <i>In Vitro</i> de Varias Concentraciones de <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> y una Mezcla de Ambos Hongos Entomopatógenos sobre <i>Rhipicephalus microplus</i> Adultas Frente al Tratamiento Químico.....	17
Variable Medida.....	19
Diseño Estadístico .....	19
Resultados y Discusión.....	20
Ensayo I. Determinación de la Efectividad en Campo de <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> y una Combinación de Ambos Hongos Entomopatógenos Frente al Control Químico con Amitraz Sobre <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	20

Porcentaje de Mortalidad en Campo de Cada Tratamiento Sobre <i>Rhipicephalus microplus</i> .....	20
Porcentaje de Infección Después de las Aplicaciones de los Tratamientos Sobre las Garrapatas Adultas .....	22
Ensayo II. Determinación de la Efectividad Biológica In Vitro de Dos Concentraciones de <i>Beauveria bassiana</i> , <i>Metarhizium anisopliae</i> y una Mezcla de Ambos Hongos Entomopatógenos Sobre <i>Rhipicephalus microplus</i> Adultas Frente al Tratamiento Químico.....	22
Tiempo Letal 50 (TL50) y 95 (TL95) .....	22
Conclusiones .....	25
Recomendaciones .....	26
Referencias.....	27
Anexos.....	30

### Índice de Cuadros

Cuadro 1 Tratamientos Ensayo I. Determinación de la efectividad en campo de <i>Beuveria bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> y una combinación de ambos hongos entomopatógenos frente al control químico con Amitraz sobre <i>Rhipicephalus microplus</i> . .....	15
Cuadro 2 Tratamientos Ensayo II. Determinación de la efectividad biológica in vitro de varias concentraciones de <i>Beuveria bassiana</i> , <i>M. anisopliae</i> y una mezcla de ambos hongos entomopatógenos sobre <i>Rhipicephalus microplus</i> adultas frente al tratamiento químico. ....	18
Cuadro 3 Porcentaje de mortalidad de <i>Rhipicephalus microplus</i> , en vacas secas tratadas durante cuatro semanas con <i>M. anisopliae</i> , <i>Beuveria bassiana</i> , su mezcla y el control químico (Amitraz 12.5%) en la Universidad Zamorano. ....	21
Cuadro 4 Porcentaje de infección en adultos de <i>Rhipicephalus microplus</i> colectados de vacas secas bajo tratamientos de control biológico, Universidad Zamorano, Honduras .....	22
Cuadro 5 Estimación de Tiempo Letal 50 (TL50) y 95 (TL95) de <i>M. anisopliae</i> , <i>Beuveria bassiana</i> , tratamiento combinado de <i>M. anisopliae</i> / <i>Beuveria bassiana</i> y control químico (Amitraz 12.5%) sobre garrapatas adultas obtenido por medio del análisis Probit.....	23

### Índice de Anexos

Anexo A Garrapatas en inserción de cola e isquiones.....	30
Anexo B Muestreo de garrapatas.....	31
Anexo C Aplicación de tratamientos.....	32

## Resumen

Este proyecto especial de graduación analizó la eficacia de los hongos entomopatógenos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* como una alternativa biológica para el control de garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) en el ganado lechero de la Universidad Zamorano, Honduras. Se evaluó la eficacia de seis tratamientos con distintas concentraciones de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, así como una mezcla de ambos hongos entomopatógenos, frente a un control químico, bajo un diseño completamente al azar con mediciones repetidas durante cuatro semanas. Las variables medidas fueron: porcentaje de mortalidad, porcentaje de infección y tiempo letal 50 y 95. Los resultados mostraron que el tratamiento químico presentó el porcentaje de mortalidad de garrapatas significativamente más alto 79.75% y tiempos letales de  $TL_{50} = 62.9$  horas;  $TL_{95} = 136.8$  horas. Mientras que, el tratamiento *M. anisopliae* en dosis de  $1.6 \times 10^{10}$  esporas/mL alcanzó un porcentaje de mortalidad de 47.55%, con  $TL_{50}$  de 68.9 horas;  $TL_{95}$  de 121.6 horas y porcentaje de infección in vitro del 97.5%, a la vez, el tratamiento *Beuveria bassiana* en dosis de  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/mL mostró un porcentaje de mortalidad de 50.13%, con tiempos letales más prolongados  $TL_{50}$  de 148.0 horas ;  $TL_{95}$  216 horas y porcentaje de infección de 95%, se posicionaron significativamente como los tratamientos con mayor porcentaje de control en en comparación a las concentraciones bajas de ambos organismos y estos a la vez fueron estadísticamente iguales a la mezcla de ambos hongos que alcanzó una mortalidad de 5.40%, una infección de 80% y un  $TL_{95}$  141.35 horas.

*Palabras clave:* Esporas, infección, mortalidad, tiempo letal

### Abstract

This special graduation project analyzed the efficacy of the entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* as a biological alternative for the control of ticks (*Rhipicephalus microplus*) in dairy cattle in Zamorano, Honduras. The efficacy of six treatments with different concentrations of *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae*, as well as a mixture of both entomopathogenic fungi, was evaluated against a chemical control, under a completely randomized design with repeated measurements over four weeks. The measured variables were: percentage of mortality, percentage of infection, and lethal times 50 and 95. The results demonstrated that the chemical treatment yielded a significantly higher tick mortality percentage of 79.75% and lethal times of  $TL_{50} = 62.9h$ ;  $TL_{95} = 136.8h$ . Meanwhile, the *Metarhizium anisopliae* treatment at a dose of  $1.6 \times 10^{10}$  spores/mL attained a mortality percentage of 47.55%, with  $TL_{50}$  of 68.9h;  $TL_{95}$  of 121.6 h, and an in vitro infection percentage of 97.5%. At the same time, the *Beuveria bassiana* treatment at a dose of  $2.2 \times 10^{10}$  spores/mL exhibited a mortality percentage of 50.13%, with longer lethal times  $TL_{50}$  of 148.0h;  $TL_{95}$  of 216h, and an infection percentage of 95%. These treatments were significantly positioned as those with the highest control percentage compared to the low concentrations of both organisms, and these, in turn, were statistically equal to the mixture of both fungi, which achieved a mortality of 5.40%, an infection of 80%, and a  $TL_{95}$  of 141.35h.

