

# DETERMINACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES LETALES DE DIAZINÓN PARA *HAEMATOBIA IRRITANS* (DIPTERA: MUSCIDAE) SUSCEPTIBLES A LOS ÓRGANO – FOSFORADOS Y SU APLICACIÓN PARA EL DIAGNÓSTICO DE RESISTENCIA

M. E. CASTELLI<sup>1</sup>, M. M. VOLPOGNI<sup>2</sup>,

A. J. MANGOLD<sup>1</sup> & A. A. GUGLIELMONE<sup>1</sup>

## RESUMEN

Se usaron papeles de filtro y frascos de vidrio tratados con distintas concentraciones de diazinón para obtener la concentración letal 50 (CL50) y 90 (CL90) de una población de *Haematobia irritans* susceptible a los órgano fosforados. La prueba con los papeles de filtro brindó resultados inconsistentes pero con los frascos de vidrio se logró un gradiente de mortalidad con una concentración de diazinón inicial de 0,00025 µg/ cm<sup>2</sup> y final de 0,008 µg/ cm<sup>2</sup>. Se obtuvieron una CL50 y CL90 con límites de confianza al 95 % de: 0,0013 µg/ cm<sup>2</sup> (0,0011 – 0,0015) y 0,0026 µg/ cm<sup>2</sup> (0,0021 – 0,0033), respectivamente. Esta técnica se utilizó en 12 poblaciones de *H. irritans* de la provincia de Santa Fe; una de ellas se diferenció de la población de referencia por presentar CL50 y CL90 inferiores y otra por mostrar valores superiores. La información obtenida servirá de referencia para comparar, en un futuro, poblaciones sospechosas de presentar resistencia al diazinón.

*Palabras claves:* *Haematobia irritans*, diazinón, dosis letales, resistencia, diagnóstico.

## SUMMARY

### Diazinon lethal concentrations in *Haematobia irritans* susceptible to organo–phosphates; its use for diagnosis of resistance

Filter papers and glass vials treated with diazinon were used to obtain lethal concentration 50 (LC50) and 90 (LC90) for a *H. irritans* population susceptible to organo – phosphates. Inconsistent results were found with the filter papers but a mortality gradient was achieved with glass vials with an initial diazinon concentration

1.- INTA, EEA Rafaela, CC 22, (2300) Rafaela, provincia de Santa Fe, Argentina.

2.- Actividad privada Dentesano 301, (2300) Rafaela, provincia de Santa Fe, Argentina.

3.- Provisto por Novartis, Arias 1851, Buenos Aires.

4.- Industrias TEMIC S.A. Arazo 1865, Buenos Aires.

Manuscrito recibido el 18 de agosto de 2000 y aceptado para su publicación el 29 de setiembre de 2000.

of 0,00025  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  and a final concentration of 0,008  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ . The LC50 and LC90 and 95 % confidence limits were of 0,0013  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (0,0011 - 0,0015) and 0,0026  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (0,0021 - 0,0033), respectively. This technique was applied to horn fly populations from Santa Fe province. One of 12 of them was different to the reference population due to low LC50 and LC 90 and another one due to high values. This information would be an useful reference if *H. irritans* populations suspicious to be resistant to diazinon emerge in Santa Fe.

Key words: *Haematobia irritans*, diazinon, lethal doses, resistance diagnosis.

## INTRODUCCIÓN

Las poblaciones de *Haematobia irritans* de la provincia de Santa Fe muestran resistencia a los piretroides sintéticos (Guglielmone *et al.*, 2000), por lo tanto se observa un uso creciente de insecticidas órgano - fosforados para su control. El desarrollo de poblaciones de *H. irritans* resistentes a ellos dependerá de la presión de selección (Kunz & Kemp, 1994). La primera evidencia de resistencia es la disminución de la eficacia a un insecticida bajo condiciones naturales. La confirmación de la resistencia requiere de pruebas de laboratorio basadas en la exposición a dosis crecientes de un insecticida de una población susceptible de referencia *versus* la población incógnita. La caracterización de la resistencia se logra mediante la detección de las mutaciones en los genes que expresan esa resistencia (Guerrero *et al.*, 1998).

