

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA**

**FACULTAD DE VETERINARIA**

**DIAGNÓSTICO DEL PERFIL TOXICOLÓGICO DE POBLACIONES DE *Hematobia irritans* (“MOSCA DE LOS CUERNOS”) A FIPRONIL MEDIANTE BIOENSAYOS**

***IN VITRO*, EN URUGUAY**

**Por**

Br. Diego BUSCIO GALLO  
Dra. Eleonor CASTRO JANER

TESIS DE GRADO presentada como uno de  
los requisitos para obtener el título de Doctor  
en Ciencias Veterinarias  
Orientación: Tecnología de los Alimentos

ENSAYO EXPERIMENTAL

MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2017

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

---

Dra. Zully Hernandez

Segundo miembro (Tutor):

---

Dra. Eleonor Castro Janer

Tercer miembro:

---

Dr. Gonzalo Suarez

Fecha:

Autores:

---

Br. Diego Buscio

## **Agradecimientos**

A mi familia en especial a mis padres y hermanas por el apoyo permanente e incondicional.

A mis amigos por estar ahí siempre.

A la Facultad de Veterinaria (Universidad de la República, Uruguay)

Al Departamento de Parasitología y Enfermedades Parasitarias.

A CIDEC por su apoyo económico que permitió llevar a cabo este trabajo.

Al Laboratorio Cibeles por los insecticidas de grado técnico.

A la Profa. Dra. Eleonor Castro por su motivación constante para mi desarrollo tanto profesional como humano.

Al Dr. André Díaz Pino y a la Lic. Lucia de Oliveira, quienes estuvieron colaborando conmigo tanto en el trabajo de campo como de laboratorio durante todo el tiempo en que se llevó a cabo el proyecto.

A la Lic. Vanessa Lujambio por su apoyo y colaboración en la redacción de este trabajo.

A los Dres. Carlos Corujo, Carlos Niell, Pilar Rubio, Enrique Sacco, Pedro Garcia Pintos por haberme contactado con los establecimientos agropecuarios que participaron en el proyecto, y a los propietarios de dichos establecimientos por permitirme llevar a cabo el ensayo.

A Giuliana Cabrera por su contante apoyo, cariño y comprensión.

## **Tabla de contenidos**

	Páginas
Página de aprobación	2
Agradecimientos	3
Tabla de contenidos	4
Lista de Tablas	5
Lista de Figuras	6
Resumen	7
Summary	8
1. Introducción	9
2. Hipótesis	14
3. Objetivos	15
4. Materiales y métodos	16
5. Resultados	23
6. Discusión	34
7. Conclusiones	37
8. Bibliografía	38

## Lista de Tablas

### Páginas

Tabla 1. Localización, antecedentes de uso de fipronil y presencia o no de garrapata de los establecimientos visitados.	18
Tabla 2. Resultados obtenidos en los test de toxicidad a fipronil de las poblaciones estudiadas de <i>Haematobia irritans</i> , y su comparación con la población susceptible de referencia.	24
Tabla 3. Distribución de las observaciones realizadas durante el período setiembre 2011-abril 2012, según el N° de moscas/animal, en la Escuela Agraria de Maquinaria y el Campo Experimental N°1.	27

## Lista de Figuras

	Páginas
Figura 1. Localización de los establecimientos visitados. En azul los establecimientos que no utilizaban fipronil, en amarillo los que utilizaban fipronil y no tenían presencia de garrapatas ( <i>Rhipicephalus (B). microplus</i> ), y en rojo con una cruz los establecimientos que utilizaban fipronil y tenían presencia de garrapata.	17
Figura 2. Curva dosis-respuesta de predios testados.	25
Figura 3. Relación entre factores abióticos y promedio de moscas en el Campo de la Escuela Agraria de Maquinaria de Libertad, en el período entre septiembre 2011 y abril de 2012.	28
Figura 4. Relación entre factores abióticos y promedio de moscas en el Campo Experimental N° 1 Migues, en el período entre setiembre 2011 y abril de 2012.	29
Figura 5. Distribución de frecuencias observadas en bovinos parasitados por <i>H. irritans</i> discriminados en categorías en base al peso de junio 2012 en el total del período experimental en el Campo Experimental N° 1.	31
Figura 6. Distribución en base logarítmica de <i>H. irritans</i> por animal en el período de experimentación (septiembre/11-abril/12) en animales de entre 300-400kg (categoría B) en el Campo Experimental N°1 Migues. En color rojo, animales que durante todo el periodo tienen un mayor número de moscas y en color azul, los que tuvieron el menor número.	32
Figura 7. Distribución en base logarítmica (Log.N) de <i>H. irritans</i> por animal, en el período de experimentación (septiembre/11-abril/12) en animales de más de 400kg (categoría C) en el Campo Experimental N°1 Migues. En color rojo animales que durante todo el período tienen un mayor número de moscas, en color azul tienen el menor número.	33

