



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Veterinarias

Corrientes-Argentina

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

-MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA-

OPCIÓN: Clínica de Grandes Animales

TEMA: “*Haematobia irritans*: diagnóstico a campo de resistencia frente a Abamectina”

TUTOR EXTERNO: Dra. Lozina, Laura Analía

TUTOR INTERNO: MV. Lozina, Josefina Jorgelina

RESIDENTE: Delfino, Matias

e-mail: delmatias9@gmail.com

-AÑO 2022-

ÍNDICE

RESUMEN.....	Pág. 2
INTRODUCCIÓN.....	Pág. 3
OBJETIVOS.....	Pág. 5
MATERIALES Y METODOS.....	Pág. 6
RESULTADOS.....	Pág. 14
DISCUSIÓN	Pág. 19
CONCLUSIÓN.....	Pág. 24
BIBLIOGRAFÍA.....	Pág. 25

Resumen:

El presente trabajo tuvo como finalidad determinar la resistencia de poblaciones de campo de *H. irritans*, frente a Abamectina en establecimientos ganaderos de la provincia de Corrientes, en el período establecido entre el mes de marzo y junio de 2022. Se realizaron bioensayos con concentraciones crecientes de Abamectina, que comprendían la sobrevida y la mortalidad total, empleando el método de Sheppard y Hinkle (1987), el cual consistía en impregnar papeles de filtro Whatman N°1, con las diferentes concentraciones y dispuestos en placas de Petri de 9 cm de diámetro. Cepas de campo fueron sometidas al bioensayo, por un tiempo de 2hs, y realizando el recuento de vivas y muertas luego de haber transcurrido dicho tiempo. A partir de estos datos, que fueron procesados empleando el programa estadístico Polo Plus 1.0, se logró obtener la DL (Dosis letal)₅₀, DL₉₀, DL₉₉ y DD (Dosis discriminante), y mediante estas, se comparó el comportamiento de *H. irritans* en cada uno de los 7 establecimientos testados, determinando una mayor susceptibilidad en el establecimiento N°2, en comparación con el N°6 y 7, en los que se observó una menor susceptibilidad frente Abamectina.

Introducción

La “mosca de los cuernos”, *Haematobia irritans irritans*, es un díptero hematófago, que parasita principalmente a bovinos en pastoreo, originaria de Europa Central (Mancebo *et al.*, 2001). En 1886 fue introducida a América del Norte desde Francia y se extendió a América del Sur en la década de 1970 (FAO, 2004), llegando a la Argentina el 29 de octubre de 1991 desde Brasil, donde se observaron sobre bovinos en pastoreo en la Provincia de Misiones, y a fines de ese año se verifica su presencia en Formosa, Corrientes y Santa Fe (Mancebo *et al.*, 2001). Actualmente su distribución en Argentina coincide con la mayoría de las regiones donde se crían bovinos, alcanzando áreas tan al sur, como la zona centro de la provincia de Santa Cruz (Aguilar, 2014). *Haematobia irritans*, es un pequeño díptero que mide entre 2 y 5 mm de longitud, de color gris oscuro, siendo el más pequeño de los múscidos picadores del bovino. Su estadio adulto parasita a bovinos en pastoreo de manera permanente, al cual abandonan solamente para depositar los huevos, en la materia fecal de reciente deposición (Tarelli, 2004). Se ubica principalmente en zonas dorsales del animal, próximas a los cuernos, giba, lomo y región costal, con la cabeza dirigida hacia el suelo y las alas abiertas tipo “ala delta”. Frente a situaciones extremas de calor y lluvias, se ubica en entrepiernas y parte inferior del abdomen (Mancebo *et al.*, 2001). Su ciclo biológico corresponde al tipo holometábolo, teniendo los estadios de huevo, larva (L1, L2 y L3), pupa y adulto, con una duración de 10 a 14 días en el verano, mientras que en el otoño comienza a enlentecerse y en el invierno, parte de la población de *H. irritans* puede entrar en diapausa bajo la forma de pupa y el resto continuar en desarrollo (Anziani, 2011). La disrupción de la materia fecal por el pisoteo de los animales o por medios mecánicos interfiere con el ciclo, por lo que es una parasitosis que se observa en condiciones extensivas y semiextensivas (Anziani *et al.*, 2017), ya que la materia fecal de bovino es la única que permite la evolución de los huevos (Butler, *et al.*, 1973). La mosca adulta tiene preferencia por parasitar bovinos adultos de pelaje oscuro y sobre todo machos enteros (toros), que se infestan con cargas más altas. En cuanto a la dinámica poblacional, en el norte de Argentina, se observa un aumento de la Mosca de los Cuernos a fines de septiembre y principios de octubre, producto del final de la diapausa, siendo esto de suma utilidad para establecer el momento correcto de aplicación de los insecticidas (Mancebo *et al.*, 2001).

Importancia económica y sanitaria:

Las pérdidas económicas están en relación directa con los niveles de parasitación, estableciendo como límite de tolerancia 200-300 moscas por animal. Cuando sobrepasa este límite, el animal manifiesta pérdidas de ganancia diaria de peso, y por encima de 1000 moscas, comienza a perder su propio peso (Haufe, 1986). Estas pérdidas se deben principalmente a la acción irritante causada por las picaduras, provocando un estado de intranquilidad y estrés, obligándolos a realizar movimientos continuos de defensa, causando pérdida de energía y disminución del tiempo de alimentación, llevando a mermas del 25% en la producción de carne y leche. A esto debe sumarse el costo de los insumos empleados para su control, las pérdidas indirectas por las enfermedades que transmiten, y la desvalorización de los cueros (Byford *et al.*, 1992; Campbell, 1976; Mancebo *et al.*, 2001). Debido a estas pérdidas de producción y costos de control, EE.UU. y Argentina estimaron pérdidas de 730 y 125 millones de dólares anuales, respectivamente (Grigera *et al.*, 2001; Grisi *et al.*, 2014). Una infestación de 200 moscas por animal ha sido aceptada como el umbral para realizar el tratamiento en las razas bovinas europeas (Kunz *et al.*, 1994; FAO, 2004), concentrando estos, en las vacas en ordeño, toros en servicio y novillos en los últimos dos meses del ciclo de engorde, siendo estas las categorías que presentan mayores pérdidas. (Mancebo *et al.* 2001, Bianchin *et al.*, 1993).

Bioensayos como diagnóstico de resistencia:

La problemática causada por la aparición de la resistencia a numerosos antiparasitarios convencionales, surge la necesidad de desarrollar nuevos productos, ya que el control de los parásitos del ganado todavía depende en gran medida del uso de productos químicos (Souza *et al.*, 2008). Para la evaluación y aprobación de los mismos, es necesario contar con ciertas técnicas especializadas que se conocen como *bioensayos o ensayos in vitro*. Estos son empleadas para conocer las reacciones de algún organismo ante la presencia controlada a una o varias sustancias, permitiéndonos identificar la eficacia y estandarizar el uso de estas sustancias antes de realizar evaluaciones con vertebrados en condiciones *in vivo* (Ávila Cervantes *et al.*, 2019). En el bioensayo realizado, se empleó la técnica de papel de filtro / placa de Petri según Sheppard & Hinkle (1987) y como sustancia antiparasitaria Abamectina. Esta técnica, se encuentra descripta para la determinación de susceptibilidad de la mosca de los cuernos frente a diferentes insecticidas, empleando residuos de moléculas en diferentes concentraciones. Se utilizan como soporte Papeles de filtro Whatman N°1, que son impregnados con la

droga e introducidos en placas de Petri de plástico, donde al cabo de dos horas de exposición, se contabiliza el número de ejemplares vivos y muertos mediante observación directa (FAO, 2004; Castelli *et al.*, 2000 y 2005). En cuanto a la Abamectina, es una avermectina B1a caracterizada por un doble enlace simple en la posición C22-23 (Lankas, *et al.*, 1989), que corresponde al grupo de las lactonas macrocíclicas, es un fármaco endectocida, siendo un polvo blanco altamente lipofílico, soluble en la mayoría de los solventes orgánicos y muy sensible a la luz ultravioleta (Botana, *et al.*, 2002). Esta droga actúa en el sistema nervioso central de los insectos al unirse y activar los canales de cloruro activados por glutamato (GluCl), con la resultante hiperpolarización y parálisis de la musculatura de los parásitos, (Younger, 2011).