Lo ideal sería mantener una colonia de *H. irritans* susceptible en el laboratorio como referencia para el diagnóstico de la resistencia. Como esto no siempre es posible, una alternativa válida es obtener la información básica midiendo el efecto de un insecticida cuando aún las poblaciones son susceptibles para su posterior comparación con otras poblaciones naturales a través del tiempo. Esta estrategia ya fue utilizada con la cipermetrina para la *H. irritans* (Aguirre *et al.*, 1995), permitiendo estimar la evolución de la resistencia de esta mosca a los piretroides sintéticos (Guglielmone *et al.*, 2000).

En este trabajo se presenta el desa-

rollo y elección de una técnica para determinar las concentraciones letales 50 (CL50) y 90 (CL90) al diazinón de poblaciones de *H. irritans* susceptibles a ese principio activo (Guglielmone *et al.*, en prensa) y su aplicación para comparar la población de referencia con otras poblaciones naturales. Se infirió que debían evaluarse concentraciones de diazinón inferiores a 0,01  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$  (CL50, cepa susceptible del Knippling - Bushland Laboratories USDA, Kerrville, EEUU) (Sidney E. Kunz, com. pers.), porque se comprobó que tal concentración mataba el 100 % de las *H. irritans* de Argentina y sur de Brasil en un lapso muy inferior a las 2 h (Guglielmone *et al.*, en prensa).

## MATERIALES Y MÉTODOS

Para determinar la CL50 y CL90 se usaron métodos basados en los estudios de Cilek & Knapp (1986) y Sheppard & Hinkle (1986, 1987). Se utilizó diazinón técnico (92,9 % de pureza P/P,  $d=1,11 \text{ g/ml}$ )<sup>3</sup> para impregnar los papeles de filtro (Schleicher & Schuell N° 595  $\phi$  90 mm) y tratar la superficie interna de frascos de vidrio (transparentes,  $\phi$  20 mm, h 43 mm excluyendo el cuello, 12 ml de capacidad). Como diluyente se utilizó acetona pura (Merck, pro - análisis).

Los papeles de filtro se impregnaron depositando 1 ml de cada una de las concentraciones. Los mismos se mantuvieron por 4 h a temperatura ambiente de laboratorio, hasta que se evaporase la acetona. Luego se envolvieron en papel de aluminio, separados

por concentración, y se los mantuvo a  $-18^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Para tratar la superficie interna de los frascos, se colocaron 250  $\mu\text{l}$  de cada una de las concentraciones en ellos. Posteriormente se rotaron los recipientes sobre su eje en forma mecánica, bajo campana extractora, durante 15 minutos. Se colocó un precinto de aluminio en la abertura de los recipientes y se los envolvió con papel aluminio y conservó a  $4^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. Como control se usaron papeles de filtro o recipientes de vidrio tratados sólo con acetona. Tanto los papeles de filtro como los recipientes de vidrio se utilizaron dentro de las 48 h de su preparación.

Se partió de una concentración inicial de  $0,00025\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$  y se evaluaron seis concentraciones de diazinón:  $0,00050\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;  $0,00100\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;  $0,00200\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;  $0,00400\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ;  $0,00800\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$ . Para ambas técnicas, se utilizaron los datos obtenidos a las dos horas de exposición de las moscas al insecticida para equiparar esta prueba con la correspondiente a la cipermetrina que se realiza de rutina en el INTA Rafaela (Guglielmono *et al.* 2000). Para el análisis de los resultados se utilizó el programa Polo PC  $\hat{a}$  (Copyright 1987 Le Ora Software) para estimar las CL50 y CL90 de las *H. irritans*, derivada de la mortalidad en relación a la dosis por análisis "probit" (Russell *et al.*, 1977).

