

# EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA DE PAPEL DE FILTRO COMO SOPORTE PARA DETERMINAR LA CONCENTRACIÓN LETAL 50 DE DIAZINÓN DE POBLACIONES SUSCEPTIBLES DE *HAEMATOBIA IRRITANS* (DIPTERA: MUSCIDAEE)

CASTELLI, M. E.<sup>1</sup>, VOLPOGNI, M. M.<sup>2</sup>, MANGOLD, A. J.<sup>1</sup> & GUGLIELMONE, A.

A.<sup>1</sup>

## RESUMEN

Se determinó la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) para el diazinón (Dz) en poblaciones susceptibles de *Haematobia irritans*, utilizando papeles de filtro de 0,20 mm de grosor y 100 g/m<sup>2</sup> de peso, impregnados con concentraciones crecientes de Dz: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 µg / cm<sup>2</sup>. En cinco poblaciones de *H. irritans* se estimó las CL<sub>50</sub> y los intervalos de confianza de 95 % derivados de la mortalidad de poblaciones susceptibles de *H. irritans* en relación a la dosis, por medio del análisis "probit". El valor de la CL<sub>50</sub> y los límites de confianza 95 % fueron de 0,095 y 0,080-0,112 µg/cm<sup>2</sup>, respectivamente. La información obtenida podrá ser utilizada como valor de referencia para poblaciones que demuestren una disminución de la eficacia del diazinón para el control de la *H. irritans*.

*Palabras clave:* *Haematobia irritans*, diazinón, concentración letal<sub>50</sub>, técnica de papel de filtro.

## SUMMARY

**Evaluation of filters paper technique to determine lethal concentration 50 to diazinon in *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) susceptible populations.**

The 50 % lethal concentration (LC<sub>50</sub>) to diazinon for *Haematobia irritans* susceptible population was determined. Filter paper of 0.2 mm thickness and 100 g/m<sup>2</sup> of weight, impregnated with different concentrations of diazinon were used. The following insecticide concentration were utilized: 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 µg / cm<sup>2</sup>. The LC<sub>50</sub> was determined for diazinón after five evaluation of *H. irritans* susceptible population. The LC<sub>50</sub> and 95% fiducial limits were 0.095 and 0.080 - 0.112, respectively. This information would be an useful reference for suspicious resistant of *H. irritans* populations to diazinon.

*Key words:* *Haematobia irritans*, diazinon, lethal concentration<sub>50</sub>, filter paper technique.

---

1.- INTA – EEA Rafaela. C. C. 22. (2300) Rafaela, Santa Fe. Email: mcastelli@rafaela.inta.gov.ar

2.- Actividad privada. Rafaela, provincia de Santa Fe.

Manuscrito recibido el 15 de junio de 2005 y aceptado para su publicación el 19 de octubre de 2005.

## INTRODUCCIÓN

En estudios donde se evaluaron la resistencia de *Haematobia irritans* a cipermetrina y diazinón se demostró que las poblaciones naturales resistentes a la cipermetrina eran aún susceptibles a los organo- fosforados (OP) como el diazinón (Guglielmone *et al.*, 2001a). Debido a que la frecuencia en los tratamientos con insecticidas es mayor en los rodeos lecheros que en el ganado para carne (Torres & Sheppard 1996), se produciría una mayor resistencia relativa a los insecticidas en las áreas productoras de leche que en las productoras de carne (Guglielmone *et al.*, 2001b). Actualmente existe una resistencia generalizada de las poblaciones de *H. irritans* a la cipermetrina, en consecuencia, se está incrementando el uso de insecticidas OP para su control.

Para evaluar la resistencia de una población a un determinado insecticida es necesario utilizar pruebas de campo y test de resistencia “in vitro” en el laboratorio. Éstas consisten, básicamente, en exponer poblaciones de moscas aún susceptibles a concentraciones crecientes del principio activo en estudio, determinar la  $CL_{50}$  y ese valor tomarlo como  $CL_{50}$  de la “población de referencia”. Esa misma técnica se aplica a poblaciones para evaluar su grado de susceptibilidad, pudiéndose comparar la  $CL_{50}$  obtenida con la  $CL_{50}$  de la población de referencia. De esta manera se puede cotejar la  $CL_{50}$  de otras poblaciones naturales a través del tiempo (Aguirre *et al.*, 1995) y realizar un seguimiento para estimar la evolución de la resistencia (Guglielmone *et al.*, 2000).