*Keywords:* Infection, lethal time, mortality, spores

## Introducción

Las garrapatas (*Rhipicephalus microplus*) representan uno de los ectoparásitos de mayor importancia económica en la ganadería, afectando severamente tanto la producción de leche como carne (Food and Agriculture Organization of the United Nations [FAO], 2025). En el contexto de Centroamérica existe una falta de estudios nacionales específicos cuantificados sobre su impacto económico, se han identificado reducción de peso y pérdidas de producción lechera en fincas de zonas como Catacamas, Olancho, Honduras, donde las infestaciones afectan directamente el rendimiento (Lepe López y Brizo-Murillo, 2022). A nivel mundial, estudios en países como Brasil permiten inferir el impacto económico, donde se han estimado pérdidas globales por garrapatas bovinas de alrededor de USD 968 millones de anuales, con hasta el 40% atribuible a la disminución de producción láctea (Rodrigues y Leite, 2013).

Jonsson (2006) explica que cada garrapata hembra completamente alimentada puede provocar una pérdida de peso promedio de 1.37 g en ganado *Bos taurus L.* mientras que en cruces con *Bos indicus L.* 1.18 g. La pérdida de producción láctea se estima en 13.9 L por vaca por periodo de lactancia con infestación baja, 56.9 L con infestación moderada y hasta 85.3 L con infestación alta de garrapatas (Singh et al., 2022). Estudios de Jiao et al. (2021) muestran que *R. microplus* puede ser vector de *Anaplasma marginale*, *Coxiella burnetii*, agentes patógenos que pueden causar enfermedades caracterizadas por anemia, problemas reproductivos, fiebre y debilidad.

Pérez-Otáñez et al. (2024) señalan que el control convencional de *Rhipicephalus microplus* en la ganadería depende fuertemente del uso de acaricidas sintéticos aplicados de forma repetida y rutinaria, lo que ha promovido el desarrollo de resistencia múltiple en poblaciones de garrapatas. A su vez Rodríguez-Hidalgo et al. (2017) obtuvieron resistencia del 67% para Amitraz, 50% para alfacipermetrina y del 25 al 42% para ivermectina en doce poblaciones analizadas en Ecuador.

En estudios recientes, diversos autores han documentado la resistencia en *R. microplus* a través de varios mecanismos, Obaid et al. (2022) reportan que se conocen tres formas principales de

resistencia a los acaricidas; Por un lado, Rosario-Cruz et al. (2009) explican el aumento de la detoxificación metabólica, mediado por familias enzimáticas como citocromos P-450, glutatión S-transferasas y carboxilesterasas, permiten al ácaro metabolizar o secuestrar los acaricidas antes de que ejerzan su efecto tóxico. Por su parte, Coles y Dryden (2014) mencionan “resistencia a la modificación del sitio objetivo” que se desarrolla a través de cambios conformacionales en el sitio objetivo del acaricida en enzimas neuronales y receptores, lo que conduce a una interacción deteriorada entre el fármaco y el objetivo. Mientras que, Obaid et al. (2022) menciona la resistencia a la penetración reducida, en la que disminuye el acceso de los acaricidas al entorno corporal interno debido a modificaciones en el exoesqueleto.

Sumada a esta problemática por resistencia a los acaricidas Alvarado Vega et al. (2021) detectaron residuos de amitraz, cipermetrina y clorpirifós en muestras de leche entera de vacas lecheras en Costa Rica, en algunos casos superando el límite máximo permitido comprometiendo la inocuidad del producto lácteo. Nanjundappa et al. (2021) reportan efectos adversos en los animales, como estrés metabólico, disminución en la producción de leche, alteraciones en el consumo de alimento, irritación cutánea y presencia de residuos en tejidos comestibles y leche.

Estos hallazgos refuerzan la necesidad de implementar alternativas sostenibles. Muniz et al. (2021) mencionan que *Beauveria bassiana* es uno de los hongos entomopatógenos más estudiados para el control de garrapatas. Por otro lado, Beys-da-Silva et al. (2020) destaca el alto potencial de *Metarhizium anisopliae* como agente controlador de artrópodos de forma individual o en asociación con otros productos como acaricidas químicos. St Leger (2008) menciona que el hongo entomopatógeno está ampliamente disperso en la naturaleza, encontrándose en el suelo, la rizosfera, raíces de plantas y los cadáveres de artrópodos infectando en condiciones saprofitas.

Ortiz-Urquiza y Keyhani (2016) explican que los conidios de estos hongos entomopatógenos infectan a las garrapatas a través de su cutícula o aberturas naturales, la colonización de este agente inicia con la adhesión de los conidios en el cutícula del huésped, la producción del tubo germinativo,

la diferenciación en apresorio, la penetración a través de la cutícula por presión mecánica en conjunto con acción enzimática de lipasas, proteasas y quitinasas, permitiendo el crecimiento dentro del tegumento y el hemocele del huésped. Una vez dentro, Rajput et al. (2024) mencionan que, los hongos entomopatógenos producen estructuras fúngicas como; racimos de micelios y blastosporas que producen toxinas en el cuerpo de la garrapata en el caso de *Beuveria bassiana* se producen *Beauvericin*, *Beauverolide*. Mientras que, en *M. anisopliae* se produce la toxina Dextruxina más metabolitos secundarios como los ácidos cítrico y oxálico. Wang et al. (2004), estas toxinas causan la destrucción de los procesos celulares, las trompas de Malpighi, los tejidos musculares, así como el intestino medio y una parálisis flácida en el cuerpo de la garrapata, que conduce a la muerte.