Previo a la obtención de las moscas, los papeles de filtro se colocaron dentro de cajas de Petri de plástico ( $\phi$  90 mm) con un orificio para introducir las moscas, que luego se obtuvo con papel adhesivo. Las moscas se capturaron con redes entomológicas sobre bovinos del INTA Rafaela y fueron expuestas al diazinón dentro de la hora de su captura. De cada concentración se realizaron 3 repeticiones colocando aproximadamente 10 moscas en cada una. Para el caso de los recipientes de vidrio se ajustaron las tapas de aluminio luego de introducidas las *H. irritans*. Se realizaron 4 pruebas utilizando papel y frascos de vidrio, comprobándose que empleando los recipientes de vidrio

se obtenía un sistema repetible y comparable. Utilizando únicamente los frascos de vidrio, se realizaron ocho análisis sucesivos con poblaciones de *H. irritans* del INTA Rafaela, que no habían tenido contacto con diazinón. El valor obtenido de la CL50 y CL90 se consideró como representativo de una población susceptible al diazinón. Luego se efectuaron 16 pruebas adicionales en establecimientos ganaderos de los departamentos Nueve de Julio (siete pruebas), Las Colonias (cinco), Vera (tres) y Castellanos (una). Se juzgó como válida a cada prueba donde se obtuvo un límite de confianza del 95 % y mortalidad de las moscas controles inferior al 10 %. Los resultados se compararon con los obtenidos en la población susceptible de referencia. Se consideró diferentes a las poblaciones con intervalos de confianza no superpuestos (Savin *et al.*, 1977). No se tuvo en cuenta la pendiente de la recta pues sus diferencias no se asocian a variaciones genéticas de una población (Chilcutt & Tabashnik 1995).

## RESULTADOS

Con una concentración inicial de  $0,00025\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de diazinón se obtuvo una mortalidad menor al 10 % en moscas expuestas por 2 h en los recipientes de vidrio, incrementándose la mortalidad en función del aumento de la concentración hasta llegar al 100 % en las expuestas a  $0,008\ \mu\text{g}/\text{cm}^2$  de diazinón. Esto no se produjo con los papeles de filtro porque no se obtuvo gradiente de mortalidad con el incremento de la concentración del órgano - fosforado y no hubo repetitividad de los resultados. En consecuencia se decidió utilizar sólo el soporte de vidrio para obtener las CL50 y CL90 al diazinón de *H. irritans* de los bovinos. Las CL50 y CL90 con sus límites de confianza al 95 % para las ocho repeticiones y los valores para el conjunto se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Concentración letal 50 (CL50) y 90 (CL90) con límites de confianza al 95 % (LC95) del diazinón para ocho repeticiones con *Haematobia irritans* de bovinos del INTA Rafaela.

REPETICIONES	CONCENTRACIONES LETALES Y LÍMITES DE CONFIANZA			
	CL50 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	LC95 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	CL90 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	LC95 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
1	0,0018	(0,0012 - 0,0024)	0,0031	(0,0023 - 0,0061)
2	0,0013	(0,0011 - 0,0015)	0,0026	(0,0022 - 0,0033)
3	0,0009	(0,0006 - 0,0014)	0,0026	(0,0017 - 0,0068)
4	0,0014	(0,0012 - 0,0015)	0,0018	(0,0016 - 0,0023)
5	0,0009	(0,0006 - 0,0015)	0,0019	(0,0015 - 0,0045)
6	0,0010	(0,0007 - 0,0014)	0,0019	(0,0013 - 0,0051)
7	0,0012	(0,0010 - 0,0014)	0,0022	(0,0019 - 0,0026)
8	0,0016	(0,0012 - 0,0020)	0,0028	(0,0023 - 0,0049)
<b>PROMEDIO</b>	<b>0,0013</b>	<b>(0,0011 - 0,0015)</b>	<b>0,0026</b>	<b>(0,0021 - 0,0033)</b>

De las 16 pruebas adicionales realizadas con las concentraciones señaladas, cuatro (25 %) no se consideraron válidas; una por mortalidad de los controles superior al 10 % y las restantes por resultados insuficientes para obtener valores para los límites de confianza del 95%. En 10 de las 12 pruebas válidas, se obtuvieron valores dentro del rango de la CL50 y CL90 por la población susceptible de *H. irritans* de INTA Rafaela, considerada de referencia. En las 2 poblaciones restantes se obtuvieron valores extremos y fueron las únicas donde no hubo superposición de los límites de confianza 95 %; por lo tanto, de acuerdo con Savin *et al.* (1977), se consideran con diferencias estadísticas significativas en relación a la población de referencia (Cuadro 2).