En estudios previos se evaluó la técnica de tratamiento de frascos de vidrio y de papeles de filtro (Burg *et al.*, 1995) (Castelli *et al.*, 2000) como soportes para determinar la concentración letal 50 % ( $CL_{50}$ ) y 90 % ( $CL_{90}$ ) de diazinón (Dz) en poblaciones de

*H. irritans* susceptibles a los insecticidas OP. Los resultados obtenidos al utilizar papeles de filtro N° 595 (S&S) indicaron falta de correspondencia entre el gradiente de la concentración y la mortalidad. En cambio al utilizar frascos de vidrio impregnados con insecticida hubo relación entre incremento de concentración y mortalidad; pero la preparación del soporte era muy laboriosa y además bajo condiciones de campo, se observó que hasta en el 30 % de los casos se obtenían resultados erráticos (Fader *et al.*, 2003), siendo mayor el error al acrecentarse el intervalo entre la preparación y su uso. Debido a los inconvenientes en la preparación y conservación de los soportes de vidrio se evaluaron otras alternativas tendientes a simplificar la preparación e incrementar el tiempo de vida útil del kit para test de resistencia.

Como el papel de filtro como soporte tiene la ventaja de la practicidad en la preparación y la mayor vida útil de los mismos, se probaron papeles de filtro similares al N° 595 (S&S); pero en base a lo expuesto por Barros *et al.*, (2002) se utilizaron papeles de mayor peso y grosor. El objetivo del presente trabajo es buscar el soporte más adecuado para realizar los test de resistencia de Dz y con este nuevo procedimiento obtener la  $CL_{50}$  para una población aún susceptible a este insecticida que puede ser considerada de referencia.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología de preparación y mantenimiento de los papeles de filtro tanto como de la captura y exposición de las moscas a los papeles impregnados fue idéntica a la empleada por Castelli *et al.*, (2000). Se utilizaron como soportes papeles de filtro de 90 mm de diámetro Whatman N° 40 N°

589<sup>2</sup> (Schleicher & Schuell) que fueron impregnados con Dz (92,9 % de pureza, Novartis), en INTA EEA Rafaela, empleando las siguientes concentraciones 0,05; 0,1; 0,2; 0,4 y 0,8 µg/cm<sup>2</sup>. Se utilizó como diluyente acetona pura (Merck, p.a.). Como control se usaron papeles de filtro tratados sólo con acetona. Además se utilizaron papeles de filtro Whatman # 1, provenientes de Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuaria, Pantanal (EMBRAPA, Pantanal) preparados con Dz (97,3 % pureza, Novartis) diluido en acetona (Merck p.a.) para obtener las siguientes concentraciones: 0,1; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8; 1,2; 1,6 µg/cm<sup>2</sup> y los controles tenían acetona solamente. Se realizaron tres repeticiones para obtener la CL<sub>50</sub>, extrayendo las moscas del mismo lote de bovinos de INTA EEA Rafaela, que nunca habían sido tratados con OP. Se utilizó el programa Polo PC (Copyright 1987 Le Ora Software) para estimar las CL<sub>50</sub> y los límites de confianza del 95 % (LC<sub>95</sub>) derivados de la mortalidad de las poblaciones de *H. irritans* en relación a la dosis, por medio del análisis "probit" (Russell *et al.*, 1977). Se consideró estadísticamente diferente a las poblaciones que no superponían los valores de LC<sub>95</sub>.

Una vez seleccionado el papel más conveniente se realizaron 5 pruebas para determinar la CL<sub>50</sub> para el Dz en poblaciones susceptibles de *H. irritans*, extraídas de bovinos de INTA EEA Rafaela no tratados con insecticidas OP.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En base a resultados propios y los de Barros *et al.*, (2002) se comenzó a trabajar con papeles de mayor peso y grosor. Los papeles de filtro utilizados se caracterizan por tener un 11 % de mayor grosor y 15 % de mayor peso, que los papeles de filtro utilizados en un trabajo anterior (Castelli *et al.*, 2000).