Alcalá-Gómez et al. (2024) han demostrado que cepas nativas de *Beuveria bassiana* (BbLn2021-1 y BbSF2021-1) pueden causar mortalidades de hasta el 96% - 100% en hembras de *Rhipicephalus microplus* adulto y reduciendo significativamente el índice reproductivo, indicando su alto potencial como alternativa biológica efectiva sin dejar residuos químicos en la leche ni impactos ambientales residuales, mientras que Sun et al. (2013) obtuvieron resultados de tiempo letal (TL50 y 90) de 7.14 y 9.33 días utilizando concentración de  $10^9$  conidios/mL, este parámetro (TL) se define como el período para que el agente de control provoque la mortalidad del 50 y 90% de una población por efecto de virulencia y velocidad de acción del patógeno.

Por su parte, Barbieri et al. (2023) evaluaron formulaciones oleosas de *M. anisopliae* en campo aplicadas con "spray race" en bovinos y reportaron reducciones de 55% a 66% entre los días 21 y 28 postratamiento, confirmando su viabilidad operativa frente a poblaciones resistentes a acaricidas. Mientras que, Abbasi (2025) obtuvo el total de la mortalidad de garrapatas in vitro a los 14 días con valores de tiempo letal 50 (TL50) de  $5.8 \pm 0.4$  días para *M. anisopliae* y  $6.9 \pm 0.5$  días para *Beuveria bassiana*, destacando una virulencia ligeramente mayor para *M. anisopliae*.

El objetivo de este estudio fue evaluar la eficacia de los hongos entomopatógenos *Beuveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae*, aplicados en diferentes concentraciones, así como una

combinación de ambos hongos, para el control de *Rhipicephalus microplus* en la Unidad de Ganado Lechero de la Universidad Zamorano durante la época seca, mediante la determinación de su efecto sobre la mortalidad, infección y los tiempos letales 50 y 95 en garrapatas adultas.

## Materiales y Métodos

Se realizaron dos ensayos, el primero realizado en campo (parte I) con una fase en laboratorio (parte II) y el segundo ensayo exclusivamente en laboratorio.

### **Ensayo I, Parte I. Determinación de la Efectividad en Campo de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y una Combinación de Ambos Hongos Entomopatógenos Frente al Control Químico con Amitraz sobre *Rhipicephalus microplus***

El ensayo se realizó en la Unidad de Ganado Lechero de la Universidad Zamorano, en el km 30 de la carretera que conduce a Danlí, en las coordenadas 14° latitud norte y 87° longitud oeste, con una precipitación de 1100 mm por año, una temperatura promedio de 25 °C y una altitud de 800 msnm, durante el 18 de marzo al 15 de abril de 2025.

Se seleccionaron 24 vacas secas con el mayor grado de infestación de garrapatas. Fueron separadas en seis grupos de cuatro vacas para conformar cada uno de los tratamientos, incluido el control, estas vacas fueron identificadas por collares de colores específicos para cada tratamiento.

Para cada animal se muestreó: parte ventral de barril, ubre, corvejón, inserción entre cola e isquiones (Anexo A) y cuello. Se cuantificó la cantidad de garrapatas en las áreas mencionadas utilizando un cuadrado de 20 por 20 cm y se contabilizó el total de garrapatas por cada área muestreada (Anexo B).

La aplicación de los tratamientos se realizó una vez por semana durante cuatro semanas, mientras que, el control químico se aplicó a intervalos de 15 días. Las aplicaciones se efectuaron al finalizar el ordeño matutino, después de las 8:00 am, aprovechando las instalaciones de la sala de ordeño para separar las vacas secas correspondientes a cada tratamiento. La aplicación se realizó con bombas de mochila de 16 L (Anexo C), utilizando 4 L por animal y adicionando 1 mL/L de adherente natural (INEX-A®). Posterior a la aplicación, se recolectaron garrapatas de las vacas secas de cada tratamiento, las cuales fueron almacenadas por separado en bolsas de cierre hermético rotuladas y trasladadas al laboratorio para evaluar el porcentaje de infección. Finalmente, las vacas secas fueron

devueltas al campo para continuar en pastoreo. Los tratamientos para el ensayo en campo se muestran a continuación.

### Cuadro 1

*Tratamientos Ensayo I. Determinación de la efectividad en campo de Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae y una combinación de ambos hongos entomopatógenos frente al control químico con Amitraz sobre Rhipicephalus microplus.*

Tratamiento	Producto comercial	Ingrediente activo	Concentración	Frecuencia de aplicación
T1	METAZAM®	<i>Metarhizium anisopliae</i>	$7.2 \times 10^9$ esporas/mL	1 vez por semana
T2	METAZAM®	<i>Metarhizium anisopliae</i>	$1.6 \times 10^{10}$ esporas/mL	1 vez por semana
T3	BAZAM®	<i>Beauveria bassiana</i>	$2.2 \times 10^{10}$ esporas/mL	1 vez por semana
T4	BAZAM®	<i>Beauveria bassiana</i>	$9.8 \times 10^8$ esporas/mL	1 vez por semana
T5	BAZAM® + METAZAM®	<i>Beauveria bassiana</i> + <i>Metarhizium anisopliae</i>	$9.8 \times 10^8$ y $7.2 \times 10^9$ esporas/mL respectivamente	1 vez por semana
T6	Trak®	Amitraz 12.5%	1 mL/L de agua	Cada 15 días

### Variable Medida

#### Porcentaje de Mortalidad.

Se obtuvo el porcentaje de mortalidad de cada uno de los tratamientos mediante la Ecuación 1 descrita en la metodología de Ruelas Nunes (2019).

$$\% \text{ Mortalidad} = \frac{N^{\circ} \text{ de garrapatas final}}{N^{\circ} \text{ de garrapatas inicial}} \times 100 \quad [1]$$

### Diseño Estadístico

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA), usando un modelo lineal general (GLM) y una separación de medias DUNCAN, se utilizó un diseño completamente al azar (DCA) para la variable medida: porcentaje de mortalidad. El nivel de significancia utilizado fue <0.05. Para el análisis se implementó el software Statistical Analysis System (SAS versión 9.4®).