## Resumen

El presente trabajo tuvo como objetivos llevar a cabo un diagnóstico del perfil toxicológico de poblaciones de campo de *Haematobia irritans* a fipronil, y realizar un estudio de dinámica poblacional en Uruguay, en el período comprendido entre septiembre 2011 y abril 2012. Para el diagnóstico de perfil toxicológico se testaron nueve poblaciones ubicadas en establecimientos de los departamentos de: Canelones, Lavalleja, Maldonado, Paysandú y Rocha. Fueron seleccionados establecimientos con y sin historial de uso de fipronil, con presencia de garrapatas (*Rhipicephalus (B.) microplus*) y ausencia de las mismas. Se realizaron bioensayos *in vitro* con diferentes concentraciones de fipronil, que comprendían la sobrevida y la mortalidad total, mediante el método de Sheppard y Hinkle (1987). Al trazar las curvas dosis respuesta, pudo observarse una disminución en la susceptibilidad de las poblaciones de moscas con historial de uso de fipronil, observándose una diferencia significativa con la población de campo no tratada y más susceptible ( $FR_{50} > 2$ ). Para el estudio de dinámica poblacional, fueron visitados con frecuencia quincenal dos establecimientos de la región sur del país, próximos a Montevideo. En cada ocasión, se realizó un conteo visual directo del total de *H. irritans* observadas sobre cada animal con los cuáles se contaba para el ensayo. Se elaboraron las curvas de distribución del promedio de moscas por animal, para cada establecimiento. La distribución en el período de estudio fue estacional desde el inicio de la primavera hasta mediados de otoño (ocho meses), presentando una curva bimodal con un primer pico al final de la primavera y principio del verano (07 de noviembre al 4 de enero) y un segundo pico al final del verano y principio del otoño (5 de marzo al 10 de abril). En el período primavera-verano se detectó el mayor número de moscas y a su vez se observaron niveles de parasitosis no tolerables para el ganado, por un corto período de tiempo.

## **Summary**

The present study aimed at carrying out a diagnosis of the toxicological profile of *Haematobia irritans* to fipronil field populations and at performing a study of population dynamics in Uruguay, during the period between September 2011 and April 2012. For diagnosis of toxicology profile, there were tested nine populations located in farms of the departments of: Canelones, Lavalleja, Maldonado, Paysandú and Rocha. They were selected farms with and without history of use of fipronil, with presence of ticks (*Rhipicephalus (B.) microplus*) and absence of them. *In vitro* bioassays were performed with different concentrations of fipronil, which included survival and total mortality, using the method of Sheppard and Hinkle (1987). A decrease in the susceptibility of horn fly populations with a history of fipronil use could be observed, with significant difference in relation to a more susceptible field population ( $FR_{50} > 2$ ). For the study of population dynamics, two farms in the southern region of the country were visited fortnightly near Montevideo. On each occasion, a direct visual count of the total number of *H. irritans* observed on each animal was counted and counted for the trial. The average distribution of flies per animal was calculated for each farm. This distribution was seasonal, extended from the beginning of spring to the middle of autumn (eight months), presenting a bimodal curve with a first peak at the end of spring and beginning of summer (November 7 to January 4), and a second peak at the end of summer and beginning of autumn (March 5 to April 10). In the spring-summer period, the highest number of flies was detected and at the same time levels of parasitism were not tolerable for the cattle, for a short period of time.

## 1. Introducción

La “mosca de los cuernos” (*Haematobia irritans*), es un díptero hematófago pequeño (2 a 4 mm) de color ceniza, con una disposición de las alas semi-abiertas que le dan la característica de punta de flecha. Parasita principalmente al ganado bovino en pastoreo, siendo una de las principales parasitosis a nivel mundial.

Este ectoparásito de origen europeo, ingresó al continente norteamericano a fines de 1890 (Riley, 1889) donde se diseminó rápidamente. Se extendió hacia América del Sur en muy pocos años, ingresando por primera vez al Uruguay (Artigas) en enero de 1991 (Carballo & Martínez, 1992), dispersándose rápidamente a todo el territorio nacional durante ese año.

Está presente mayormente en ganado de carne y ganado lechero, que se encuentran a pastoreo. No se desarrollan poblaciones importantes en sistemas intensivos lecheros (encierro) y en engordes a corral (“feedlots”), ya que en estas condiciones no se mantiene la integridad de la materia fecal, requisito fundamental para que se desarrollen las formas inmaduras de la mosca. La materia fecal de bovino es la única que permite la evolución de los huevos (Greer & Butler, 1973). La mosca adulta está la mayor parte del tiempo sobre el animal donde generalmente se produce la cópula, la que ocurre entre el segundo y el quinto día de vida (Jones y Kunz, 1998). Las hembras copulan una única vez en su vida, mientras que los machos lo hacen con un promedio de entre 5 a 8 hembras. Cada hembra deposita entre 360 y 400 huevos a lo largo de su vida (Romano & Ferrari, 1993) y lo hacen en el borde de la bosta recién puesta (Foil & Hofsette, 1994). El tiempo de incubación de los huevos es de 16 horas y el porcentaje de eclosión es alto. Una vez eclosionados los huevos, salen las larvas que migran hacia el interior de la materia fecal, realizan tres mudas previas a la pupa. Dependiendo de la humedad de la materia fecal, la pupa puede ocurrir en la bosta o en el suelo. Las larvas pueden introducirse en el suelo hasta una profundidad de entre 3 y 4 cm (Romano & Ferrari, 1993). El período de huevo a pupa demora entre 4 y 5 días y de pupa a adulto entre 5 y 6.