Se utilizaron dos tipos de papeles de filtro con las características mencionadas, disponibles en el mercado argentino (Whatman N° 40 y N° 589<sup>2</sup> Schleicher & Schuell) y similares al presentado por Barros *et al.*, (2002) preparado en Embrapa, Pantanal. Los resultados se presentan en el Cuadro 1.

De acuerdo a los resultados obtenidos de la CL<sub>50</sub> se optó por el S&S que no presentó diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) al

Cuadro 1. Comparación de la concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) en µg/cm<sup>2</sup> y los límites de confianza de 95% (LC<sub>95</sub>), utilizando 3 tipos diferentes de papeles en la realización del test de resistencia con la misma población susceptible a los organofosforados de *Haematobia irritans*, extraídas de bovinos de INTA EEA Rafaela.

Papel	CL <sub>50</sub> (µg/cm <sup>2</sup> ) Promedio ± Desvío estandar	LC <sub>95</sub>
Whatman N°40 EEA INTA Rafaela	0,2304 ± 0.0544	0,2168 - 0,2367 <sup>a *</sup>
S&S 589 <sup>2</sup> EEA INTA Rafaela	0,1150 ± 0.0336	0,1043 - 0,1261 <sup>b *</sup>
Whatman # 1 Embrapa (Brasil)	0,1249 ± 0,0264	0,1130 - 0,1251 <sup>b *</sup>

Letras no compartidas indican diferencias significativas estadísticamente ( $p > 0.05$ )

Cuadro 2 Concentración letal 50 ( $CL_{50}$ ) en  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  de papel de filtro y límite de confianza 95% ( $LC_{95}$ ) para el diazinón, obtenida en las cinco repeticiones realizadas con poblaciones de *Haematobia irritans* susceptibles a los OP, extraídas de bovinos de INTA EEA Rafaela.

PRUEBAS	DIAZINÓN	
	$CL_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	$LC_{95}$
1	0,088	0.077-0.099 <sup>a*</sup>
2	0,104	0.089-0.121 <sup>a*</sup>
3	0,082	0.068-0.097 <sup>a*</sup>
4	0,087	0.071-0.101 <sup>a*</sup>
5	0,117	0.096-0.141 <sup>a*</sup>
Promedio	0,095	0.080-0.112 <sup>a*</sup>

\* Intervalos de confianza seguidos por la misma letra indica falta de significancia estadística.

elaborado en Embrapa, lo cual posibilita uniformar el sistema de evaluación para avanzar en forma conjunta en el intercambio de información obtenida en la región.

Definido el soporte, se realizaron 5 pruebas para determinar la  $CL_{50}$  de la población de moscas susceptibles de *H. irritans*, extraídas de bovinos de INTA EEA Rafaela que no han sido tratados con OP. Los resultados obtenidos se presentan en el cuadro 2.

La utilización de los papeles de filtro impregnados con insecticidas OP está en línea con la propuesta por otros autores (Farnsworth *et al.*, 1997; Barros *et al.*, 1999) y es idéntica a la utilizada para evaluar la resistencia de *H. irritans* a los piretroides en la Argentina (Guglielmone *et al.*, 2001a). La metodología propuesta contribuye a simplificar los test de resistencia “in vitro” para el Dz y puede extrapolarse a otros insecticidas OP. Además esta información podrá

ser utilizada como valor de referencia para poblaciones que demuestren una disminución de la eficacia del Dz para el control de la *H. irritans*

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece a los Sres. Oscar Warnke, Adolfo Boidi y Miguel Marín por su colaboración en las tareas de campo y de laboratorio. A los Dres. Tadeu A. Barros (EMBRAPA Pantanal, Brasil) y Joao R. Martins (Centro de Pesquisa Veterinária “Desiderio Finamor”, Brasil) por su contribución en la puesta a punto de la técnica. También se agradece la colaboración de Alejandro Olivieri (Facultad de Ciencias Bioquímicas de la Universidad Nacional de Rosario) por la información de las características técnicas de los materiales.