El desarrollo de poblaciones de *H. irritans* genéticamente resistentes a los insecticidas empleados, como es el caso de los piretroides sintéticos en Argentina, de los organofosforados en EE. UU, (Anziani *et al.*, 2017, Barros *et al.*, 1999, 2001) surge la necesidad de evaluar otros principios activos, por lo que una alternativa para ello son las avermectinas. Igualmente, el uso de estas dará lugar, en un plazo indefinido, al desarrollo de *H. irritans* resistente a las mismas. Es, por lo tanto, conveniente la vigilancia del status de la resistencia a estas moléculas (Guglielmone *et al.*, 2000). El presente trabajo, propone, determinar la susceptibilidad de cepas de campo frente Abamectina, mediante un screening de establecimientos, utilizando la técnica de impregnación de papeles como bioensayo.

Objetivos

Objetivo General:

- Evaluación de susceptibilidad de *Haematobia irritans* cepas de campo, frente a Abamectina mediante bioensayos insecticidas.

Objetivos Específicos:

- Puesta a punto de bioensayos insecticidas utilizando técnicas papeles de filtro impregnados con Abamectina para *H. irritans*.
- Obtener Dosis Discriminante (DD), Dosis Letal 99 (DL₉₉) Dosis Letal 90 (DL₉₀) y Dosis Letal 50 (DL₅₀) de Abamectina para poblaciones de campo de *H. irritans* mediante ensayos biológicos.
- Comprobar eficacia de dispositivos para la captura de insectos
- Realizar un screening de susceptibilidad/resistencia frente a Abamectina en cepas de *H. irritans* de diferentes establecimientos de Corrientes.

- Desarrollo de un Kit diagnóstico para determinar resistencia de *Haematobia irritans*, cepas de campo frente a Abamectina.

Materiales y Métodos:

Lugar y Periodo de trabajo:

Este trabajo se llevó a cabo en el marco de la residencia externa, en las instalaciones del Laboratorio de Fármacos Garrapaticidas, dependiente de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNNE, ubicado en la ciudad Capital de la provincia de Corrientes y en los diferentes establecimientos, que se visitaron para realizar la captura de las moscas. Se desarrolló en el periodo comprendido entre el mes de marzo y junio de 2022.

Laboratorio:

Preparación de diluciones:

La metodología de preparación y mantenimiento de los papeles de filtro, tanto como la captura y exposición de las moscas a los papeles impregnados fue idéntica a la empleada por Castelli *et al.*, (2000), quien tomó como referencia el bioensayo descrito por Sheppard & Hinkle (1987). Inicialmente se procedió a preparar las diluciones de Abamectina B1a (95,24%), y como diluyente se empleó Acetona (Pro-análisis). Para esto se pesó, 1; 0,5; 0.25 y 0.125 gramos de Abamectina, solubilizando este polvo en 5 ml de acetona para cada concentración. Para lograr una mayor homogenización, estas mezclas debieron ser llevadas a baño de ultrasonidos (Sonicador) por un tiempo de 45 minuto a temperatura de 40 °C, obteniendo así una correcta disolución, recordando que este fármaco es un polvo muy poco soluble, siendo esto notable principalmente en la concentración de 1 gramo, máxima dilución posible. Con estas diluciones, se obtuvieron concentraciones que incluían la mayor sobrevida y la mortalidad total de mosca, siendo de 393,08; 786,16; 1572,32 y 3144,65 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, en las diluciones de 1; 0,5; 0,25; 0,125 gramo, respectivamente, que luego serán impregnadas en papeles de filtro Whatman N°1 de 63,6 cm^2 de superficie.

En la figura 1 se puede observar Abamectina y Acetona, como diluyente, y en la figura 2 las diluciones, siendo sometidas a baño de ultrasonidos para lograr una mejor homogenización.



Figura 1: Abamectina B1a (95,24%) y Acetona (Pro-análisis)



Figura 2: Diluciones de 0,5 y 1 gr, en baño de ultrasonidos (Sonicador)

Impregnación y almacenamiento:

A partir de las diluciones previamente preparadas, se procedió a la impregnación dentro de una campana de extracción de gases, que consistió en aplicar con micropipeta, 1 ml de cada solución sobre papeles de filtro Whatman N°1 de 9 cm de diámetro previamente identificados, suspendidos sobre soportes metálicos para así lograr una mejor impregnación y evitar pérdidas. Estos papeles se dejaron secar durante 1 hora, a temperatura ambiente de 28°C para lograr la evaporación de la acetona. Una vez transcurrido este tiempo, cada concentración se dispuso por separado en sobres de aluminio, así como también el control de acetona, para luego ser mantenidos en heladera a 6°C, hasta su uso, según Sheppard & Hinkle (1987). Fig. 3 y 4.



Figura 3: Papeles de filtro impregnados.



Figura 4: Sobres de aluminio con cada concentración

Campo:

Captura de moscas:

La captura se realizó en las visitas a los diferentes establecimientos ganaderos, ubicados en los departamentos de Empedrado, Mburucuya, San Luis del Palmar, San Cosme y Capital de la provincia de Corrientes. Se seleccionaron varios animales del rodeo, de diferentes categorías y que no estuvieran tratados al menos 20 días previos al ensayo, los cuales se los hace pasar por el brete para realizar la captura de los ejemplares. La misma se realizó mediante el empleo de una red entomológica, diseñada de una forma particular para que los ejemplares no sean dañados antes del bioensayo, la cual se pasó varias veces por el área de la giba, dorso y lomo de los bovinos embretados y

parasitados con *H. irritans*, siempre en el horario de la mañana, de 07:00 a 10:00 horas. También se empleó un dispositivo de transferencia, para así poder incorporar el número adecuado de moscas en las placas de Petri. Fig. 5 y 6.



Figura 5: Localización de los establecimientos testados (puntos rojos)



Figura 6: Recolección de moscas, mediante red entomológica.

Bioensayo:

La realización de los bioensayos *in vitro* se llevó a cabo en los mismos establecimientos en horas tempranas de la mañana, cuando la temperatura ambiente no superaba los 20°C ya que las altas temperaturas aumentan la toxicidad de los insecticidas (Sheppard &

Hinkle, 1987), y evitando siempre la exposición directa a los rayos solares. El día del ensayo, los papeles impregnados fueron colocados dentro de cajas de Petri (9cm), que en su tapa presentaban un orificio para introducir las moscas, que luego se obtura con papel adhesivo. Los ejemplares capturados, junto con la red, fueron introducidos dentro del dispositivo de transferencia, que consiste en un cilindro negro, presentando en su extremo superior un cono transparente, y en su extremo inferior triángulos de gomas dispuestos uno al lado del otro, para así obliterar dicho extremo. Las moscas una vez liberadas dentro del dispositivo, se desplazaron hacia el extremo superior al verse atraídas por la claridad proveniente del cono transparente. Este cono presenta un orificio de 1 cm de diámetro, el cual se acopla al orificio de la capsula. Mediante este acoplamiento se transfirieron entre 25 y 30 moscas en cada una de las placas de Petri conteniendo las diferentes concentraciones de Abamectina, actuando estas como campos de pruebas según Sheppard y Hinkle (1987). Cada una de las concentraciones fueron evaluadas por triplicado, incorporando también, un control que consistió en los papeles impregnados solo con acetona. El armado y llenado de las cajas se inició desde el control, sin el insecticida, hacia la mayor concentración del mismo. En los primeros 5 minutos posteriores al llenado de las cajas con moscas, se realizó el registro de mortalidad por otras causas ajenas al insecticida.

