



Universidad Nacional del Nordeste

Facultad de Ciencias Veterinarias

Corrientes – Argentina

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

- MÓDULO DE INTENSIFICACIÓN PRÁCTICA -

OPCIÓN: Clínica de Grandes Animales

TEMA: “DESARROLLO DE UN KIT DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA FRENTE A DIAZINÓN DE *Haematobia irritans*, CEPAS DE CAMPO”

TUTOR EXTERNO: MV. Del Río Álvarez, Florencia

TUTOR INTERNO: Dra. Lozina, Laura

RESIDENTE: Solari, Lucas Daniel

e-mail: lucassolari998@gmail.com

Agradecimientos

Al Laboratorio de Fármacos Garrapaticidas de la Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE. Especialmente a mi tutora externa MV. Del Río Álvarez, Florencia; tutora interna Dra. Lozina, Laura; Prof. de Ciencias Químicas López, Juan Marcelo, por brindarme un lugar en su equipo, paciencia y por su constante guía para concluir este trabajo.

Gracias a mi madre, mis hermanos y mi abuelo por creer siempre en mí, su amor incondicional, su constante apoyo y anhelar siempre lo mejor para mi vida.

Gracias a mi hermana Julieta, por su amistad y apoyo de tantos años.

A Dios por guiarme y darme fuerzas siempre.

INDICE

Resumen.....	4
Introducción.....	5
Objetivos.....	6
Materiales y métodos.....	7
Resultados.....	8
Discusión.....	14
Conclusiones.....	15
Referencias bibliográficas.....	16

Resumen

Se determinó la DL (Dosis Letal) 99 para el Diazinón en poblaciones de campo de *H. irritans* utilizando papeles de filtro Whatman N°1, impregnados con concentraciones crecientes de Diazinón de 0,002 a 0,8 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, y analizando los resultados obtenidos utilizando el programa estadístico Polo Plus 1.0 Probit. Cepas de campo fueron sometidas a bioensayos hasta obtener una DL 99 de 0,037 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$. A partir de estos resultados es que se pudo determinar que las cepas de campo analizadas presentan una gran sensibilidad a esta molécula en comparación a las de referencia sensible de otros países.

Introducción

Haematobia irritans (mosca de los cuernos) es un díptero pequeño, que mide entre 2 y 5 mm de largo, color gris, hematófago, aproximadamente la mitad de la mosca doméstica, siendo el más pequeño de los múscidos picadores del bovino que afecta principalmente al ganado en pastoreo (Mancebo *et al.*, 2001). Ingresó a la Argentina a fines de 1991 y rápidamente infestó las principales zonas ganaderas del país, se los encontró sobre bovinos en pastoreo en la costa del Río Paraná en un área inundable próxima al Arroyo Garupá, en la Provincia de Misiones, localizadas particularmente en el área de la giba, dorso y cabeza del animal. Las mismas permanecían constantemente sobre los bovinos. Fue introducida a América del Norte desde Francia en la década de 1890 y se extendió a América del Sur en la década de 1970 (FAO, 2004), llegando a Argentina en 1991 desde Brasil (Mancebo *et al.*, 2001). La mosca de los cuernos es un parásito permanente, las formas adultas se alimentan de sangre, provocan estrés en el animal, obligándola a tener una pérdida de energía al realizar movimientos continuos con la cabeza, las orejas y la cola, disminuyendo el tiempo de alimentación y con mermas en la producción de carne y leche. Se considera que las moscas picadoras causan una disminución del 25% en la producción de carne y leche, solo deja a los animales para poner huevos en el estiércol fresco del ganado. El adulto permanece en el anfitrión, solo en intervalos cortos de tiempo baja para depositar sus huevos en estiércol del bovino y luego sube, lo que perjudica las ganancias de peso y la producción de leche (Campbell, 1976; Byford *et al.*, 1992). Debido a pérdidas de producción y costos de control, EE.UU. y Brasil estimaron pérdidas de 730 millones y 3,24 billones de dólares anuales, respectivamente, debido a esta plaga del ganado (Foil & Hogsette, 1994; Grisi *et al.*, 2014). Se ha sugerido que una infestación de entre 100 y 300 moscas por animal puede causar pérdidas en producción (Byford *et al.*, 1992) y, por tanto, una infestación de 200 moscas por animal ha sido aceptada como el umbral para el tratamiento en las razas bovinas europeas (Kunz & Kemp, 1994; FAO, 2004).