## **Ensayo I, Parte II. Determinación de la Infección Biológica *In Vitro* de *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* Sobre Adultos de *Rhipicephalus microplus* Recolectados Después de Aplicación en Campo**

El ensayo se llevó a cabo durante la fase de campo (18 de marzo al 15 de abril de 2025) en el Laboratorio de Control Biológico de la Universidad Zamorano. Se recolectaron las muestras manualmente, con ayuda de pinzas, cinco garrapatas adultas de entre 5 a 10 mm de longitud (WingChing Jones, 2015) por cada vaca seca tratada con un agente biológico, acumulando un total de 20 garrapatas por tratamiento. Durante la recolección, se extrajeron cuidadosamente para evitar dañar el hipostoma y se depositaron en bolsas de cierre hermético rotuladas según el tratamiento correspondiente. Posteriormente, las muestras fueron trasladadas al laboratorio, donde se siguió el protocolo modificado de Ruelas Nunes (2019) para evaluar la efectividad de los distintos tratamientos de control biológico, la colecta de garrapatas se realizó en tres de las cuatro semanas aplicadas.

Las garrapatas se agruparon de acuerdo con su tratamiento y se distribuyeron en grupos de 10 garrapatas por caja Petri (8.5 cm de diámetro) cada una con un disco de papel toalla humedecido para mantener la humedad relativa, las placas Petri se incubaron en condiciones ambiente por un periodo de siete días, con el fin de evaluar el desarrollo de los agentes patógenos después de cada aplicación en campo.

### **Variable Medida**

#### **Porcentaje de Infección de los Tratamientos Sobre las Garrapatas Adultas.**

Se cuantificaron las garrapatas con estructuras fúngicas en cada placa Petri para evaluar el porcentaje de infección de *M. anisopliae* y *B. bassiana* mediante la Ecuación 2.

$$\% \text{ Infección} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de garrapatas con conidios}}{\text{N}^\circ \text{ de garrapatas total}} \times 100 \quad [2]$$

### **Diseño Estadístico**

Se realizó un análisis de varianza (ANDEVA) y una separación de medias DUNCAN para la variable: porcentaje de infección, el nivel de significancia utilizado fue  $p < 0.05$ , para este análisis se implementó el software Statistical Analysis System (SAS versión 9.4®).

### **Ensayo II. Determinación de la Efectividad Biológica In Vitro de Varias Concentraciones de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y una Mezcla de Ambos Hongos Entomopatógenos sobre *Rhipicephalus microplus* Adultas Frente al Tratamiento Químico**

El ensayo se realizó en junio de 2025 en el Laboratorio de Control biológico de la Universidad Zamorano. Se recolectaron 144 garrapatas adultas de entre 5 y 10 mm de longitud (WingChing Jones, 2015), obtenidas directamente de animales libres de tratamientos acaricidas pertenecientes a la Unidad de Ganado Lechero de Zamorano. La recolección se efectuó manualmente con ayuda de pinzas, levantando cuidadosamente los ejemplares para no dañar el hipostoma, siguiendo la metodología ligeramente modificada de Ruelas Nunes (2019). Posteriormente, las garrapatas se depositaron en frascos de vidrio de boca ancha, cubiertos con gasa humedecida, para su transporte al laboratorio.

En el laboratorio, los ejemplares fueron identificados con un estereoscopio, siguiendo la guía taxonómica de (Nava et al.) para garrapatas que parasitan bovinos. Una vez confirmada la identificación, se aplicó el protocolo modificado de Ruelas Nunes (2019) para evaluar la efectividad de los distintos tratamientos biológicos.

Los adultos se agruparon de acuerdo con su peso y se distribuyeron en grupos de seis garrapatas que sumaron un peso de 0.44 g por caja Petri de 8.5 cm de diámetro, cada una con un disco de papel toalla humedecido para mantener la humedad relativa. Antes de la aplicación de los tratamientos, las garrapatas fueron desinfectadas por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio al 2% durante un minuto, seguida de dos enjuagues de un minuto cada uno en agua estéril. Posteriormente, se colocaron sobre papel absorbente para retirar el exceso de humedad, se pesaron

individualmente y se asignaron a cada tratamiento procurando homogeneidad en el peso entre los grupos (0.44 g).

Se seleccionaron 144 garrapatas distribuidas en ocho tratamientos, con tres repeticiones por tratamiento y seis unidades observacionales (garrapatas) por unidad experimental. Los tratamientos evaluados se muestran a continuación.

## Cuadro 2

*Tratamientos Ensayo II. Determinación de la efectividad biológica in vitro de varias concentraciones de Beauveria bassiana, Metarhizium anisopliae y una mezcla de ambos hongos entomopatógenos sobre Rhipicephalus microplus adultos frente al tratamiento químico.*

Tratamiento	Producto comercial	Ingrediente activo	Concentración
T1	METAZAM®	<i>Metarhizium anisopliae</i>	$7.2 \times 10^9$ esporas/mL
T2	METAZAM®	<i>Metarhizium anisopliae</i>	$1.6 \times 10^{10}$ esporas/mL
T3	BAZAM®	<i>Beauveria bassiana</i>	$2.2 \times 10^{10}$ esporas/mL
T4	BAZAM®	<i>Beauveria bassiana</i>	$9.84 \times 10^8$ esporas/mL (Fernández, 2006)
T5	BAZAM® + METAZAM®	<i>Beauveria bassiana</i> + <i>Metarhizium anisopliae</i>	$9.84 \times 10^8$ y $7.2 \times 10^9$ esporas/mL respectivamente
T6	Amitraz 12.5%	Amitraz (acaricida químico)	1 mL/L de agua
T7	Adherente	—	1mL/L de agua
T8	Agua estéril	—	—

Cada tratamiento fue aplicado mediante inmersión de las garrapatas en la solución correspondiente durante 3 minutos. Luego las garrapatas se colocaron en sus respectivas placas Petri con papel toalla humedecida, que fue rehidratado cada 24 horas para mantener condiciones constantes de humedad relativa.