El tiempo total de exposición a la droga fue de 2hs, realizando el recuento de los ejemplares cada 30 minutos, mediante observación directa de cada una de las placas de Petri. Se consideró muerto al ejemplar que no se movía o que estaba imposibilitado de caminar (FAO, 2004). Estos papeles de filtro se utilizaron cuatro veces, dos veces por cada lado del papel, tal como lo reportaron Barros *et al.* (2002). Fig. 7, 8, 9, 10 y 11.



Figura 7: Introduccion de la red con los ejemplares, al dispositivo de transferencia.



Figura 8 y 9: Dispositivo de transferencia y pasaje de moscas a placa de Petri.



Figura 10 y 11: Bioensayo con cepas de campo.

Taxonomía de *H. irritans*:

La identificación del díptero se realizó primariamente mediante la observación directa sobre los animales, teniendo en cuenta, su ubicación, en zonas dorsales próximas a los cuernos, giba, lomo y región costal; su tamaño (2-4 mm), siendo el más pequeño de los múscidos que afecta al bovino; el color gris oscura; la disposición de las alas semiabiertas tipo “ala delta” y con la cabeza dirigida hacia el suelo. Luego a partir de los ejemplares capturados se realizó la identificación taxonómica de los mismos, siguiendo la clave dicotómica descripta por Carvalho (2002), quien caracterizo a la mosca de los cuernos, a través del reconocimiento del aparato bucal sucto picador, propio de dípteros hematófagos, y del merón desnudo, carente de vellosidades. Esto es de gran importancia para diferenciar *H. irritans* de otros dípteros que parasitan al bovino. Fig. 12, 13 y 14.



Figura 12 y 13: Adultos de *Haematobia irritans* sobre bovinos.



Figura 13: Fotografía de *H. irritans* tomada con lupa estereoscópica, donde se señalan (1.) Merón y (2.) Ap. Bucal.

Análisis estadístico:

Para realizar la curva dosis-respuesta, se realizó la transformación logarítmica de los datos obtenidos. Se calculó la DL_{50} , DL_{90} , DL_{99} y DD e intervalo de confianza 95% de Abamectina, para cada población utilizando el programa estadístico POLO Plus 1.0.

Resultados:

En la Tabla N°1 están representados los datos obtenidos de los bioensayos para las poblaciones de campo de *H. irritans*, estudiadas en los diferentes establecimientos de la Provincia de Corrientes. Para esto se realizó el recuento de los ejemplares, mediante observación directa de cada una de las placas de Petri, considerando muerto al ejemplar que no se movía o que no lograba desplazarse. Este recuento se realizó a los 30, 60, 90 y 120 minutos luego de haber sido colocados en las placas de Petri, siempre en los horarios de la mañana (07-10). Los datos recolectados se sintetizaron tomando como referencia al número de moscas muertas a los 120 minutos de exposición, en las diferentes concentraciones, más el control solo con acetona.

Tabla N°1: Datos de los bioensayos realizados

Empedrado N°1			Mburucuyá			Saladas		
entración (µ)	Totales	Muertas	entración (µ)	Totales	Muertas	entración (µ)	Totales	Muertas
Acetona	20	0	Acetona	22	0	Acetona	18	0
Acetona	25	0	Acetona	24	0	Acetona	16	0
Acetona	27	0	Acetona	20	0	Acetona	10	0
393.08	24	0	393.08	25	2	393.08	22	8
393.08	34	10	393.08	12	3	393.08	14	5
393.08	30	8	393.08	24	3	393.08	15	4
786.16	18	12	786.16	21	18	786.16	15	9
786.16	33	27	786.16	11	8	786.16	12	8
786.16	25	19	786.16	27	20	786.16	18	12
1.572.33	25	18	1.572.32	16	12	1.572.33	20	18
1.572.33	34	28	1.572.32	26	24	1.572.33	25	22
1.572.33	30	22	1.572.32	26	25	1.572.33	27	26
3144.65	30	30	3144.65	26	26	3144.65	22	21
3144.65	32	32	3144.65	17	17	3144.65	24	24
3144.65	27	27	3144.65	20	20	3144.65	24	22

San Luis del Palmar			Empedrado N°2			Capital		
entración (µ)	Totales	Muertas	entración (µ)	Totales	Muertas	entración (µ)	Totales	Muertas
Acetona	22	0	Acetona	34	0	Acetona	27	0
Acetona	19	0	Acetona	22	0	Acetona	30	0
Acetona	22	0	Acetona	45	0	Acetona	23	0
393.08	15	4	393.08	53	30	393.08	22	4
393.08	16	2	393.08	30	18	393.08	10	3
393.08	27	10	393.08	18	7	393.08	14	5
786.16	20	14	786.16	29	24	786.16	35	14
786.16	22	14	786.16	17	13	786.16	16	8
786.16	17	8	786.16	50	40	786.16	19	10
1.572.32	15	13	1.572.32	45	40	1.572.32	20	9
1.572.32	28	25	1.572.32	36	32	1.572.32	31	19
1.572.32	24	20	1.572.32	26	23	1.572.32	25	17
3144.65	16	15	3144.65	31	31	3144.65	18	18
3144.65	20	20	3144.65	41	39	3144.65	26	26
3144.65	26	25	3144.65	56	56	3144.65	38	37

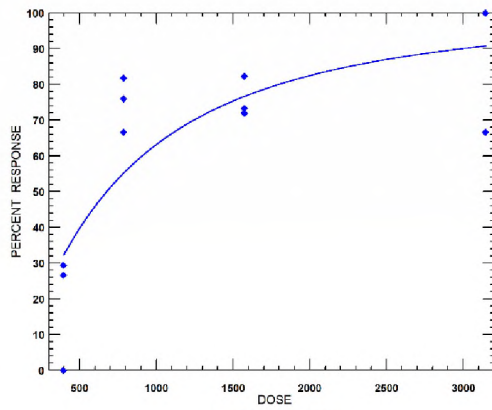
San Cosme		
entración (µ)	Totales	Muertas
Acetona	40	0
Acetona	12	0
Acetona	13	0
393.08	17	5
393.08	41	12
393.08	36	9
786.16	31	14
786.16	23	9
786.16	29	15
1.572.32	28	15
1.572.32	32	26
1.572.32	40	31
3144.65	45	45
3144.65	35	34
3144.65	27	27

Estos datos obtenidos, fueron procesados por el programa estadístico Polo Plus 1.0, a partir del cual se obtuvieron las DL₅₀, DL₉₀, DL₉₉ y DD para cada ensayo. En la figura 14 se encuentran las curvas dosis-respuesta, arrojadas por el programa estadístico para

cada ensayo, donde se puede observar que la curva de los establecimientos ubicados en el departamento de Capital y San Cosme, y en menor medida el de Empedrado N°1, son más tenue que los demás, indicando una menor susceptibilidad.

La regresión lineal realizada arrojó la DL_{50} , DL_{90} , DL_{99} y DD para los datos obtenidos de los establecimientos visitados, obteniendo una media, de 647,08($\pm 189,8$), 1933,08($\pm 454,17$), 4645,26($\pm 851,99$) y 8653,71($\pm 2293,1$), respectivamente, que se esquematizan en la tabla N°2.