El número de moscas en un rodeo tiene una alta correlación con factores abióticos, principalmente temperatura y precipitaciones

Su máxima presencia se registra durante los meses cálidos y húmedos, disminuyendo en los meses más fríos y secos (Kunz & Cunningham, 1977; Palmar y col., 1981; Castro y col., 2008). Ante temperaturas inferiores a 10-12°C, se produce la disminución del metabolismo en estado de pupa, este fenómeno se conoce como diapausa pudiendo permanecer en este estado hasta 160 días (Kunz & Cunningham, 1977). Para salir de este estado, se necesitan condiciones que aseguren temperaturas superiores a 18°C (Thomas & Kunz, 1985; Solari y col., 2007). En condiciones óptimas en nuestro país, el ciclo se completa en 15 días, estimándose 12 generaciones por año, con un período de diapausa durante el invierno (Castro y col., 2008).

Si bien es un parásito hematófago, el volumen de sangre perdido por el animal es fácilmente repuesto, no produciéndose descensos en el hematocrito. Las pérdidas económicas son debidas, principalmente, a la irritación e intranquilidad constante que las moscas le ocasionan a los animales (Butler, 1992; Lysyk, 2000). Hay reducción de la ganancia de peso, de la eficiencia alimenticia y de la producción láctea (Byford y col., 1992) produciendo pérdidas económicas potenciales anuales del entorno de los 730 millones de dólares en USA (Butler, 1992) y de 2558 millones de dólares en Brasil (Grisi y col., 2014).

En USA y Canadá se estimaron pérdidas productivas a partir de 200 moscas por animal, durante todo el período favorable para la mosca (Kunz y col., 1991; Haufe, 1979). En Uruguay, estudios de variación poblacional registraron un número de moscas/animal por debajo de 200 (Castro y col. 2003b; Castro y col. 2005; Castro y col., 2008) y este número no tuvo un efecto negativo sobre la ganancia de peso en varias categorías de bovinos de carne (Castro, 2003a). Sin embargo, la situación puede haberse modificado, debido a una mejor adaptación del parásito a nuestro clima.

El control de *H. irritans* se realiza fundamentalmente, mediante insecticidas a base de piretroides sintéticos (PS), organofosforados (OF), PS+OF, fenilpirazoles (fipronil), ciclodienos (endosulfán, sólo autorizado en algunos países), y mezclas de insecticidas con inhibidores enzimáticos, cuyas formas de aplicación son derrame dorsal, baño de inmersión/aspersión y caravanas insecticidas. Ocasionalmente son utilizados los endectocidas como las lactonas macrocíclicas. El uso reiterado de

insecticidas sumado al alto número de generaciones por año de estos dípteros tiene una alta relación a la aparición de resistencia de la mosca a los mismos (Guglielmone y col., 2000). La resistencia a los plaguicidas “es la habilidad que tiene una población de parásitos (moscas) para tolerar dosis de tóxicos que serían letales para la mayoría de los individuos en una población normal (susceptible) de la misma especie” (Stone, 1962), siendo de origen genético y heredable. Desde el punto de vista práctico “es el fallo repetido del producto para lograr el esperado nivel de control cuando se usa de acuerdo a las recomendaciones de la etiqueta para la especie de plaga de interés” (FAO, 2012). Los tipos de resistencia más frecuentes descritos para *Haematobia irritans* son la resistencia metabólica y la resistencia por insensibilidad del sitio de acción. En la primera el parásito aumenta la concentración o la producción de enzimas detoxificantes (esterasas u oxidasas) las cuales destruyen las moléculas químicas, y en la segunda se da por una mutación del sitio blanco donde actúa el insecticida.

En diferentes países se ha diagnosticado resistencia de *H. irritans* a PS, OF y endosulfan (Byford y col., 1985; Sparks y col., 1985; Domingues y col., 2013), mientras que en Uruguay únicamente se ha diagnosticado la resistencia a PS a pocos años de su ingreso al país (Márquez y col., 1997). Esto pudo haberse debido a que este insecticida que era comúnmente usado para el control de garrapata, haya generado una presión de selección indirecta contra la mosca. Posteriormente se habilitaron otros principios activos para el control de la mosca, como OF y fenilpirazoles, sospechándose actualmente resistencia a estos. La aparición de resistencia conlleva a un aumento del costo de producción ya que, con el interés de controlar la mosca, el productor aumenta la frecuencia y/o dosis de los tratamientos, lo que implica aumento de residuos en carne y leche, contaminación ambiental y costos por la mano de obra.

En esta línea, se vuelve necesario realizar un diagnóstico precoz de la resistencia. Actualmente a nivel mundial existen dos formas de diagnóstico precoz; técnicas moleculares y bioensayos *in vitro*. Las técnicas moleculares buscan determinar mutaciones genéticas, permiten detectar la presencia de individuos con una mutación dentro de la población problema, aun cuando su frecuencia sea baja. Estas técnicas tienen como limitante que si la resistencia está dada por una mutación no descrita, no será detectada. Para *H. irritans* han sido descritas 3 mutaciones

puntuales, para PS tipo *kdr* y *super-kdr*, G262A AChE para OF y mutación *Rdl* relacionada a ciclodienos, (Guerrero y col., 1997; Jamroz y col., 1998; Foil y col., 2010; Domingues y col., 2013). Recientemente fue desarrollado una PCR multiplex que pueden diagnosticar simultáneamente las 3 mutaciones antes mencionadas (Domingues y col., 2014).