## BIBLIOGRAFÍA

- AGUIRRE, D. H.; O. S. ANZIANI & A. A. GUGLIELMONE.** 1995. Susceptibilidad a la cipermetrina de poblaciones de *Haematobia irritans* del área central de la Argentina. 3° Sem. Int. Parasitol. Anim. Resistencia y control de garrapatas y moscas de importancia veterinaria. Acapulco. México. Mem:pp 150.
- BARROS, A. T. M.; M. W. ALISON & L. D. FOILD.** 1999. Evaluation of yearly insecticidal ear tag rotation for control of pyrethroid - resistant horn flies (Diptera: Muscidae). Vet Parasitol. 62: 317 - 325.
- BARROS, A. T.; A. GOMES; A. P. K. ISMAEL & W. W. KOLLER.** 2002. Susceptibility to diazinon in populations of the horn fly *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in Central Brazil. Mem Inst Oswaldo Cruz Vol. 97: 905-907.
- BURG, J. G.; J. E. CILEK & F. W. KNAPP.** 1995. Variability of glass and filter papers insecticide treated surfaces used to determine horn fly (Diptera Muscidae) insecticide resistance. J. Econ. Entomol. 88: 654-658.
- CASTELLI, M. E.; M. M. VOLPOGNI; A. J. MANGOLD; O. R. QUAINO & A. A. GUGLIELMONE.** 2000. Concentraciones letales de diazinón para *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) susceptibles a los organo fosforados y su aplicación para probables diagnósticos de resistencia. Revista FAVE, 14: 7-13.
- FADER, O. W.; A. A. GUGLIELMONE; M. E. CASTELLI; M. M. VOLPOGNI & A. J. MANGOLD.** 2003. Monitoreo de resistencia-susceptibilidad de la *Haematobia irritans* (L. 1758) a la cipermetrina y al diazinón en el área central de la provincia de Córdoba (Argentina). Vet. Arg., 20: 421-441
- FARNSWORTH, W. R.** 1997. Treated filter paper bioassay for detection of insecticide resistance in *Haematobia irritans exigua* de Meijere (Diptera Muscidae). Aust. J. Entomol. 36: 69-73.
- GUGLIELMONE, A.; M. CASTELLI; O. ANZIANI; A. MANGOLD & M. VOLPOGNI.** 2000. Resistencia – susceptibilidad de la *Haematobia irritans* a los piretroides sintéticos y organo fosforados en Santa Fe. Actas XIV Jorn. Nac., IX Latinoam. Farmacol. Toxicol. Vet. Campus Univ. Nac. Centro Prov. Bs. As., Tandil, Buenos Aires, 27 y 28 de Abril 2000, p. VI 81.
- GUGLIELMONE, A. A.; M. E. CASTELLI; M. M. VOLPOGNI; A. J. MANGOLD; O. S. ANZIANI; J. R. MARTINS; P. D. MEDUS & V. H. SUÁREZ.** 2001a. Toxicity of cypermethrin and diazinon to *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in its American southern range. Vet. Parasitol. 101: 67-73
- GUGLIELMONE, A. A.; M. E. CASTELLI; M. M. VOLPOGNI; P. D. MEDUS; O. S. ANZIANI & A. J. MANGOLD.** 2001b. Comparación de la concentración letal 50 de diazinón y cipermetrina para *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) entre áreas de producción de leche o carne de Santa Fe y Entre Ríos, Argentina. Rev. Med. Vet. (Bs. As.), 82: 209-211
- RUSSELL, R. M.; J. L. ROBERTSON; N. E. SAVIN.** 1977. Polo: a new computer program for probit analysis. Bull. Entomol. Soc. Am. 23: 209- 213.
- TORRES, P. R. & D. C. SHEPPARD.** 1996. Horn fly control with pyrethroids in Argentina. Resistn Pest Management 8: 54-55.