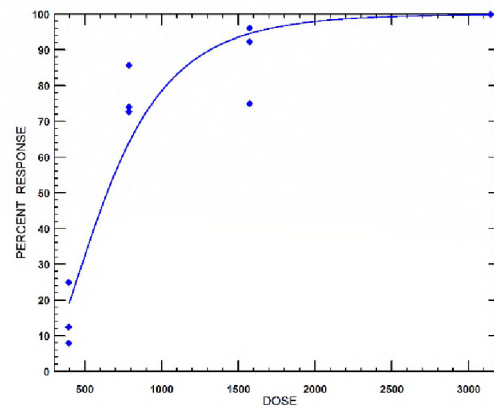
En la figura 14 se puede comparar el comportamiento de *H. irritans* de cada establecimiento, frente a las diferentes concentraciones de Abamectina.



PoloPlus 1.0

Cepa Empedrado NÁ+1
Aba

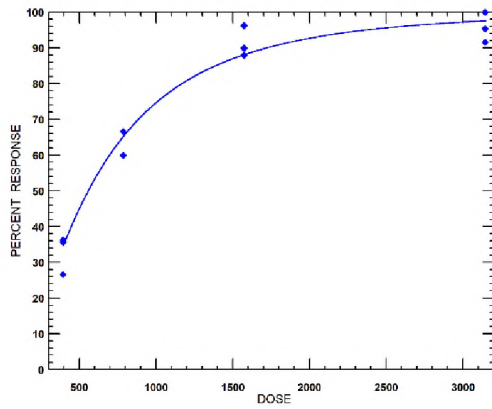
2022



PoloPlus 1.0

Cepa Mburucuya
Aba

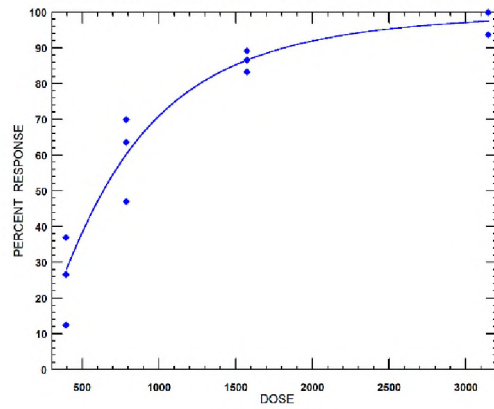
2022



PoloPlus 1.0

Cepa Saladas
Aba

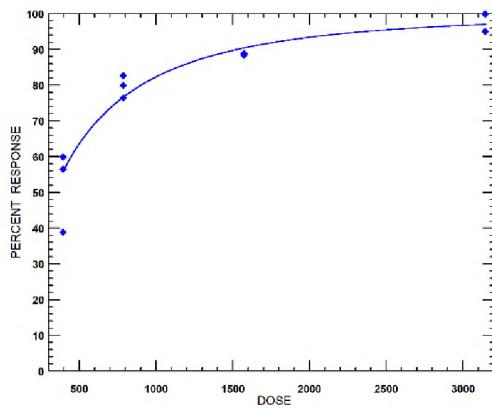
2022



PoloPlus 1.0

Cepa San Luis del Palmar
Aba

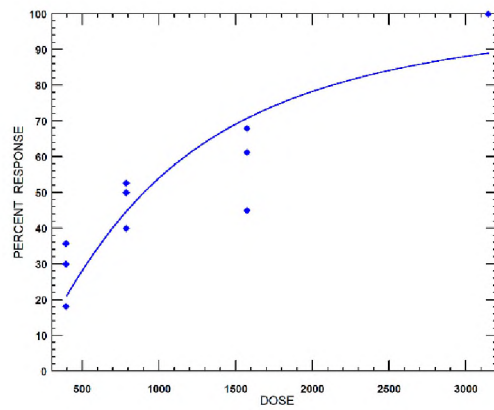
2022



PoloPlus 1.0

Cepa Empedrado NÁ+2
Aba

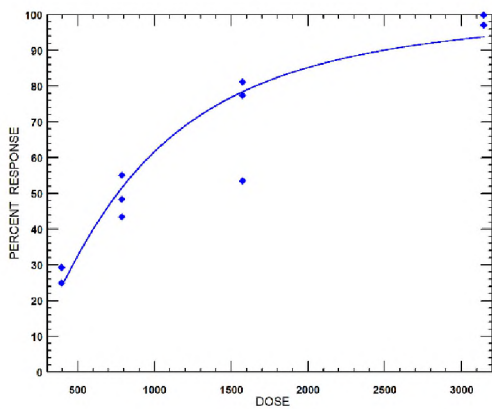
2022



PoloPlus 1.0

Cepa Capital
Aba

2022



PoloPlus 1.0

Cepa San Cosme
Aba

2022

Figura 13: Curvas de dosis-respuesta de los establecimientos.

Tabla 4: Resultados obtenidos en los diferentes establecimientos que se testearon.

Estable- cimiento	Provincia	Departamento	DL ₅₀ (IC 95%)	DL ₉₀ (IC 95%)	DL ₉₉ (IC95%)	DD
N°1	Corrientes	Empedrado	653,13 (459,73- 845,43)	1783,36 (1303,98- 3247,14)	4044,7 (2451,8- 12102)	8089,4
N°2	Corrientes	Mburucuya	632,40 (486,05- 781,01)	1323,40 (1032,98- 2084,53)	2416,4 (1656,2- 5351,9)	4832,8
N°3	Corrientes	Saladas	556,48 (433,02- 671,16)	1671,34 (1343,21- 2316,01)	4096,8 (2824,1- 7606,5)	8193,6
N°4	Corrientes	San Luis de Palmar	633,89 (520,45- 744,92)	1814,46 (1455,91- 2539,47)	4276,6 (2951,3- 7876,3)	8553,2
N°5	Corrientes	Empedrado	347,27 (247,79- 432,98)	1365,27 (1114,54- 1842,81)	4168 (2799,4- 8141,1)	8336
N°6	Corrientes	Capital	884,35 (631,58- 1293,9)	2506,87 (1734,67- 3636,3)	6197 (3353,32- 8730)	12394
N°7	Corrientes	San Cosme	807,36 (616,57- 1306)	2457,2 (1716,48- 4890,8)	5088,48 (3441,36- 8715,2)	10176,96
		Promedio	647,08± 189,8	1933,08 ± 454,17	4645,26 ± 851,99	8653,71 ± 2293,1

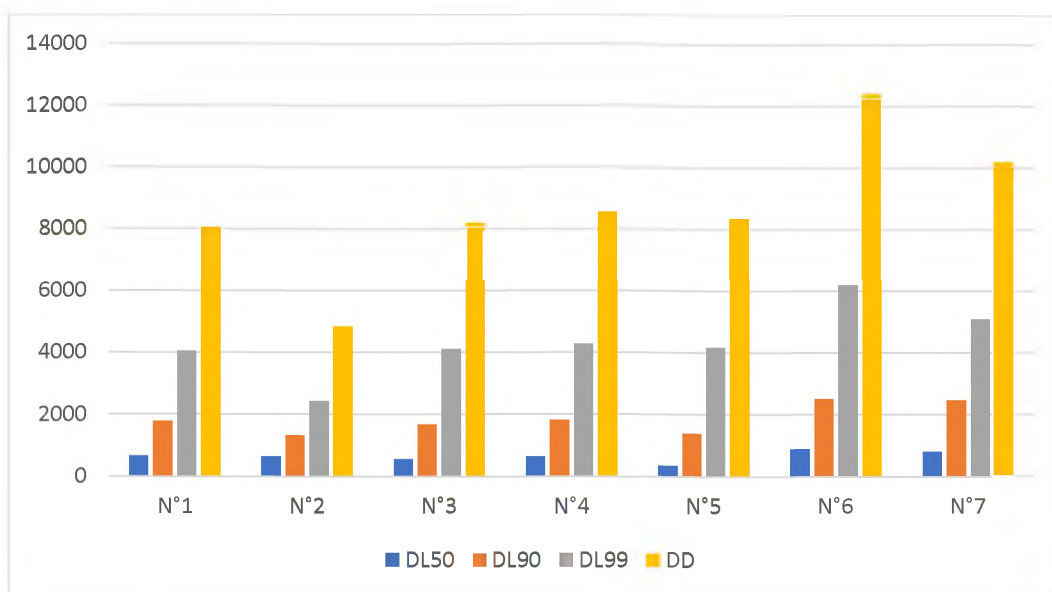


Figura 14: Comparación de los resultados obtenidos.