Los bioensayos *in vitro*, permiten detectar la presencia de individuos fenotípicamente resistentes. Actualmente para moscas, sólo se dispone del test Sheppard & Hinkle (1987), para la determinación de la toxicidad de OF y PS, faltando aún desarrollarse bioensayos para lactonas macrocíclicas (LM) y fenilpirazoles (fipronil).

Las LM y el fipronil son los principios activos de más reciente aparición en el mercado y comenzaron a utilizarse a fines de 1990. A pesar de su poco tiempo de utilización ya se ha registrado la aparición de poblaciones de garrapatas resistentes a fipronil e incipientes a ivermectina en el país (Castro-Janer y col., 2010). Por lo que cabe esperar la falla de eficacia de este producto en *H. irritans*, ya que es afectada por el producto aunque no haya sido el objetivo del control (presión indirecta de selección). Por esto es necesario adaptar un test para la determinación de toxicidad a fipronil.

El fipronil es un insecticida de la familia de los fenilpirazoles desarrollado por Rhône-Poulenc Ag Company (ahora Bayer CropScience) entre 1985 y 1987 y puesto en el mercado a principios de la década del 90. Es un antagonista del ácido gama aminobutírico (GABA) neurotransmisor inhibitorio de los insectos. Interfiere con la apertura de los canales de cloruro ligados al GABA, interrumpiendo la transferencia de iones y la transmisión de impulsos entre las células nerviosas provocando una muerte por hiperexcitación del parásito (Taylor, 2001). Fue usado inicialmente para el control de plagas agrícolas y de importancia en salud pública (Colliot y col., 1992) y posteriormente para el control de garrapatas e insectos de importancia en veterinaria. Controla una amplia variedad de insectos (Chaton, 2002).

En Uruguay el uso de fipronil está limitado para el control de plagas agrícolas y desde 2009 sólo se permite su uso para el control de dípteros y artrópodos de importancia veterinaria tanto en animales de compañía como de producción.

El presente trabajo tiene como finalidad adaptar un test para el diagnóstico de resistencia de *H. irritans* a fipronil y estudiar su variación poblacional.

## 2. Hipótesis

La utilización de un bioensayo *in vitro* permite el diagnóstico de resistencia de *H. irritans* a fipronil.

El uso de fipronil para el control de *H. irritans* sea de forma directa o indirecta a través de control de *Rhipicephalus (B.) microplus* en animales parasitados o por el control de plagas agrícolas, favorece la selección de individuos resistentes a fipronil

### 3. Objetivos

#### 3.1 General:

Contribuir al manejo de la resistencia de *Haematobia irritans* a los insecticidas en bovinos

#### 3.2 Específicos

3.2.1. Determinar el perfil toxicológico de fipronil en poblaciones de *H. irritans* en bovinos de establecimientos que han sido sometidos a tratamiento con fipronil y otros que nunca han sido tratados.

3.2.2. Determinar la variación poblacional de *H. irritans* desde setiembre 2011 hasta abril 2012.

#### **4. Materiales y métodos**

El presente trabajo fue realizado en el período comprendido entre septiembre del año 2011 y abril del año 2012.