***Variable Medida*****Tiempo Letal 50 (TL50) y 95 (TL95).**

Se realizaron observaciones cada 24 horas, registrando la cantidad de garrapatas muertas diariamente hasta alcanzar la mortalidad del total de garrapatas de cada tratamiento.

***Diseño Estadístico***

Los datos obtenidos fueron analizados mediante el procedimiento Probit utilizando el software Statistical Analysis System (SAS versión 9.4®) el cual permitió estimar el porcentaje de mortalidad en función del tiempo.

## Resultados y Discusión

### Ensayo I. Determinación de la Efectividad en Campo de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y una Combinación de Ambos Hongos Entomopatógenos Frente al Control Químico con Amitraz Sobre *Rhipicephalus microplus*

#### Porcentaje de Mortalidad en Campo de Cada Tratamiento Sobre *Rhipicephalus microplus*

El análisis del porcentaje de mortalidad de garrapatas (Cuadro 3) respecto a la población inicial evidenció diferencias significativas entre tratamientos durante las cuatro semanas de evaluación ( $p < 0.0001$ ) posteriores al muestreo y aplicación de tratamientos en el día uno. Los valores de  $R^2$  obtenidos de la semana uno a la cuatro (entre 0.84 – 0.92) indican que los modelos explican gran parte del comportamiento de los resultados, y los coeficientes de variación (entre 31 – 49%) sobrepasan el valor estándar aceptado, sin embargo, al tratarse de un ensayo en campo, se pueden considerar como valores aceptables.

A los siete días después de la primera aplicación, el tratamiento químico presentó el mayor porcentaje de mortalidad, significativamente superior al resto de los tratamientos, se observó una acción inmediata sobre el control de *R. microplus*. Este resultado coincide con Schrank y Vainstein (2010) quienes mencionan la rapidez de los acaricidas químicos. En contraste, los tratamientos con hongos entomopatógenos mostraron una respuesta progresiva. En la primera semana, el tratamiento *M. anisopliae*  $1.6 \times 10^{10}$  esporas/mL (concentración mayor) presentó el porcentaje de control más alto significativamente (28.6%) de los tratamientos biológicos, el tratamiento *B. bassiana*  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/mL (concentración mayor) presentó un porcentaje de control de 14.8% el cual fue estadísticamente igual a los tratamientos *M. anisopliae*  $7.2 \times 10^9$  esporas/mL (concentración menor) y la mezcla entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*. El tratamiento *B. bassiana*  $9.84 \times 10^8$  esporas/mL (concentración menor) presentó el porcentaje de mortalidad más bajo estadísticamente, en comparación al resto de tratamientos.

A los 15 días después de la primera aplicación, la eficacia de los hongos aumentó, registrando 29.77% (*M. anisopliae*  $1.6 \times 10^{10}$  esporas/mL), 28.33% (*M. anisopliae*  $7.2 \times 10^9$  esporas/mL) y 29.09% (*B. bassiana*  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/mL) presentando el mismo porcentaje de control estadísticamente, siendo superiores a los tratamientos *B. bassiana*  $9.84 \times 10^8$  esporas/mL y la mezcla entre *B. bassiana* y *M. anisopliae*. Por otro lado, 21 días después de la primera aplicación, la tendencia se mantuvo: estadísticamente el químico lideró con 73.66% de mortalidad, mientras que *B. bassiana* aumentó a 33.37%, superando a *M. anisopliae* 21.69%. Estos valores sugieren que *B. bassiana* puede desarrollar mejor desempeño en un tiempo más prolongado como se muestra en el estudio de Abbasi (2025).

A los 28 días después de la primera aplicación, los tratamientos con las concentraciones más alta *B. bassiana*  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/mL 50.13% y *M. anisopliae*  $1.6 \times 10^{10}$  esporas/mL 47.55% presentaron los mayores porcentajes de mortalidad, con relación a los tratamientos de menor concentración y la mezcla de ambos hongos entomopatógenos. Estos resultados concuerdan a los obtenidos por Barbieri et al. (2023) quienes documentaron en ensayos de campo reducciones de 55% a 66% entre los días 21 y 28 postratamiento.

### Cuadro 3

*Porcentaje de mortalidad de Rhipicephalus microplus, en vacas secas tratadas durante cuatro semanas con Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana, su mezcla y el control químico (Amitraz 12.5%) en la Universidad Zamorano.*

Tratamientos	Mortalidad (%)			
	Días después de la primera aplicación			
	1	2	3	4
Químico	60.5a $\psi$	70.2a	73.7a	79.8a
<i>B. bassiana</i> ( $2.2 \times 10^{10}$ esporas/mL)	14.8c	29.1b	33.4b	50.1b
<i>B. bassiana</i> ( $9.84 \times 10^8$ esporas/mL)	2.1d	1.5c	10.4c	21.1c
<i>M. anisopliae</i> ( $1.6 \times 10^{10}$ esporas/mL)	28.6b	29.8b	21.7bc	47.6b
<i>M. anisopliae</i> ( $7.2 \times 10^9$ esporas/mL)	11.2cd	28.4b	12.2c	17.4c
<i>B. bassiana</i> / <i>M. anisopliae</i>	5.8cd	4.5c	8.0c	5.4c
Probabilidad	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001
CV (%)	35.55	31.19	48.69	32.5
R <sup>2</sup>	0.92	0.92	0.84	0.88

Nota.  $\psi$  valores con letras distintas en la columna presentan diferencias significativas según la prueba Duncan ( $p \leq 0.05$ ).