Discusiones:

El presente estudio constituye una aproximación a la situación de sensibilidad/resistencia de *H. irritans* frente a Abamectina, empleando la técnica descrita por Sheppard & Hinkle (1987), la cual fue empleada por la FAO (2004) y Castelli *et al.* (2000 y 2005) para la determinación de la resistencia de Piretroides sintéticos (PS) y Organofosforados (OF), respectivamente. Buscio. *et al.* (2017) adaptó esta técnica para determinar perfil toxicológico de poblaciones de campo frente a fipronil. Tomando estos trabajos y en virtud de que en la literatura no se encontraron bioensayos *in vitro* para lactonas macrocíclicas frente a *H. irritans*, en este trabajo se empleó dicha técnica, resultando rápida y fácil de usar a campo, con una repetibilidad aceptable y una buena correspondencia entre el gradiente de la concentración y la mortalidad, tal como ocurrió en los ensayos con piretroides realizados por la FAO (2004). Al no contar con trabajos previos que nos pudiesen orientar en las concentraciones a usar, se procedió a impregnar papeles de filtro Whatman N°1 previamente identificados, con concentraciones crecientes, que comprendieron la mayor sobrevida y la mayor mortalidad de mosca, como lo realizó la FAO (2004), Castelli *et al.* (2000 y 2005), Barros *et al.* (2012) y Buscio *et al.* (2017), obteniendo así, con la menor concentración una mortalidad inferior al 30 % y en la de mayor concentración superó el 94%.

En base a formulaciones comerciales y trabajos realizados por Holmes, *et al.* (2015) y De Rose, *et al.* (2016), se realizaron ensayos empleando Acetona con diferentes

adyuvantes, como Tritón, DMSO, Tween, Acido acético, Tricloroetileno, xileno y Aceite de oliva, siendo sometidas a baño de ultrasonidos a diferentes temperaturas y tiempos, donde no se obtuvieron buenos resultados para las alta concentraciones buscadas, precipitando a los pocos minutos el principio activo, concluyendo de que no había diferencia con el empleo de Acetona puro, obteniendo como concentración máxima 1 gramo en 5 ml de Acetona, como único diluyente, como lo realiza la FAO (2004) y Castelli *et al.*, (2000 y 2005) con piretroides y organofosforados, respectivamente. También, se procedió a la producción de nanopartículas de Abamectina, para mejorar la solubilidad acuosa y la fotoestabilidad, como menciona Chun, (2021), esto se llevó a cabo en la Facultad de Ciencias Químicas, de la Universidad Nacional de Córdoba, presentando el inconveniente de tener una pérdida significativa del principio activo durante el procesamiento, haciéndolo un método ineficiente, por lo que no se pudo realizar en mayor escala.

En cuanto al papel de filtro como soporte, se emplearon los de tipo Whatman N°1, tal como lo reportan Castelli *et al.* (2005) y Barros *et al.* (2002). Al encontrarse en el mercado papeles de diferentes laboratorios, se realizaron ensayos en busca del más apropiado, evaluando papeles de filtros de Seasinglab; GE Healthcare 541; Servilab; Macherey, Nagel & Co.duren. A partir de estos estudios, se determinó que el papel que brindo resultados con mayor repetitividad y correspondencia entre concentración y porcentaje de mortandad, como también una mejor impregnación fue el Whatman N°1 de Seasinglab.

Durante estos ensayos, se trabajó con cepas de campo, en particular con las obtenidas de diferentes establecimientos de Corrientes, para esto se utilizaron concentraciones crecientes que van de 393,08 a 3144,65 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y la obtención de las Dosis Letales fue en base a la exposición de dichos ejemplares y a la observación del número de mortalidad a las dosis reportadas.

Al no encontrarse en la bibliografía con trabajos previos similares, y no contar en Argentina, con una cepa de referencia sensible, mantenida en laboratorio para *H. irritans*, se realizó una comparación entre los establecimientos testados, donde se pudo observar que el establecimiento N°2 presenta una mayor susceptibilidad, en contraposición a las poblaciones de los establecimientos N°6 y N°7, que presentaron una menor susceptibilidad, encontrándose en una etapa incipiente de selección de

resistencia, mientras que los establecimientos N°1, N°3, N°4 y N°5 presentaron un comportamiento similar frente a Abamectina. Esto pudo deberse a una presión de selección indirecta por el uso de lactonas macrocíclicas en el control de la garrapata común del bovino (*R. microplus*), teniendo en cuenta el antecedente de uso de avermectinas en estos establecimientos, que si bien en todos los establecimientos se emplearon, no conocemos la frecuencia ni el historial de aplicación de años anteriores, ya que la resistencia según Crow, (1957), puede ser considerada como un fenómeno natural provocado por mutaciones aleatorias, o bien inducido por la aplicación de un tóxico, como menciona Wallace, *et al* (1976). Por lo que la selección de los individuos genéticamente aptos para resistir a un insecticida determinado es promovida, usualmente, por el uso continuo del mismo, y está directamente relacionada al número de tratamientos en una unidad de tiempo y al número de generaciones de la población en esa misma unidad, según reporto Georghiou, (1986). Si bien las avermectinas más empleadas para el control de *R. microplus* son la ivermectina y doramectina, Martins *et al.* (2001) informaron resistencia cruzada a doramectina, ivermectina y moxidectina mediante una prueba *in vivo*, por lo que podría estar ocurriendo lo mismo con Abamectina en *H. irritans*. También pudo deberse, a que estos últimos dos establecimientos, se testaron en el comienzo de la temporada invernal, pudiendo presentar algún tipo de variación en cuanto a la susceptibilidad, por lo que se debería repetir el ensayo en las diferentes temporadas del año.

En tanto, Barros *et al.*, (2002b), FAO (2004) y Miller (1988) mencionaron dos tipos de resistencia más frecuentes para *Haematobia irritans*, la resistencia metabólica aumentando la concentración de enzimas destoxificantes (esterasas u oxidasas) las cuales destruyen las moléculas químicas, estando presente en las moscas resistentes a los piretroides y la segunda, por insensibilidad del sitio de acción. Konno *et al.* (1991) indico que la resistencia de Abamectina frente a la Mosca doméstica está asociada a la disminución de la penetración cuticular y a una reducción del número de sitios de unión de Abamectina. También menciono que no existe una fuerte resistencia cruzada entre la Abamectina y otros insecticidas como carbamatos, organofosforados y ciclodienos.

Actualmente a nivel mundial existen dos formas de diagnóstico precoz de resistencia, las técnicas moleculares y bioensayos *in vitro*. Las primeras buscan determinar mutaciones genéticas, que para *H. irritans* han sido descritas 3 mutaciones puntuales, por insensibilidad en el sitio de acción por mutaciones en los canales de sodio para PS,

(mutación tipo kdr y super-kdr), en el gen de la enzima acetilcolinesterasa (G262A AChE) para OF y en el receptor GABA (A302S - mutación rdl), relacionada a resistencia a ciclodienos según Guerrero *et al.*, (1997), Jamroz *et al.*, (1998), Foil *et al.*, (2010) y Domingues *et al.*, (2013 y 2014), que pueden diagnosticarse simultáneamente en un mismo individuo mediante una PCR multiplex, desarrollada por Roth (2018). En cuanto a los bioensayos *in vitro*, permiten detectar la presencia de individuos fenotípicamente resistentes, donde actualmente para moscas, sólo se dispone del test Sheppard & Hinkle (1987).