##### 4.1. Laboratorio:

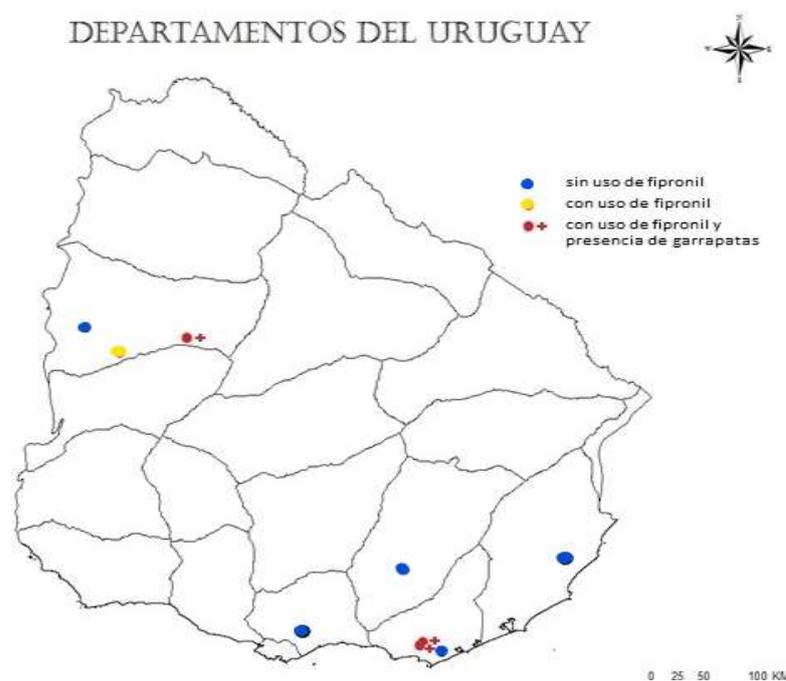
En virtud de que en la literatura no se encontraron bioensayos con fipronil que pudiesen orientar en las concentraciones a usar, en el laboratorio del Departamento de Parasitología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República, se tomó como referencia el bioensayo descrito por Sheppard & Hinkle (1987). Para trazar la curva de mortalidad, inicialmente, se impregnaron papeles de filtro Whatman N°1 previamente identificados, con 6 concentraciones que incluían la sobrevida total y la mortalidad total de mosca. El registro de mortalidad se realizaba a las 2 hs de la exposición de la mosca al insecticida y se consideró mosca muerta aquella que no podía caminar coordinadamente. Se comenzó por el control (acetona ppa sin fipronil), seguido por la dilución de menor concentración hasta la de mayor concentración, para, posteriormente, ir ajustándolas hasta llegar a tener más puntos en la curva dosis-respuesta. Todas las concentraciones se realizaban por triplicado. Para la preparación de las concentraciones se usó fipronil técnico con 96,3% de pureza donado por el Laboratorio Cibeles (lote N° 45861110, vencimiento Octubre 2012), y acetona ppa Dorwil® (lote N° M 10055206) como diluyente. Los papeles impregnados se dejaron secar a temperatura ambiente dentro de una cámara de extracción de gases por 2hs. Después de varios ensayos se llegó a un total de 10 concentraciones más el control que fueron las siguientes: 1,21; 1,73; 2,47; 3,53; 5,04; 7,2; 10,29; 14,7; 21; 30 $\mu$ g/cm<sup>2</sup>. El ajuste inicial de estos bioensayos se realizó con moscas de vacunos parasitados naturalmente, de la Escuela Agraria de Maquinaria de Libertad en el Departamento de San José, que nunca utilizó fipronil en el control de ectoparásitos en los animales ni en el control de plagas agrícolas. Una vez ajustadas las concentraciones, se realizó la impregnación simultánea de 4 “kits” (un kit equivale a la impregnación por triplicado de 10 concentraciones de fipronil más el control sin fipronil). Los “kits” fueron empacados en papel de aluminio y conservados en refrigeración hasta su uso.

Un juego de estos kits se envió al laboratorio USDA Knipling-Bushland US Livestock Insects Research Laboratory (Kerrville, TX, USA), para la determinación de la curva dosis-respuesta de la colonia de referencia susceptible que es mantenida por dicho laboratorio, ya que en Latinoamérica no se cuenta con una colonia con esas características. Como no se pudo determinar dicha curva con esa población, se usó como referencia para el cálculo de los factores de resistencia la población de Uruguay más susceptible, que surgió de este trabajo y que no tenía antecedentes de uso de fipronil.

## 4.2. Campo

### 4.2.1 Determinación del perfil toxicológico.

La realización de los bioensayos *in vitro* se llevó a cabo en 9 establecimientos, de los cuales 6 están ubicados en la región sureste de nuestro país, y los 3 restantes en el litoral oeste (Figura 1). Estos fueron seleccionados en base al uso o no de fipronil para el control de la mosca y/o de garrapata en los últimos 5 años. De éstos, 5 no usaban fipronil y 4 sí lo usaban (Tabla 1).



**Figura 1.- Localización de los establecimientos visitados. En azul los establecimientos que no utilizaban fipronil, en amarillo los que utilizaban fipronil y no tenían presencia de garrapatas (*Rhipicephalus (B.) microplus*), y en rojo con una cruz los establecimientos que utilizaban fipronil y tenían presencia de garrapatas.**

**Tabla 1.- Localización, antecedentes de uso de fipronil y presencia o no de garrapata de los establecimiento visitados.**

N° Establecimiento	Paraje	Departamento	Historial de uso de Fipronil	Presencia de garrapata
1	Migues	Canelones	No	Ausencia
2	Garzón	Maldonado	No	Ausencia
3	Pan de Azúcar	Maldonado	Sí	Presencia
4	Pan de Azúcar	Maldonado	Sí	Presencia
5	Algorta	Paysandú	Sí	Ausencia
6	Piñera	Paysandú	Sí	Presencia
7	Bacaquá	Paysandú	No	Ausencia
8	Angostura	Rocha	No	Ausencia
9	Cuchilla Silvera	Lavalleja	No	Ausencia

El manejo sanitario de cada establecimiento hasta la fecha de visita se detalla a continuación:

N°1: Establecimiento de 950ha. Contaba con un rodeo vacuno de aproximadamente 300 animales raza Hereford. Libre de garrapatas. Para el control de la mosca de los cuernos utilizaba moxidectina 0,5% dos veces al año.

N°2: Establecimiento de 800ha donde se realiza una producción de animales de la raza Aberdeen Angus con un rodeo aproximado de 500 animales. Establecimiento libre de garrapatas. Para el control de moscas utilizaba productos a base de cipermetrina y sus mezclas.

N°3: Establecimiento de 300ha. Tiene un rodeo de 80 novillos. Presencia de garrapatas, tratados mayormente con ivermectina 3,15% cada 60 días y en ocasiones con Alfa-cipermetrina o con fipronil 1%.