Las infestaciones por endo y ectoparásitos representan un problema grave en el ganado, lo que conlleva grandes pérdidas económicas. Un factor que aumenta tales pérdidas, está relacionado con la aparición de resistencia frente a moléculas destinadas a su control. Sin embargo, a pesar de esta situación, el control de los parásitos del ganado todavía depende en gran medida del uso de productos químicos (Souza *et al.*, 2008).

La técnica papel de filtro / placa de Petri de Sheppard & Hinkle (1987) se encuentra descrita para la determinación de susceptibilidad de la mosca de los cuernos frente a diferentes insecticidas, empleando residuos de moléculas en diferentes dosis. Utilizando como soporte Papeles de filtro Whatman N°1 son impregnados 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).

El desarrollo de resistencia a los piretroides sintéticos en poblaciones de *Haematobia irritans* de Argentina dificulta su control. Una alternativa para ello es el uso de insecticidas órganos fosforados (OF), de los cuales existen antecedentes locales de su eficacia. Igualmente, su uso dará lugar, en un plazo indefinido, al desarrollo de *H. irritans* resistente a los mismos. Es por lo tanto, conveniente la vigilancia del status de la resistencia -susceptibilidad a los órgano-fosforado (Guglielmone *et al.*, 2000).

Es así, que el presente trabajo, propone, la identificación de cepas susceptibles a Diazinón, mediante un screening de establecimientos de Corrientes, utilizando la técnica de impregnación de papeles como bioensayo.

Objetivos

Objetivo General:

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

Objetivos Específicos:

- Puesta a punto de bioensayos insecticidas utilizando técnicas papeles de filtro impregnados con Diazinón para *H. irritans*.
- Obtener Dosis Letal 99 (DL99) de Diazinón para poblaciones de campo de *H. irritans* mediante ensayos biológicos.
- Realizar un screening de susceptibilidad/resistencia frente al Diazinón en cepas de *H. irritans* de diferentes establecimientos de Corrientes.

Materiales y Métodos

1. Lugar: Laboratorio de Fármacos Garrapaticidas – Facultad de Ciencias Veterinarias-UNNE.
2. Periodo: julio - agosto 2021
3. Preparación de diluciones:

Se procedió a preparar las siguientes diluciones de Diazinón grado técnico (87 % de pureza P/P y densidad 1,095 g/ml), y como diluyente Acetona pro análisis. Como controles se utilizaron papeles tratados sólo con acetona. Siguiendo la técnica descrita por Guglielmone *et al.* (2006), los ensayos de diluciones iniciaron con una concentración de 0,8 µg/cm², el mismo se obtuvo diluyendo 0,522 µl del principio activo en 10 ml de acetona para obtener una solución, que luego serán impregnada en los papeles de filtro Whatman N°1.

Posteriormente, se realizó sucesivas diluciones a partir de la primera, para obtener concentraciones de 0,4; 0,2; 0,08; 0,04; 0,02; 0,008; 0,004; 0,002 µg/cm² que luego serán impregnadas.

4. Impregnación y almacenamiento:

Se realizó la impregnación de 1 ml de las diferentes soluciones en papeles de filtro Whatman N°1 de 9 cm de diámetro dispuestos sobre soportes metálicos donde se dejaron secar durante 1 hora, a temperatura ambiente 28°C para luego ser mantenidos en sobres de aluminio a 4°C en heladera, según Sheppard & Hinkle (1987). Los papeles se utilizaron cuatro veces, dos veces por cada lado del papel, tal como lo reportaron Barros *et al.* (2002).

5. Captura de moscas:

Se realizaron múltiples visitas a diferentes establecimientos, donde, bovinos de diferentes categorías, fueron encepados. Mediante redes entomológicas se realizó la captura de *H. irritans*, pasando las redes por el dorso y lomo a partir de campos parasitados y siempre en el mismo horario de 7:00 a 10:00.

6. Bioensayos:

Los dípteros capturados fueron llevados para su procesamiento al Laboratorio de Fármacos Garrapaticidas de la Facultad de Ciencias Veterinarias- UNNE, en donde fueron dispuestos en un número de 15 a 25 en cápsulas de plástico de 9 cm de diámetro, conteniendo los papeles impregnados. Cada concentración fue evaluada por triplicado, incorporando también, un control que consistió en papeles impregnados con acetona. El tiempo de exposición a la droga fue de 2hs, realizando el recuento de muertas cada 30 minutos. Se considera muerto al ejemplar que no se mueve o que no logra desplazarse (FAO, 2004).

7. Taxonomía de *H. irritans*

A partir de los ejemplares capturados se realizó la identificación taxonómica de los mismos. Siguiendo la clave dicotómica descrita por Carvalho (2002) se caracterizó a la mosca común de los cuernos, a través del reconocimiento del aparato bucal sucto picador, propio de dípteros hematófagos, y del merón desnudo, carente de vellosidades.