Ensayos *in vivo* realizados por Guglielmone *et al.*, (1999), evaluó la eficacia de Abamectina inyectable para el control de *H. irritans*, empleando una dosis de 200 mg/kg de peso corporal, donde obtuvo una reducción de la población que varió de 51% a 73% durante 14 días después del tratamiento, y detuvo los estadios inmaduros presentes en la materia fecal durante 28 días, ya que las avermectinas B1 se excretan en gran parte inalteradas con el estiércol de los mamíferos tratados según Chiu *et al* (1989). Estudios de Doherty *et al.* (1994) con la mosca del búfalo (*H. irritans exigua*), un pariente cercano de la mosca de los cuernos, mostraron que las heces del ganado tratado con 200 mg/kg de Abamectina inyectable inhibían la desarrollo de estados inmaduros durante 21 días después del tratamiento, y 4 mg de Abamectina por kilogramo de heces fue suficiente para detener este ciclo. Por lo que Abamectina controlaría a los adultos de la mosca de los cuernos, así como a las etapas inmaduras en el estiércol de ganado, ayudando a mantener las poblaciones de *H. irritans* por debajo del umbral de daño económico.

Se ha documentado la actividad de otros miembros de la familia de las avermectinas contra *H. irritans*. Por ejemplo, Miller *et al.* (1986) informaron que una dosis de ivermectina de 200 ug/kg resultó en una mortalidad de la mosca de los cuernos adulta superior al 90% los días 2 a 12 posteriores al tratamiento, y redujo el número y la eclosión de los huevos. Kerlin *et al* (1992) también informaron que la sangre de ganado inyectado con la misma dosis de ivermectina mató al 95% de las moscas de los cuernos 8 días después del tratamiento. En sistemas de manejo de pastoreo, las formulaciones tópicas de ivermectina redujeron las poblaciones adultas en un 90 % durante 16 días y en un 50 % el día 26 después del tratamiento, según Lysyk *et al* (1996). También ensayos de Anziani *et al* (2000) trataron con doramectina inyectable a una dosis de 200 mcg/kg, donde se observó durante las primeras 2 semanas una reducción de la población

de moscas adultas superior al 80 % y desde el día 2 hasta el día 35, la reducción de la aparición de adultos fue del 100% en las heces de los novillos tratados con doramectina.

Schmidt *et al.* (1983) informaron que no emergieron moscas durante un período de 28 días de las heces de ganado tratado por vía subcutánea con ivermectina a una dosis de 200 ug/kg. Por otro lado, Fincher *et al.* (1992) informó sobre reducciones de emergencia de adultos superiores al 99% por un período de 42 días después del tratamiento con ivermectina en la misma forma y dosis.

Según los estudios citados con abamectina, ivermectina y doramectina inyectables, la mayoría de los bovinos tratados estuvieron constantemente infestados con *H. irritans*, ya que estos principios activos no son repelentes, por lo tanto, no reducirían la inmigración de moscas desde potreros y/o de vacunos cercanos hacia los bovinos tratados, los cuales pueden permanecen infestados con *H. irritans* aún en el período de máxima eficacia de estos productos.

McKenzie, *et al* (1993) comparo tratamientos, con uso continuo de permetrina, diazinón e ivermectina, y mezcla de permetrina/diazinón, rotación de permetrina-diazinón y rotación de permetrina-ivermectina, determinando que con el uso continuo desarrollo resistencia en las generaciones 21, 31 y 30, respectivamente, mientras que, con las mezclas y rotaciones de insecticidas, resultó en el retraso del desarrollo de resistencia de una a siete generaciones.

Se han registrado la aparición de poblaciones de garrapatas común del bovino (*Rhipicephalus microplus*) resistentes a la ivermectina en la región noreste del país según trabajos de Nava Santiago, *et al* (2020), al igual que Klafke *et al.* (2006) en el Estado de Sao Paulo, Brasil, Anziani *et al.* (2001) en *Cooperia*, Paiva *et al.* (2001) en *Haemonchus*, también Cerutti (2018) menciona la eficacia reducida de Abamectina en ovinos y caprinos frente a *Haemonchus sp*, por lo que cabe esperar la falla de eficacia frente a *H. irritans*, ya que es afectada por el producto, aunque no haya sido el objetivo del control (presión indirecta de selección). De manera tal que para comprobar la susceptibilidad/resistencia a las avermectinas se deberían repetir ensayos a campo en otros establecimientos ganaderos de la región.

Una de las estrategias recomendadas para la prevención y el manejo de la resistencia a la mosca de los cuernos ha sido el uso del control de la diapausa al final de la temporada

con productos químicos alternativos a los que se usan en la temporada alta según Kunz, *et al.* (1994). En áreas donde las moscas de los cuernos resistentes a los piretroides son problema, los tratamientos a fin de verano-principio de otoño con Abamectina podrían ayudar a reducir el número de moscas resistentes que entran en diapausa en el estiércol y podrían retrasar el inicio del tratamiento la próxima primavera y disminuir el uso de insecticidas., por lo que la abamectina puede ayudar a mantener las poblaciones de *H. irritans* por debajo del umbral de daño económico.

En los meses de trabajo, entre marzo y junio, se estudió la dinámica poblacional, observándose un mayor número de moscas al inicio de dicho periodo, fines del verano-principios de otoño, coincidiendo con uno de los dos picos del comportamiento bimodal que presentan, sin embargo, en los meses invernales se observó una disminución de los ejemplares, debido a que ante las bajas temperaturas las pupas experimentan un fenómeno de diapausa, en las estaciones del otoño y del invierno, retrasando su evolución hacia el estadio de insecto adulto, coincidiendo este comportamiento con lo reportado por Guglielmone *et al* (1997), Castro, *et al* (2001) y Barros, *et al* (2001) en Argentina, Uruguay y Brasil respectivamente.

Con respecto a la densidad poblacional, la media de moscas/animal durante el período favorable superó el límite económico de 200 moscas/animal, no siendo así en los meses invernales, estando por debajo de dicho número.

Dentro del rodeo, la distribución de *H. irritans* sobre los animales no fue homogénea, donde los animales más pesados, machos enteros y de pelaje oscuro, fueron parasitados por un mayor número de moscas durante todo el periodo experimental y a su vez, dentro de este grupo, algunos fueron más atractivos para las moscas que otros. Contrariamente, se observaron muchos animales con un número bajo de moscas durante todo el período. Estos resultados confirman lo observado por Barros, (2001); Castro, (2001) y Mancebo, *et al.*, (2001).

Conclusiones:

Mediante los resultados obtenidos, se determinó que la técnica de papel de filtro Whatman N°1 presenta una buena repetitividad y correspondencia entre concentración y porcentaje de mortandad de los ejemplares.

Las distintas poblaciones de *H. irritans* evaluadas en la región noroeste de la provincia de Corrientes, presentaron una variación en la susceptibilidad frente Abamectina, pero sería conveniente mantener una evaluación continua del status susceptibilidad-resistencia de estas poblaciones, para alertar en forma temprana si se comprobara algún cambio. Además, esta información podrá ser utilizada como valor de referencia para poblaciones que demuestren una disminución de la eficacia de Abamectina para el control de la *H. irritans*.

Se mantiene el comportamiento bimodal de la población de *H. irritans*, ya que se pudo observar el pico de fin de verano principio de otoño y la disminución de ejemplares debido a la diapausa de los meses invernales. También, se comprobó que un pequeño porcentaje de animales cargan el mayor número de moscas.

A partir de las concentraciones establecidas y las Dosis Letales halladas, se comenzará mediante los kits de pruebas, un trabajo de campo en diferentes establecimientos para aumentar el número de ensayos y de esta manera obtener el perfil de susceptibilidad de *H. irritans*, frente Abamectina en Corrientes y otras provincias.