## DISCUSIÓN

Varios investigadores usaron sin problemas aparentes la técnica de papeles de

filtro tratados con diazinón para obtener concentraciones letales para *H. irritans* (Crosby *et al.*, 1991; McKenzie & Byford, 1993; Farnsworth 1997; Farnsworth *et al.* 1997 y Barros *et al.* 1999). Burg *et al.* (1995) observaron un coeficiente de variación menor en la mortalidad de *H. irritans* puestas en contacto con papeles de filtro con diazinón que las expuestas en frascos de vidrio tratados con ese insecticida; sin embargo la mortalidad promedio a la prevista CL50 fue de 52 % para los frascos de vidrio y de 88 % para los papeles, indicando que la CL50 para la técnica con los papeles de filtro fue sobrestimada.

En este estudio con los papeles de filtro se obtuvieron resultados menos eficaces que los logrados con los frascos de vidrio tratados con diazinón para obtener CL50 y CL90. Al evaluar los resultados obtenidos se consideró que la diferencia entre las dos técnicas no justificaba realizar estudios adicionales.

Es interesante que la CL50 al

**Cuadro 2.** Valores extremos de la concentración letal 50 (CL50) y 90 (CL90) con límites de confianza al 95 % (LC95) de 2 poblaciones de *Haematobia irritans* de diferentes departamentos de Santa Fe en relación a los valores de referencia del INTA Rafaela.

Concentraciones letales y límites de confianza				
	CL50 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	LC95 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	CL90 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )	LC95 ( $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ )
Menor *	0,0005	(0,0004 – 0,0006)	0,0009	(0,0007 – 0,0012)
Referencia	0,0013	(0,0011 – 0,0015)	0,0026	(0,0021 – 0,0033)
Mayor **	0,0026	(0,0020 – 0,0032)	0,0038	(0,0032 – 0,0055)

\* Población de *H. irritans* del departamento Nueve de Julio

\*\* Población de *H. irritans* del departamento Las Colonias

Las diferencias son estadísticamente significativas con respecto a los valores de referencia, según el criterio de Sevin *et al.* (1977).

diazinón ( $0,0013 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) de la población de *H. irritans* argentina de referencia es sustancialmente inferior a la de la colonia de referencia del laboratorio de EEUU mencionado anteriormente ( $0,01 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ , S. E. Kunz, com. per.). Esto, que aparentaría ser una ventaja, no necesariamente lo es. La CL50 cuando la *H. irritans* era susceptible a la cipermetrina (octubre 94 – abril 95) era de  $0,043 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  (Aguirre *et al.* 1995) versus  $0,3 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  para la colonia susceptible de referencia del Knippling – Bushland Laboratories; pero el uso indiscriminado del insecticida originó que la resistencia se generalizara (Guglielmoné *et al.* 2000). En octubre de 1997 se detectó una CL50 de  $226,1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$  en poblaciones de *H. irritans* de bovinos del INTA Rafaela (Guglielmoné *et al.*, 1999).

La información obtenida servirá como valor de referencia para futuros estudios. Igualmente se destaca que inferencias de pruebas de diagnóstico que indiquen diferencias con los resultados expresados en este estudio, deberán ser considerados con cautela. Tal como la simple observación de pérdida de eficacia de un principio activo no necesariamente indica

resistencia al mismo, el hallazgo futuro de poblaciones con una CL50 significativamente mayor a la obtenida con la población de referencia no indicará resistencia si al mismo tiempo no se comprobaba una disminución de la eficacia del diazinón para el control de la *H. irritans*.

## AGRADECIMIENTOS

Se agradece al Dr Sidney E. Kunz por su asesoramiento para realizar este estudio; al Dr. Carlos Hereu de Novartis Argentina S.A. por el obsequio del diazinón técnico; a los Sres. Oscar Warnke, Adolfo Boidi y Miguel Marín por su colaboración en las tareas de campo y de laboratorio tanto como a los ganaderos que permitieron el uso de sus vacunos e instalaciones para este estudio.