8. Análisis estadístico:

Los datos obtenidos fueron procesados por el programa estadístico Polo Plus, a partir del cual se obtuvieron las DL50, DL90, DL99 para cada ensayo.

Resultados

1. Preparación de diluciones:

Las concentraciones buscadas fueron preparadas mediante diluciones seriadas e impregnadas en papeles de filtro, Fig. 1.



Fig. 1: Obtención de diluciones seriadas de Diazinón.

2. Impregnación y almacenamiento:

Los papales se dejaron secar por una hora en soportes de madera, bajo campana de extracción, para luego ser guardados en sobres de aluminio y refrigerados en heladera. Cada concentración se almacenó por separado, así como el control de acetona, Fig.2 -3.

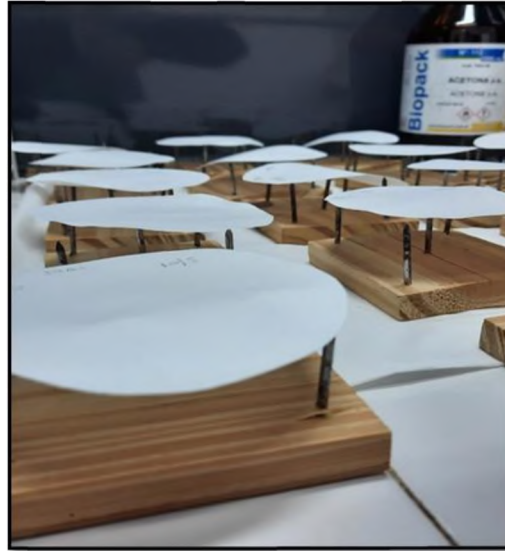


Fig. 2: Soportes de madera con papeles de filtro impregnados.



Fig. 3: Impregnación de papeles filtro.

3. Captura de moscas:

Se ha logrado estandarizar un sistema de captura de moscas a campo y la posibilidad de incorporar el número adecuado de moscas en las placas para el bioensayo, Fig. 4-5y 6.



Fig. 4: Infestación de *H. irritans* en bovinos.



Fig. 5 y 6: Recolección de moscas utilizando red entomológica.

4. Bioensayos:

Para la realización del bioensayo se pasaron desde la red al equipo de concentración de moscas para luego ponerlas en las respectivas placas, Fig. 7 y 8.

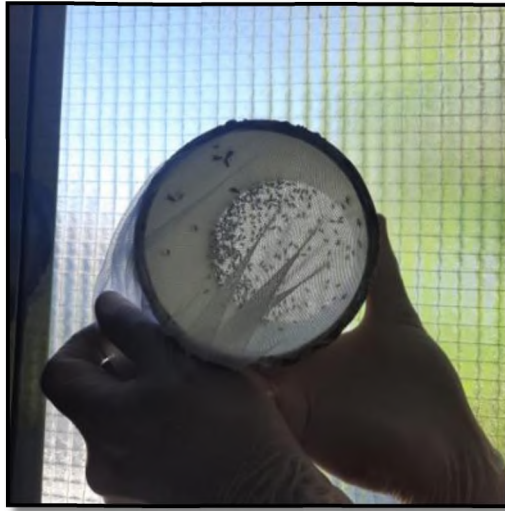


Fig. 7: Moscas capturadas y pasadas a trampa.

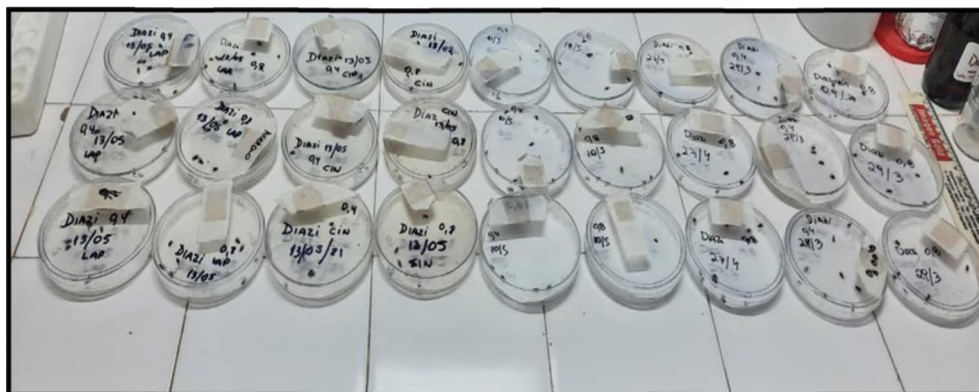


Fig. 8: Bioensayo con cepas de campo.