N°4: Establecimiento de 200ha, con un rodeo Hereford de 32 vacas de cría. También tenía áreas dedicadas a la agricultura. Con presencia de garrapatas. Desde el 2006 viene realizando tratamientos para mosca con productos en base a cipermetrina 6% o mezcla (ethion 15%- cipermetrina 5%) tres o cuatro veces por año, y de forma menos frecuente, fipronil 1%.

N°5: Realiza silvopastoreo en una plantación de eucaliptus con una superficie aproximada de 300ha, tiene un rodeo de 80 animales Normando. Libre de

garrapatas, y trataba los animales con fipronil 1% e ivermectina 3,15% de forma alternada.

N°6: Establecimiento de 1000ha, con un rodeo de 700 animales aproximadamente. Presencia de garrapatas. Se dejó de utilizar fipronil dos años antes del ensayo porque el propietario no obtenía los resultados que esperaba, y comenzó a utilizar amitraz 12,5% dos veces al año. No trata para mosca de los cuernos.

N°7: Establecimiento de 700ha, con un rodeo de 400 animales se realizan cultivos agrícolas (trigo y soja). Libre de garrapatas. Para el control de moscas utiliza productos mezcla de ethion 15% - cipermetrina 5% tres veces al año.

N°8: Establecimiento de 2000ha. El rodeo tenía aproximadamente 1300 animales en entore. Establecimiento libre de garrapatas. Utilizaba de forma alternada, cipermetrina 6%, mezcla de cipermetrina 6%-carbaril 2%, cipermetrina 5%-ethion15%. Para el control de helmintos usaba ivermectina 1% o nitroxinil 34% - ivermectina 1%.

N°9: Establecimiento de aproximadamente 500ha que tenía un rodeo de 600 animales. Libre de garrapatas. Para el control de *H. irritans* utilizaba productos mezclas (ethion 15%- cipermetrina 5%) y se dosifican con ivermectina 1% a intervalos de 2 o 3 meses.

El día del ensayo, los papeles impregnados fueron colocados en cajas de Petri (9cm), cuyas tapas fueron perforadas previamente en los talleres de la Facultad de Veterinaria. Los bioensayos se realizaron 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). En cada establecimiento se capturaron moscas de varios animales del rodeo con ayuda de una "red entomológica" y a medida que ésta se iba llenando las moscas eran pasadas a otra red de mayor tamaño para evitar que se dañasen y/o muriesen por el manejo. Una vez que se capturó la totalidad de las moscas que se precisaban para realizar el bioensayo (aproximadamente 2000), con la ayuda de una pipeta plástica se aspiraron y colocaron entre 25 y 30 moscas en cada una de las cajas de Petri conteniendo las diferentes concentraciones de

fipronil. El 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. La mortalidad debido al insecticida se determinó a las 2 horas de la exposición. Se consideró mosca muerta aquella mosca que estaba imposibilitada de caminar.

#### 4.2.2 Fluctuación Poblacional y detección de bovinos más “atrayentes”.

El estudio de la variación poblacional, se realizó en 2 establecimientos de forma independiente. Estos fueron la Escuela Agraria de Maquinaria de Libertad Departamento de San José (E.A.M.) ubicado  $34^{\circ} 40' 35,99''$  latitud sur,  $56^{\circ} 32' 18,83''$  longitud oeste y en el Campo Experimental N° 1 de la Facultad de Veterinaria (C.E-1) ubicado  $34^{\circ} 22' 23,22''$  latitud sur, y  $55^{\circ} 36' 11,06''$  longitud oeste. El conteo se realizó entre 2 operarios, uno a cada lado del tubo, en forma individual e independiente y en las primeras horas de la mañana, cuando las formas adultas se encuentran sobre las paletas, hombros, dorso y cabeza del animal, siguiendo la metodología descrita por Castro y col. (2005). Los conteos se realizaron cada 15 días en cualquiera de los dos establecimientos.

E.A.M.: Este establecimiento contaba con un rodeo de 26 animales entre novillos, vacas secas y en ordeño, raza Holando. Ninguno de ellos fue tratado durante el experimento ni con insecticidas ni con endectocidas. Se comenzó con el conteo en el mes de septiembre de 2011 y continuó hasta el mes de abril de 2012.

CE-1.: Se utilizó un rodeo de 29 novillos de recría raza Hereford, que no fueron tratados durante el tiempo en que se realizaron los conteos de moscas. Estos comenzaron en el mes de setiembre del año 2011 hasta el mes de abril del año 2012, siguiendo la metodología descrita previamente. Asimismo, se registró el peso de los animales y su condición corporal a fines del período (mayo 2012).

#### 4.3. Análisis estadístico.

Para realizar la curva dosis-respuesta, se realizó la transformación logarítmica de la dosis. Se calculó la Concentración Letal  $_{50/90}$  ( $CL_{50/90}$ ), valor de la pendiente (*slope*) e intervalo de confianza 95% de fipronil para cada población utilizando el

programa POLO Plus Le Ora (2004). Este programa utiliza el modelo estadístico de respuesta binaria con una variable explicativa en respuesta a un término constante. Cuando el sujeto de prueba es expuesto a una de los posibles niveles de experimentales  $t$ , el sujeto puede tener sólo dos respuestas posibles (“si” o “no”, en este caso “vive” o “muere”).