**Porcentaje de Infección Después de las Aplicaciones de los Tratamientos Sobre las Garrapatas Adultas**

Los resultados de la prueba para determinar el porcentaje de infección en adultos de *Rhipicephalus microplus* después de la aplicación de los tratamientos en campo se puede observar en el Cuadro 4 donde los tratamientos *M. anisopliae*  $1.6 \times 10^{10}$  y *B. bassiana*  $2.2 \times 10^{10}$  presentaron los porcentajes de infección más altos y estadísticamente iguales. Esto indicó que las infecciones se manifiestan con un alto porcentaje cuando se utiliza la concentración más alta para ambos organismos, mientras que, al utilizar concentraciones bajas se observa porcentajes de infección menores como se observa en los tratamientos *M. anisopliae*  $7.2 \times 10^9$  y *B. bassiana*  $9.84 \times 10^8$ .

**Cuadro 4**

*Porcentaje de infección en adultos de Rhipicephalus microplus colectados de vacas secas bajo tratamientos de control biológico, Universidad Zamorano, Honduras*

Tratamientos	Infección (%)
<i>B. bassiana</i> ( $2.2 \times 10^{10}$ esporas/mL)	95.00a $\psi$
<i>B. bassiana</i> ( $9.84 \times 10^8$ esporas/mL)	67.50c
<i>M. anisopliae</i> ( $1.6 \times 10^{10}$ esporas/mL)	97.50a
<i>M. anisopliae</i> ( $7.2 \times 10^9$ esporas/mL)	82.50b
<i>Beauveria bassiana</i> / <i>Metarhizium anisopliae</i>	80.00b
Control	0.00d
Probabilidad	0.0041
R2	0.96
CV (%)	4.58

$\psi$ : valores con letras distintas en la columna presentan diferencias significativas según la prueba Duncan ( $P \leq 0.05$ ).

**Ensayo II. Determinación de la Efectividad Biológica In Vitro de Dos Concentraciones de *Beauveria bassiana*, *Metarhizium anisopliae* y una Mezcla de Ambos Hongos Entomopatógenos Sobre *Rhipicephalus microplus* Adultas Frente al Tratamiento Químico**

**Tiempo Letal 50 (TL50) y 95 (TL95)**

El análisis de los datos obtenidos con el procedimiento Probit con límites de confianza del 95% (LF95) muestra que el tratamiento químico (Amitraz 12.5%) presentó un tiempo letal  $TL_{50}$  de 62.93 horas (rango 48.05 a 75.13 horas) y el tratamiento *M. anisopliae* ( $1.6 \times 10^{10}$  esporas/mL) con tiempo

letal  $TL_{50}$  de 68.96 horas (rango 58.17 a 78.85 horas) (Cuadro 5). Ambos mostraron los menores tiempos letales 50, estadísticamente iguales, evidenciando la rapidez para infectar adultos de *Rhipicephalus microplus* cuando se aplica en concentraciones críticas y condiciones apropiadas, logrando ser una alternativa prometedora para el control de garrapatas como sugiere Kirkland et al. (2004). Los tratamientos *M. anisopliae*  $7.2 \times 10^9$  esporas/mL y la mezcla de *B. bassiana* con *M. anisopliae* presentaron tiempos letales 50 de 105.53 y 109.22 horas respectivamente fueron estadísticamente iguales. Mientras que, *B. bassiana*  $2.2 \times 10^{10}$  esporas/mL con  $TL_{50}$  de 148.05 horas y *B. bassiana*  $9.84 \times 10^8$  esporas/mL con  $TL_{50}$  de 183.16 horas fueron estadísticamente diferentes entre sí y el resto de los tratamientos, evidenciando que su acción es más lenta que la de *M. anisopliae*, comportamiento similar al obtenido por Abbasi (2025) quien obtuvo tiempos letales mayores para *B. bassiana* en comparación a *M. anisopliae*.

Los resultados obtenidos del tiempo letal 95 ( $TL_{95}$ ) indican que los tratamientos *M. anisopliae* ( $1.6 \times 10^{10}$  esporas/mL), *M. anisopliae*  $7.2 \times 10^9$  esporas/mL, la mezcla de *B. bassiana* con *M. anisopliae* presentaron los  $TL_{95}$  más cortos y estos fueron estadísticamente iguales al tratamiento químico, comportamiento que es descrito por Fernandes et al. (2012) quien menciona la alta eficiencia de los hongos entomopatógenos bajo condiciones de laboratorio, aunque en campo a menudo puede ser menor. Por otro lado, los tiempos letales 95 ( $TL_{95}$ ) de los tratamientos con *B. bassiana* fueron estadísticamente más largos que los demás tratamientos, manteniendo la tendencia mostrada en  $TL_{50}$ .

## Cuadro 5

*Estimación de Tiempo Letal 50 (TL50) y 95 (TL95) de Metarhizium anisopliae, Beauveria bassiana, tratamiento combinado de M. anisopliae con B. bassiana y control químico (Amitraz 12.5%) sobre garrapatas adultas obtenido por medio del análisis Probit*

Tratamiento	TL50 h (LF95%)		TL95 h (LF95%)	
Químico	62.94a $\psi$		136.82a	
<i>M. anisopliae</i> ( $1.6 \times 10^{10}$ esporas/mL)	48.05	75.13	118.39	169.15
	68.96a		121.57a	
<i>B. bassiana</i> ( $2.2 \times 10^{10}$ esporas/mL)	58.17	78.85	106.99	147.22
	148.05		183.16	

Tratamiento	TL50 h (LF95%)		TL95 h (LF95%)	
<i>M. anisopliae</i> ( $7.2 \times 10^9$ esporas/mL)	105.53b		133.92a	
	97.97	112.98	124.11	153.2
<i>B. bassiana</i> / <i>M. anisopliae</i>	109.22b		141.35a	
	101.34	117.15	130.63	161.71
<i>B. bassiana</i> ( $2.2 \times 10^{10}$ esporas/mL)	148.05c		216.38b	
	136.73	159.06	200.21	240.77
<i>B. bassiana</i> ( $9.84 \times 10^8$ esporas/mL)	183.16d		275.20c	
	170.14	196.01	255.35	303.98

ψ: valores con letras distintas en la columna presentan diferencias significativas según el análisis de límites. Probit. LF: límite fiducial de confianza.