5. Taxonomía de *H. irritans*

Mediante observación con lupa estereoscópica se realizó la identificación de *H. irritans*. Siguiendo la clave dicotómica descrita por Carvalho (2002) se caracterizó a la mosca común de los cuernos, a través del reconocimiento del aparato bucal succionador, propio de dípteros hematófagos, y del merón desnudo, carente de vellosidades, Fig. 9.



Fig. 9: Fotografía de *H. irritans* tomada con lupa estereoscópica, donde se señalan (1.) Merón y (2.) Ap. Bucal.

6. Análisis estadístico:

Los datos obtenidos fueron procesados por el programa estadístico Polo Plus, a partir del cual se obtuvieron las DL50, DL90 y DL99 para cada ensayo. La regresión lineal realizada arrojó datos de DL50 para una población de campo de entre 0,009 a 0,012 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ y una DL99 de 0,035 a 0,045 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$, Tabla 1.

Tabla 1: Resumen de ensayos realizados durante los meses de trabajo

Periodo analizado	LD 50	LD 90	LD 99	Tiempo de exposición	Heterogeneidad	Fecha de análisis
01-15 /07	0,009	0,022	0,045	120 min	1.4683	15/07
15-30 / 07	0,009	0.019	0.036	120 min	0.663	01/08
01-30 / 08	0,012	0,022	0,035	120 min	4.1858	01/09
PROMEDIO	0,01	0,021	0,037			

Discusión

La técnica empleada en el presente trabajo final fue la de Papeles de filtro impregnados, descrita por Sheppard & Hinkle, (1987). Sin embargo, según la FAO (2004) el test de papel de filtro no es adecuado para determinaciones de OF, y en su lugar, recomiendan el test de viales de vidrio, desarrollada por Cliek & Knapp (1986) para ensayos con Diazinón. En controversia con estos autores, investigadores del INTA Rafaela, han estandarizado la técnica usada en estos ensayos para esta molécula, realizando la comparación de distintos tipos de papeles de filtro (Castelli *et al.*, 2005).

El presente trabajo utilizó papeles de filtro de tipo Whatman N°1, tal como lo reportan Castelli *et al.* (2005) y Barros *et al.* (2002). En trabajos anteriores, Castelli *et al.* (2005) realizaron ensayos en busca del papel de filtro más apropiado, evaluando Whatman N°1, N° 40, papeles de filtro S y S 589. A partir de estos estudios, es que se determinó que el papel con resultados que brindaron mayor repetitividad fue el Whatman N°1 y reportaron la falta de correspondencia entre concentración y porcentaje de mortandad utilizando otros papeles, así como la técnica de viales.

En el presente trabajo se inició con una dilución de $0,8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ tal como lo reportaron Guglielmone *et al.* (2006). Trabajos previos de los mismos autores reportan dosis más bajas que van de 0.008 - $0.0002 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Guglielmone *et al.*, 2001), viendo así la necesidad de ajustar dichas dosis. Por su parte, Barros *et al.* (2012) utiliza diluciones más elevadas de $0,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ a $3,2 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ frente a la cepa brasilera.

Durante estos ensayos, se trabajó con cepas de campo, en particular con las obtenidas de diferentes establecimientos de Corrientes. La obtención de las dosis letales fue en base a la exposición de dichos ejemplares a las dosis reportadas por Guglielmone *et al.* (2001), quienes determinan una DL50 de $0,002$ y $0,001 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ para rodeos de leche y carne, respectivamente, siendo para este trabajo una DL 50 de $0,009$ a $0,012 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

En Argentina, no se cuenta con una cepa de referencia sensible, mantenida en laboratorio para *H. irritans*. Sin embargo, trabajos publicados por Barros *et al.* (2002) utilizan para la determinación de DL una cepa de referencia, la cepa brasilera, realizando la comparación de las dosis obtenidas en los bioensayos con las de la colonia susceptible mantenida en Kerrville Texas USA, llegando a la conclusión de que la cepa brasilera es mucho más susceptible que la norteamericana. Asimismo estudios

realizados por Cuore *et al.*, (1988) en Uruguay, demostraron que las cepas obtenidas a campo presentan una sensibilidad mayor a la molécula en evaluación, versus la cepa de Texas. Resultados similares se obtuvieron en el presente estudio.