Al Estadístico Oscar Quaino por su asesoramiento, al Sr. Jorge Bueno de AMPOSAN S.A. por los frascos obsequiados y a los Dres Silvia Degaetano y Lelio Mangiaterra por la donación del agitador utilizado.

## 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. 3º Sem. Int. Parasitol. Anim. Resistencia y control en garrapatas y moscas de importancia veterinaria. Acapulco, México. Mem.: pp. 150.
- BARROS, A. T. M.; M. W. ALISON & L. D. FOIL.** 1999. Evaluation of a yearly insecticidal ear tag rotation for control of pyrethroid – resistant horn flies (Diptera: Muscidae). *Vet. Parasitol.* 82: 317-325.
- 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.
- CHILCUTT, C. F. & B. E. TABASHNIK.** 1995. Evolution of pesticide resistance and slope of the concentration – mortality line: are they related? *J. Econ. Entomol.* 88: 11-20.
- CILEK, J. E. & F. W. KNAPP.** 1986. A field test kit for the determination of insecticide resistance in horn fly populations. *J. Agric. Entomol.* 3: 201-206.
- CROSBY, B. L.; R. L. BYFORD & H. G. KINZER.** 1991. Insecticide resistance in the horn fly, *Haematobia irritans* (L.), in New Mexico: survey and control. *Southwest. Entomol.* 16: 301-309.
- 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.
- FARNSWORTH, W. R.; M. G. COLLETT & I. S. RIDLEY.** 1997. Field survey of insecticide resistance in *Haematobia irritans exigua* de Meijere (Diptera: Muscidae). *Aust. J. Entomol.* 36: 257-261.
- GUERRERO, F. D.; S. E. KUNZ & D. KAMMLAH.** 1998. Screening of *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) populations for pyrethroid resistance – associated sodium channel gene mutations by using a polymerase chain reaction assay. *J. Med. Entomol.* 35: 710-715.
- GUGLIELMONE, A. A.; M. E. CASTELLI; M. M. VOLPOGNI; O. S. ANZIANI & S. G. FLORES.** 1999. Cypermethrin pour on synergized with piperonyl butoxide: effects on *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) natural populations resistant to cypermethrin. *Vet. Parasitol.* 83: 65-72.
- GUGLIELMONE, A. A.; M. C. CASTELLI; O. S. ANZIANI; A. J. MANGOLD & M. M. VOLPOGNI.** 2000. Resistencia – susceptibilidad de la *Haematobia irritans* a los piretroides sintéticos y organo – fosforados en Santa Fe. 9ª Jorn. Latinoam. Farmaco – Toxicol. Vet. Tandil (Buenos Aires) VI: pp. 81.
- GUGLIELMONE, A. A.; S. E. KUNZ; M. C. CASTELLI; M. M. VOLPOGNI; D. KAMMLAH; J. R. MARTINS; C. MATTOS; D. H. AGUIRRE; V. R. SUÁREZ; O. S. ANZIANI & A. J. MANGOLD.** Susceptibilidad al diazinón de la *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) de diferentes localidades de la Argentina y del sur de Brasil. *Rev. Med. Vet. (Bs. As.)*, (en prensa).
- KUNZ, S. E. & D. H. KEMP.** 1994

Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epizoot. 13: 1249-1286.

**MCKENZIE, C. L. & R. L. BYFORD.**

1993. Continuous, alternating and mixed insecticides affect development of resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). J. Econ. Entomol. 86: 1040-1048.

**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.

**SAVIN, N. E.; J. L. ROBERTSON & R.**

**M. RUSSELL.** 1977. A critical evaluation of bioassay in insecticide research: likelihood ratio tests of dose - mortality regression. Bull. Entomol. Soc. Am. 23: 257-266.

**SHEPPARD, D. C. & N. C. HINKLE.**

1986. A procedure for evaluation of horn fly, *Haematobia irritans* (L.), pyrethroid resistance by exposure to pyrethroids residues on glass. J. Agric. Entomol. 3: 100-102.

**SHEPPARD, D. C. & N. C. HINKLE.**

1987. A field procedure using disposable material to evaluate horn fly insecticide resistance. J. Agric. Entomol. 4: 87-89.