Bibliografía:

- Aguilar, M. (2014). Hallazgos de *Haematobia irritans* en Santa Cruz. INTA AER San Julian, EEA Sta. Cruz.
- Anziani, O.S.; Flores, S.G.; Moltedo, H.; Derozier, C.; Guglielmone A.A. (2000). Persistent activity of doramectin and ivermectin in the prevention of cutaneous myiasis in cattle experimentally infested with *Cochliomyia hominivorax*. Veterinary Parasitology 87 (2-3), 243-247
- Anziani, O.S.; Zimmermann, G.; Guglielmone, A.A.; Vazquez, R.; Suarez, V. (2001). Avermectin resistance in *Cooperia pectinata* in cattle in Argentina. Vet Rec. 149: 58-59.
- Anziani, O. S. (2011). Mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*) (biología, importancia económica, aspectos epidemiológicos y tendencias estacionales en el área central de la Argentina, control). Área de Investigaciones en Producción Animal, EEA INTA Rafaela.

- Anziani, O. S.; Suarez V. (2017). Guía para el control de los parásitos externos en bovinos de leche del área central de la Argentina /. 1a ed – Rafaela, Santa Fe : Ediciones INTA. Libro digital, ISBN 978-987-521-786-7
- Avila Cervantes, R.A.; Mancilla Montelongo, G.; González Pech, P. G.; Sandoval Castro, C.A.; Torres Acosta, F.J. (2019). Bioensayos in vitro de relevancia en las ciencias biológicas y agropecuarias. Bioagrobiencias. 12(1): 34-41.
- Barros, A.T.M.; Andress, E.; Doscher, M.E.; Foil, L.D. (1999). Evaluation of chlorfenapyr ear tag efficacy and susceptibility of horn flies to chlorfenapyr. Southwest. Entomol. 24: 331-338.
- Barros, A.T.M. (2001). Dynamics of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) infestation on Nelore cattle in the Pantanal, Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz 96: 445–450.
- Barros A.T.M.; Gomes A.; Ismael A.P.K.; Koller W.W. (2002). Susceptibility to Diazinón in Populations of the Horn Fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in Central Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97(6): 905-907. (a)
- Barros A.T.M.; Saueressig T.M.; Gomes A.; Koller W.W.; Furlong J.; Girão E.S.; Oliveira A.A.D. (2012). Susceptibility of the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae), to insecticides in Brazil. Revta Bras. Parasitol. Vet. 21(2):125-132.
» <https://doi.org/10.1590/S1984-29612012000200010>
- Bianchin, I.; Honer, M.R.; Koller, W.W.; Gomes, A.; Schenk, J.A.P. (1993). Dinâmica populacional e efeito da mosca dos chifres (*Haematobia irritans irritans*) sobre vacas e bezerros Nelore. An. 8º Sem. Bras. Parasitol. Vet., 12-16 setembro, Londrina, Brasil, pp. A30.
- Botana Lopez, L. M.; Landoni, F. M.; Jimenez, T. M. (2002). Farmacología y Terapéutica Veterinaria. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid, España.
- Buscio Gallo D.; Castro J. E. (2017). Diagnóstico del perfil toxicológico de poblaciones de *hematobia irritans* (“mosca de los cuernos”) a fipronil mediante bioensayos *in vitro*, en Uruguay. Universidad de la república, Facultad de veterinaria, Montevideo Uruguay.

- Butler J.F.; Greer N.I.; (1973). Toxicity of SD 8447 and Dichlorvos to Larvae of the Horn Fly, *Haematobia irritans*, (Diptera: Muscidae) in Manure of Insecticide-Fed Cattle. Florida Entomologist. 56(2): 103-105.
- Byford, R. L.; Craig, M. E.; Crosby B. L. (1992). A review of ectoparasites and their effect on cattle production. Journal of Animal Science, Volume 70, Issue 2, February 1992, Pages 597–602
- Castro, E. (2001). Fluctuación Poblacional de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) e Impacto Productivo de la Infestación en una manada de terneros en Uruguay. EM. Tesis. Universidad Distrito Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul (Brasil), 58 pp.
- Campbell, JB. (1976). Effect of Horn Fly Control on Cows as Expressed by Increased Weaning Weights of Calves. Journal of Economic Entomology, Volume 69, Issue 6, 1 December 1976, Pages 711–712.
- Carvalho C.J.B.; Moura M.O.; Ribeiro P.B. (2002). Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) asociados ao ambiente humano no Brasil. Rev. Bras. entomol. 46 (2).
- Castelli, M. E.; Volpogni, M. M.; Mangold, A. J.; Guglielmone, A.A. (2000). Determinacion de las concentraciones letales de Diazinón para *Haematobia irritans* (Díptera: Muscidae) susceptibles a los organofosforados y su aplicación para el diagnóstico de supervivencia. Revista FAVE 14(2): 7-13.
- Castelli, M. E.; Volpogni, M. M.; Mangold, A. J.; Guglielmone, A.A. (2005). Evaluacion de la tecnica de papel de filtro como soporte para determinar la concentracion letal 50 de Diazinón de poblaciones susceptibles de *Haematobia irritans* (Díptera: Muscidae). Revista FAVE - Ciencias Veterinarias 4 (1-2).
- Cerutti, J.; Cooper, L.G.; Torrents, J.; Suarez Archilla, G.A.; Anziani, O.S. (2018). Eficacia reducida de derquantel y abamectina en ovinos y caprinos con *Haemonchus* sp resistentes a lactonas macrocíclicas. Eficacia reducida de derquantel y abamectina en ovinos y caprinos con *Haemonchus* sp resistentes a lactonas macrocíclicas. Rev. Vet. 29: 22-25

- Chiu, S. H.; Lu, A. Y. (1989). Metabolism *and* tissue residues, (pp. 131-143) *In*: Campbell, C. (ed.). Ivermectina *and* abamectin, Springer New York.
- Chun, S. (2021). Preparation of Abamectin Nanoparticles by Flash Nano Precipitation for Extended Photostability and Sustained Pesticide Release. American Chemical Society. <https://doi.org/10.1021/acsanm.0c02847>.
- Crow, J.F. (1957). Genetics of Insect Resistance to Chemicals. Annual Review of Entomology, 2, 227-246. <https://doi.org/10.1146/annurev.en.02.010157.001303>.
- De Rose, G. F.; Kolhe, S. P. (2016). *Composiciones de lactonas macrociclicas, levamisol, un aminoazucar y un agente antiparasitario adicional*. Patente N° 2 846 820, Zoetis Services, México.
- Doherty, W.M.; Stewart, N.P.; Cobb, R.M.; Keiran, P.J. (1994), *In-Vitro* Comparison of the Larvicidal Activity of Moxidectin and Abamectin Against *Onthophagus gazella* (F.) (Coleoptera: Scarabaeidae) and *Haematobia irritans exigua* De Meijere (Diptera: Muscidae). Australian Journal of Entomology, 33: 71-74. <https://doi.org/10.1111/j.1440-6055.1994.tb00924.x>.
- Domingues L. N, Guerrero F. D., Becker M. E., Alison M. W., Foil L. D. (2013) Discovery of the Rdl mutation in association with a cyclodiene resistant population of horn flies, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). Louisiana State University Agricultural Center, Department of Entomology, 404 Life Science Building, Baton Rouge, LA 70803, United States.
- Domingues, L. N.; Guerrero, F. D.; Foil, L. D. (2014). Simultaneous Detection of Pyrethroid, Organophosphate, and Cyclodiene Target Site Resistance in *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) by Multiplex Polymerase Chain Reaction. J. Med. Entomol. 51(5): 964-970; DOI: <http://dx.doi.org/10.1603/ME14011>.
- FAO, (2004). Module 3: Flies, insecticide resistance: diagnosis, management and prevention.
- Foil, L.D.; Guerrero, F.D.; Bendele, K.G.; (2010). Detection of target site resistance to pyrethroids and organophosphates in the horn fly using multiplex polymerase chain reaction. Journal of Medical Entomology. 47: 855–861.