Dos factores pueden explicar la alta susceptibilidad al Diazinón observada en este estudio: bajo uso de OF (Organofosforados), por la aparición de moléculas más eficaces y la presencia de resistencia a los piretroides. Reportes de la FAO (2004) explican el factor de resistencia cruzada negativa, entre piretroides y OF por el gen *KDR*. Se sugirió que el mecanismo detrás de esta resistencia cruzada negativa era un aumento del metabolismo (activación) del Diazinón por el aumento de la actividad de las oxidasas de función mixta, presente en las moscas resistentes a los piretroides (Barros *et al.*, 2002).

Conclusión

En el presente trabajo, se concluye que las cepas de campo presentan una marcada susceptibilidad al Diazinón en los establecimientos evaluados en la provincia de Corrientes, en comparación a las cepas mantenidas en laboratorios de Kerrville, TX-USA y Brasil, siendo la DL99 de 0,037 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

A partir de las concentraciones establecidas y la DL99 hallada se comenzará un trabajo de campo en diferentes establecimientos para aumentar el número de los mismos y de esta manera obtener el perfil de susceptibilidad al Diazinón de *H. irritans*, de establecimientos de Corrientes y otras provincias.

BIBLIOGRAFIA

- 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* (Díptera: Muscidae), in Central Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97(6): 905-907.
- Barros A.T.M.; Saueressig T.M.; Gomes A.; Koller W.W.; Furlong J.; Girão E.S.; Pinheiro A.C.; Alves-Branco F.P.J.; Sapper M.F.M.; Braga R.M.; Oliveira A.A. (2012). Susceptibility of the horn fly, *Haematobia irritans irritans* (Díptera: Muscidae), to insecticides in Brazil. Rev. Bras. Parasitol. Vet., Jaboticabal, Vol 21, Nº 2, 125-132.
- Byford, R. L.; Craig, M. E.; Crosby B. L. (1992). A review of ectoparasites and their effect on cattle production. Journal of Animal Science, Vol.70, 2, 597-602
- Campbell, JB. (1976). Effect of Horn Fly Control on Cows as Expressed by Increased Weaning Weights of Calves. Journal of Economic Entomology, Vol.69, 6, 711-712.
- Carvalho C.J.B.; Moura M.O.; Ribeiro P.B. (2002). Chave para adultos de dípteros (Muscidae, Fanniidae, Anthomyiidae) associados ao ambiente humano no Brasil. Rev. Bras. entomol. 46 (2).
- Cliek, J.E. & Knapp, F.W. (1986). A field test kit for the determination of insecticide resistance in horn fly populations. Journal of Agricultural Entomology, 3(3): 201-206.
- Castelli, M. E.; Volpogni, M. M.; Mangold, A. J.; Guglielmone, A.A. (2000). Determinación 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). Evaluación de la técnica de papel de filtro como soporte para determinar la concentración letal 50 de Diazinón de poblaciones susceptibles de *Haematobia irritans* (Díptera: Muscidae). Revista FAVE - Ciencias Veterinarias 4 (1-2).
- Cuore, U.; Solari, M.A.; Cardozo, H.; Mautone, G.; Trelles, A.; Gil, A.; Alza, D. (1988). Estudio de sensibilidad *in vitro* de las poblaciones de *Haematobia irritans* en la Cuenca Lechera de Canelones, San José y Florida. Jornada Uruguaya de Buitría. Pag. 157.

- FAO (2004). Module 3: Flies, insecticide resistance: diagnosis, management and prevention.
- Foil, L.D.; Hogsette, J.A. (1994). Biología y control de tábanos, moscas de los establos y moscas de los cuernos. *Revue Scientifique et Technique (Oficina Internacional de Epizootias)*, 01 de diciembre de 1994, 13 (4): 1125-1158.
- 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)
- 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.
- Guglielmone, A.A.; Castelli, M.E.; Volpogni, M.M.; Medus, P.D.; Anziani, O.S.; Mangold, A.J. (2001). Comparación de la concentración letal 50 de diazinón y cipermetrina para *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) entre áreas de producción de leche o de carne de Santa Fe y Entre Ríos, Argentina. *Rev. Med. Vet. (Buenos Aires)* 82: 209-211.
- Guglielmone, A.A.; Mangold, A.J.; Castelli, M.E.; Suárez, V.H.; Aguirre, D.H.; Alcaraz, E.; Cafrune, M.M.; Cetrá, B.; Fader, O.W.; Luciani, C.A.; Medus, P.D.; Nava, S. (2006). Toxicidad in vitro de la Cipermetrina para *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (CAN.) y del Diazinón para *Haematobia irritans* (L.) en la Argentina. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*. 35-1, 31-41.
- 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.
- Mancebo, O. A.; Monzón, C.M.; Bulman, G. M. (2001). *Veterinaria Argentina*, 18(171):34-46 y 18(172):119-135.
- 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.

- 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.