### Conclusiones

Los hongos entomopatógenos demostraron ser una alternativa viable para el control de *Rhipicephalus microplus*, ya que, aunque su acción es más lenta en comparación con el acaricida químico, mantienen una eficacia acumulada en el tiempo ofreciendo ventajas ambientales y sostenibles frente a las limitaciones de los tratamientos químicos.

*Metarhizium anisopliae* mostró una respuesta más rápida en comparación a *Beauveria bassiana*, pero ambas especies alcanzaron niveles de control similares a largo plazo, lo que confirma su aplicabilidad como herramientas de manejo integrado de garrapatas.

El uso de hongos entomopatógenos en concentraciones altas constituye una estrategia prometedora para reducir la dependencia de acaricidas químicos, contribuyendo a mitigar problemas de resistencia, residualidad en productos de origen animal e impactos negativos en el ambiente.

### Recomendaciones

Evaluar la eficacia del uso de *Metarhizium anisopliae* aplicado directamente en potreros (bebederos, cercas y zonas de descanso) para reducir la carga de larvas infectantes de *Rhipicephalus microplus*.

Investigar programas de rotación y asociación entre control biológico y químico como estrategias para retrasar la aparición de resistencia en poblaciones garrapatas.

Analizar la influencia de factores ambientales (humedad, radiación solar y temperatura) sobre la persistencia y virulencia de *Metarhizium anisopliae* en condiciones de campo.

Evaluar la efectividad de las concentraciones más altas de ambos hongos entomopatógenos combinados durante un periodo de al menos ocho semanas o más, hasta alcanzar un control sostenido de *Rhipicephalus microplus*.

## Referencias

- Abbasi, E. (2025). Potential of Entomopathogenic Fungi for the Biocontrol of Tick Populations. *Foodborne Pathogens and Disease*. Publicación en línea avanzada. <https://doi.org/10.1089/fpd.2025.0057>
- Alcalá-Gómez, J., Alcalá-Gómez, G., Balleza-Díaz Barriga, K. G., Vite-Méndez, G. d. J. y Reyes-Hernández, M. (2024). *Beauveria bassiana* native strains affect the reproductive index of *Rhipicephalus microplus* ticks. *Experimental & Applied Acarology*, 93(2), 485–496. <https://doi.org/10.1007/s10493-024-00942-3>
- Alvarado Vega, C., Briceño Guevara, S., Matarrita-Rodríguez, J., Masís-Mora, M., Pérez-Rojas, G. y WingChing-Jones, R. (2021). Residuos de acaricidas en leche entera bovina de Costa Rica. *UNED Research Journal*, 14(1), 3787. <https://doi.org/10.22458/urj.v14i1.3787>
- Barbieri, A., Rico, I. B., Silveira, C., Feltrin, C., Dall Agnol, B., Schrank, A [A.], Lozina, L., Klafke, G. M. y Reck, J. (2023). Field efficacy of *Metarhizium anisopliae* oil formulations against *Rhipicephalus microplus* ticks using a cattle spray race. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 14(3), 102147. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102147>
- Beys-da-Silva, W. O., Rosa, R. L., Berger, M., Coutinho-Rodrigues, C. J. B., Vainstein, M. H [Marilene H.], Schrank, A [Augusto], Bittencourt, V. R. E. P. y Santi, L. (2020). Updating the application of *Metarhizium anisopliae* to control cattle tick *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Experimental Parasitology*, 208, 107812. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2019.107812>
- Coles, T. B. y Dryden, M. W. (2014). Insecticide/acaricide resistance in fleas and ticks infesting dogs and cats. *Parasites & Vectors*, 7, 8. <https://doi.org/10.1186/1756-3305-7-8>
- Fernandes, É. K. K., Bittencourt, V. R. E. P. y Roberts, D. W. (2012). Perspectives on the potential of entomopathogenic fungi in biological control of ticks. *Experimental Parasitology*, 130(3), 300–305. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.11.004>
- Fernández, J. A. (2006). *Evaluación de la eficiencia del control de garrapatas (Boophilus microplus) con tres frecuencias de aplicación de BAZAM® (Beauveria bassiana)* [Proyecto Especial de Graduación, Escuela Agrícola Panamericana, Zamorano, Honduras]. RIS. <https://bdigital.zamorano.edu/handle/11036/803>
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. (2025). *Livestock tick control: FAO — Animal health: Areas of work*.
- Jiao, J., Zhang, J., He, P., OuYang, X., Yu, Y., Wen, B., Sun, Y., Yuan, Q. y Xiong, X. (2021). Identification of Tick-Borne Pathogens and Genotyping of *Coxiella burnetii* in *Rhipicephalus microplus* in Yunnan Province, China. *Frontiers in Microbiology*, 12, 736484. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.736484>
- Jonsson, N. N. (2006). The productivity effects of cattle tick (*Boophilus microplus*) infestation on cattle, with particular reference to *Bos indicus* cattle and their crosses. *Veterinary Parasitology*, 137(1-2), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2006.01.010>
- Kirkland, B. H., Westwood, G. S. y Keyhani, N. O [Nemat O.] (2004). Pathogenicity of entomopathogenic fungi *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* to Ixodidae tick species *Dermacentor variabilis*, *Rhipicephalus sanguineus*, and *Ixodes scapularis*. *Journal of Medical Entomology*, 41(4), 705–711. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-41.4.705>