- Georghiou, G.P.; Taylor, C.E. (1986). Factors influencing the evolution of resistance. In, Pesticide resistance: strategies and tactics for management. National Academy Press, Washington D.C., U.S.A., pp. 157-169.
- Grigera. J.; Von Bernard H.; Schor A.; Santa Coloma T.; Acosta, A.; Gonzalez C. (2001) Determinación de parámetros plasmáticos asociados a la variación de la resistencia a mosca de los cuernos (*haematobia irritans irritans* L.) y su efecto en la producción animal en bovinos de carne. Zootecnia Trop., 19(1):7-16. Universidad de Buenos Aires. Proyecto UBACyT AG:109.
- Grisi, L.; Leite, R.C.; Martins, J.R.S.; Medeiros de Barros, A.T.; Andreotti, R.; Cançado, P.H.D.; Pérez de León, A.A.; Pereira, J.B.; Villela, H.S. (2014). Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 23 (2).
- Guerrero, F.D.; Jamroz, R.C.; Kammlah, D.; Kunz, S.E. (1997) Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of kdr and super-kdr point mutations. Insect Biochem. Molec. Biol. 27: 745- 755.
- Guglielmone, A. A.; Anziani, O. S.; Mangold, A. J.; Giorgi, R. E.; Volpogni, M. M.; Flores S. G. (1997). Seasonal variation of *Hematobia irritans* (Diptera. Muscidae) in a recently infested region of central Argentina. Bull. Entomol. Res.87: 55–59.
- Guglielmone, A.A.; Volpogni, M.M.; Anziani, O.S.; Flores, S.G. (1999). Evaluation of injectable abamectin to control natural infestations of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in cattle. J Med Entomol. 10.1093/jmedent/36.3.325. PMID: 10337103.
- Guglielmone, A.A.; Kunz, S.E.; Castelli, M.E.; Volpogni, M.M.; Kammlah, D.; Martins, J.R.; Mattos, C.; Aguirre, D.H.; Suarez, V.R.; Anziani, O.S.; Mangold, A.J. (2000). Susceptibilidad al Diazinón de la *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) de diferentes localidades argentinas y del sur de Brasil. Revista de Medicina Veterinaria. Vol. 81-Nº3.
- Haufe W. O. (1986). Productivity of the cow-calf unit in range cattle protected from horn flies, *Haematobia irritans* (L.), by pesticidal ear tags. Can. J. Anim. Sci. 66: 575-589

- Holmes, R. W. L.; Razzak, M. H. A. (2015) *Composiciones combinadas de lactona macrocíclica, vacunas y procedimientos para su producción*. Patente N° 2 546 480, Meril LTD, España
- Jamroz, R.C.; Guerrero, F.D.; Kammlah, D.M.; Kunz, S.E. (1998) Role of the kdr and super-kdr sodium channel mutations in pyrethroid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*) Insect and Biochemistry and molecular biology 28 : 1031 – 1037
- Kerlin, R.; EAST, I. (1992). The survival and fecundity of buffalo flies after treatment of cattle with three anthelmintics. Australian Veterinary Journal, 69: 283-285.
- Klafke, G.M.; Sabatini, G.; De Albuquerque, T.A.; Martins, J.R.; Kemp, D.H.; Miller, R.J.; Schumaker, T.S. (2006). Larval immersion tests with ivermectin populations of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) from State of Sao Paulo, Brazil. Vet. Parasitol. 142, 386–390.
- Konno, Y.; Scott, J.G. (1991). Biochemistry and Genetics of Abamectin Resistance in the House Fly. PESTICIDE BIOCHEMISTRY AND PHYSIOLOGY 41, 21-28
Department of Entomology, Comstock Hall, Cornell University, Ithaca, New York 14853-0999.
- Kunz, S.E.; Kemp, D.H. (1994). Insecticidas y acaricidas: resistencia e impacto ambiental. Revue Scientifique et Technique (Oficina Internacional de Epizootias). 13 (4): 1249-1286.
- Lankas, G. R.; Gordon, L. R. (1989). Toxicology, pp. 89–112. In Campbell W. C.[ed.], Ivermectin and abamectin. Springer, New York.
- Lysyk, T. J.; Colwell, D. D. (1996). Duration of Efficacy of Diazinon Ear Tags and Ivermectin Pour-On for Control of Horn Fly (Diptera: Muscidae), *Journal of Economic Entomology*, Volume 89, Pages 1513–1520, <https://doi.org/10.1093/jee/89.6.1513>
- Mancebo, O. A.; Monzón, C.M.; Bulman, G. M. (2001). Veterinaria Argentina, 18(171):34-46 y 18(172):119-135.
- Martins, J.; Furlong, J.; (2001). Avermectin resistance of the cattle tick *Boophilus microplus* in Brazil. Vet. Rec. 149, 64.

- McKenzie, C.L.; Byford, R.L. (1993). Continuous, alternating, and mixed insecticides affect development of resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). J. Econ. Entomol. 86: 1040-1048.
- Miller, J.A.; Oehler D. O.; Siebenaler A. J.; Kunz S. E. (1986). Effect of Ivermectin on Survival and Fecundity of Horn Flies and Stable Flies (Diptera: Muscidae) *Journal of Economic Entomology*, Volume 79, Issue 6, 1 December 1986, Pages 1564–1569
- Miller, T.A. (1988). Mechanisms of resistance to pyrethroids insecticide. *Parasitol. Today*.4: 58-60
- Nava, S.; Sarli, M.; Morel, N.; Mangold, A.; Guglielmone, A.; Rossner, V.; Toffaletti J.; Martínez, N.; Torrents, J.; Webster, A. (2020). Garrapata bovina: detectan resistencia a la ivermectina. *Revista internacional Research in Veterinary Science*.
- Paiva, F.; Sato, M.O.; Acuña, A.H.; Jensen, J.R.; Bressan, M.C. (2001). Resistencia a ivermectina constatada em *Haemonchus placei* e *Cooperia punctata* em bovinos. *Hora Vet.* 20: 29-32.
- Roth Kelland, L. (2018). Puesta a punto de una técnica de PCR multiplex para el diagnóstico de la resistencia de *Haematobia irritans* a insecticidas. Universidad de la República, Facultad de Veterinaria. Montevideo Uruguay.
- Sheppard, D.C.; Hinckle, N.C. (1987). A field procedure using disposable materials to evaluate horn fly insecticide resistance. *Journal of Agricultural Entomology*, 4(1): 87–89.
- Schmidt, C.D. (1983). Activity of an avermectin against selected insects in aging manure. *Environmental Entomology*, v. 12, p. 455-457,
- Souza, A. P.; Ramos, C. I.; Bellato, V.; Sartor, A. A.; Schelbauer, C. A. (2008) Resistência de helmintos gastrintestinais de bovinos a anti-helmínticos no Planalto Catarinense. *Ciência Rural* 38, 1363–1367.
- Tarelli, G.J. (2004). Mosca de los cuernos *Haematobia irritans* (L.): biología, comportamiento y control. 1st ed. Hemisferio Sur S.A. Buenos Aires, Argentina

- Wallace, M.; MacSwiney, F. (1976). A major gene controlling warfarin-resistance in the house mouse. *Journal of Hygiene*, 76(2), 173-181. doi:10.1017/S0022172400055078
- Younger, C. D. (2011). A study of horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), targetsite sensitivity, susceptibility, and resistance management at selected sites in Louisiana". LSU Doctoral Dissertations. 3451. https://digitalcommons.lsu.edu/gradschool_dissertations/3451