El modelo de análisis estadístico es:

$$P_t = F(\alpha + \beta z_t)$$

Donde  $P_t$  es la probabilidad de respuesta,  $z_t$  es la  $t^{\text{th}}$  nivel de la característica a medir,  $\alpha$  es la intercepción de la línea de regresión,  $\beta$  es la intercepción de la línea, y  $F$  es la función de distribución acumulativa.

Se calcularon los factores de resistencia ( $FR_{50/90}$ ) para cada población de campo, dividiendo la  $CL_{50/90}$  de cada una de ellas entre la  $CL_{50/90}$  de la población de campo más susceptible. Para la interpretación de los datos se usaron las categorías descritas por Castro-Janer y col. (2010).

**Susceptible:** Cuando el valor de la  $CL_{50/90}$  estimada (IC95%) en la población de campo no difiere estadísticamente de la cepa de referencia.

**Resistencia incipiente:** Cuando el valor de la  $CL_{50/90}$  estimado en la población de campo difiere estadísticamente de la cepa de referencia y con  $FR_{50/90} < 2$ .

**Resistente:** Cuando el valor de la  $CL_{50/90}$  estimada (CL95%) en la población de campo difiere estadísticamente de la cepa de referencia y con  $FR_{50/90} \geq 2$ .

Para el estudio de la dinámica poblacional se realizó una estadística descriptiva, donde se calculó la media y el desvío estándar del total de moscas registrado por los observadores para cada fecha y para cada establecimiento. Teniendo en cuenta las consideraciones realizadas por Castro y col. (2008), se correlacionaron los datos obtenidos del registro de moscas quincenal con el promedio de la temperatura media y las lluvias acumuladas durante quince días previos al conteo de moscas en el período octubre- abril (meses más cálidos). Los registros de temperatura fueron solicitados al Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias (INIA) estación experimental las Brujas, por ser la estación meteorológica

más cercana a ambos. Se utilizaron los registros de lluvia propios de cada establecimiento.

Para la detección de animales más atractivos, se consideró el peso y la condición corporal del animal. Se realizó la transformación logarítmica del conteo de moscas individual de cada bovino, y se estudió la variación de moscas individual a lo largo del período.

## 5. Resultados

### 5.1. Estudios de toxicidad de fipronil a *H. irritans*.

En la Tabla 2 están representados los datos obtenidos en los bioensayos para las poblaciones de campo. No se pudo comparar con la colonia de moscas susceptibles del laboratorio USDA Knippling-Bushland US Livestock Insects Research Laboratory (Kerrville, TX, USA) porque ésta presentó, inesperadamente, una mortalidad elevada a las concentraciones más bajas de campo haciendo imposible la realización de una curva dosis/respuesta. Por esta razón se utilizó como referencia la población de moscas más susceptible de los establecimientos testados (Establecimiento N°9).

Las  $CL_{50}$  de poblaciones con antecedentes de uso de fipronil (establecimientos N°3, N°4, N°5 y N°6), fueron significativamente más altas que la  $CL_{50}$  de la población del establecimiento N°9, con  $FR_{50}$  superiores a 2. Sin embargo, no todas ellas tuvieron un  $FR_{90}$  superior a 2, sólo las poblaciones de los establecimientos N°5 y N°6. De las poblaciones de los establecimientos que no tenían antecedentes de uso de fipronil, tres presentaron  $FR_{50}$  menor a 2 y una presentó un  $FR_{50}$  mayor a 2 (Población N°7). Los  $FR_{90}$  para todas las poblaciones fueron menores a 2.

En la Figura 2 se muestran las curvas dosis respuesta de los 9 establecimientos estudiados en el presente ensayo.

Tabla 2.- Resultados obtenidos en los test de toxicidad a fipronil de las poblaciones estudiadas de *Haematobia irritans* y su comparación con la población susceptible de referencia (N°9).

Establecimiento	Pendiente	Chi-cuadrado	CL <sub>50</sub> (IC95%)	CL <sub>90</sub> (IC 95%)	FR <sub>50</sub> (IC 95%)	FR <sub>90</sub> (IC 95%)
N°1	4.756 ± 0.266	64.20	6,86 (5,64 - 8,396)	12,75 (10,06 - 19,72)	1,75 (1,55- 1,97)	1,23 (1,03 - 1,47)
N°2	3.956± 0.231	24.07	6,47 (5,56 - 7,53)	14,21 (11,58 - 19,28)	1,67(1,48 - 1,89)	1,33 (1,11 - 1,61)
N°3**	3.788± 0.232	52.76	8,15 (6,37 - 10,78)	18,02 (13,01 - 34,73)	2,08 (1,83 - 2,368)	1,74 (1,42 - 2,13)
N°4*	5.446± 0.323	69.22	8,86 (6,82 - 11,44)	15,230 (11,73 - 27,82)	2,26 (2,01 - 2, 55)	1,472 (1,26 - 1,75)
N°5*	2.234± 0.168	52.83	19,39(14,6 -30,5)	72,6 (41,9- 220,03)	5,26 (4,42- 6,26)	5,82 (4,14- 8,17)
N°6**	2.775± 0.163	136.36	14,85 (10,58- 24,73)	43,02 (25,55- 147,4)	3,54 (3,39- 4,52)	3,54 (2,75- 4,56)
N°7	3.008± 0.193	26.14	7,64 (6,3- 9,196)	20,4 (15,85- 29,94)	2,29 (2,00- 2,63)	1,91 (1,69- 2.43)
N°8	3.282± 0.195	42.27	6,64 (5,26 - 8,59)	15,15 (11,13 - 26,24)	1,85 (1,61 - 2,13)	1,72 (1,39 - 2,134)
N°9	3.282± 0.195	11.24	3,96 (3,37 - 4,48)	10,35 (8,66 - 13,14)		