- Lepe López, M. A. y Brizo-Murillo, J. M. (2022). Evaluación in vitro de cinco ixodicidas contra *Rhipicephalus microplus* en Catacamas, Olancho, Honduras. *Revista MVZ Córdoba*, 27(2), e2463. <https://doi.org/10.21897/rmvz.2463>
- Muniz, E. R., Ribeiro-Silva, C. S., Arruda, W., Keyhani, N. O [Nemat O.] y Fernandes, É. K. K. (2021). The Msn2 Transcription Factor Regulates Acaricidal Virulence in the Fungal Pathogen *Beauveria bassiana*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 11, 690731. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.690731>
- Nanjundappa, S., Nair, S. N., Udayan, D., Kanapadinchareveetil, S., Jacob, M., Ravindran, R. y Juliet, S. (2021). Disposition Kinetics of Amitraz in Lactating Does. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 26(16). <https://doi.org/10.3390/molecules26164769>
- Nava, S., Mangol, A., Simonato, G., Punti, E. y Spruat, M. *Guía para la identificación de los principales especies de garrapatas que parasitan a los bovinos en la provincia de Entre Ríos, Argentina.*
- Obaid, M. K., Islam, N., Alouffi, A., Khan, A. Z., Da Silva Vaz, I., Tanaka, T. y Ali, A. (2022). Acaricides Resistance in Ticks: Selection, Diagnosis, Mechanisms, and Mitigation. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12, 941831. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.941831>
- Ortiz-Urquiza, A. y Keyhani, N. O [N. O.] (2016). Molecular Genetics of *Beauveria bassiana* Infection of Insects. *Advances in Genetics*, 94, 165–249. <https://doi.org/10.1016/bs.adgen.2015.11.003>
- Pérez-Otáñez, X., Vanwambeke, S. O., Orozco-Alvarez, G., Arciniegas-Ortega, S., Ron-Garrido, L. y Rodríguez-Hidalgo, R. (2024). Widespread acaricide resistance and multi-resistance in *Rhipicephalus microplus* in Ecuador and associated environmental and management risk factors. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, 15(1), 102274. <https://doi.org/10.1016/j.ttbdis.2023.102274>
- Rajput, M., Sajid, M. S., Rajput, N. A., George, D. R., Usman, M., Zeeshan, M., Iqbal, O., Bhutto, B., Atiq, M., Rizwan, H. M., Daniel, I. K. y Sparagano, O. A. (2024). Entomopathogenic Fungi as Alternatives to Chemical Acaricides: Challenges, Opportunities and Prospects for Sustainable Tick Control. *Insects*, 15(12). <https://doi.org/10.3390/insects15121017>
- Rodrigues, D. S. y Leite, R. C. (2013). Economic impact of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*: estimate of decreased milk production on a dairy farm. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia*, 65(5), 1570–1572. <https://doi.org/10.1590/S0102-09352013000500039>
- Rodríguez-Hidalgo, R., Pérez-Otáñez, X., Garcés-Carrera, S., Vanwambeke, S. O., Madder, M. y Benítez-Ortiz, W. (2017). The current status of resistance to alpha-cypermethrin, ivermectin, and amitraz of the cattle tick (*Rhipicephalus microplus*) in Ecuador. *PLoS One*, 12(4), e0174652. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174652>
- Rosario-Cruz, R., Almazan, C., Miller, R. J., Dominguez-Garcia, D. I., Hernandez-Ortiz, R. y La Fuente, J. de (2009). Genetic basis and impact of tick acaricide resistance. *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 14(7), 2657–2665. <https://doi.org/10.2741/3403>
- Ruelas Nunes. (2019). *Evaluacion-In-Vitro-De-Hongos-Entomopatogenos-En-El-Control-De-La-Garrapata-Del-Ganado-Bovino* [Artículo Científico]. Universidad de Oriente, Venezuela.

- Schrank, A [Augusto] y Vainstein, M. H [Marilene Henning] (2010). Metarhizium anisopliae enzymes and toxins. *Toxicon : Official Journal of the International Society on Toxinology*, 56(7), 1267–1274. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.03.008>
- Singh, K., Kumar, S., Sharma, A. K., Jacob, S. S., RamVerma, M., Singh, N. K., Shakya, M., Sankar, M. y Ghosh, S. (2022). Economic impact of predominant ticks and tick-borne diseases on Indian dairy production systems. *Experimental Parasitology*, 243, 108408. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2022.108408>
- St Leger, R. J. (2008). Studies on adaptations of Metarhizium anisopliae to life in the soil. *Journal of Invertebrate Pathology*, 98(3), 271–276. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2008.01.007>
- Sun, M., Ren, Q., Guan, G., Li, Y., Han, X., Ma, C., Yin, H. y Luo, J. (2013). Effectiveness of Beauveria bassiana sensu lato strains for biological control against Rhipicephalus (Boophilus) microplus (Acari: Ixodidae) in China. *Parasitology International*, 62(5), 412–415. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.04.008>
- Wang, C., Skrobek, A. y Butt, T. M. (2004). Investigations on the destruxin production of the entomopathogenic fungus Metarhizium anisopliae. *Journal of Invertebrate Pathology*, 85(3), 168–174. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2004.02.008>
- WingChing Jones, R. (2015). Extracción manual de garrapatas Rhipicephalus (Boophilus) microplus en ganado bovino como estrategia de control. *Nutrición Animal Tropical*, 9(1), 88. <https://doi.org/10.15517/nat.v9i1.19393>

**Anexos**

**Anexo A**

*Garrapatas en inserción de cola e isquiones.*



**Anexo B**

*Muestreo de garrapatas.*



**Anexo C**

*Aplicación de tratamientos.*