\* Uso de fipronil para el control de mosca - \*\* uso de fipronil para el control de garrapata - CL<sub>50</sub>: concentración letal 50 - CL<sub>90</sub>: concentración letal 90 - FR<sub>50</sub>: factor de resistencia - FR<sub>90</sub>: factor de resistencia 90.

Establecimiento (Nº)	Color de la curva
1	Azul
2	Naranja
3	Bordo
4	Verde
5	Roja
6	Gris
7	Violeta
8	Amarillo
9	Negro

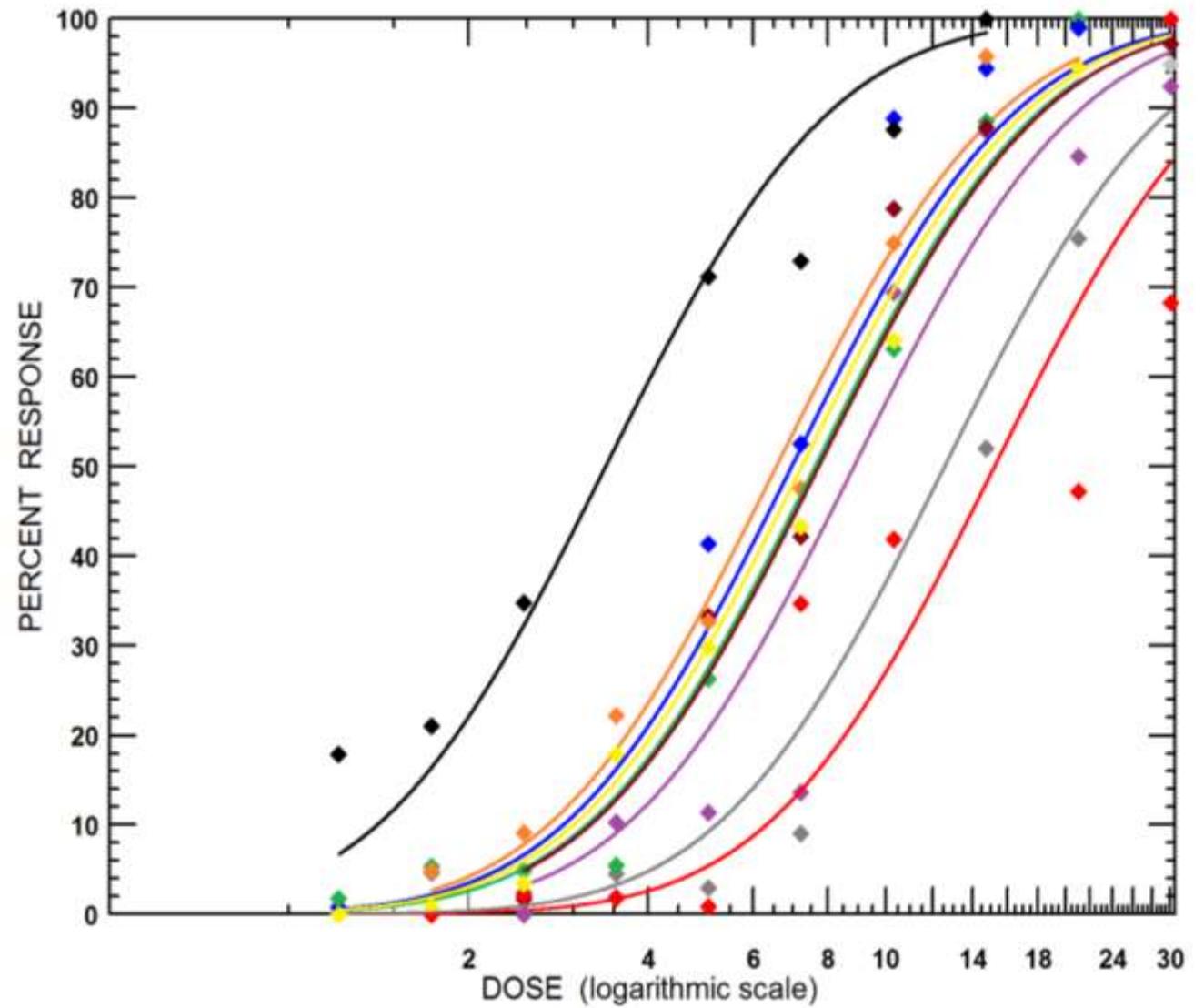


Figura 2.- Curva dosis-respuesta de predios testados

## 5.2 Estudio de la variación poblacional.

En el período extendido desde principios del mes de septiembre del año 2011, hasta fines del mes de abril del año 2012, tanto en la E.A.M. (Figura 3) como en el C.E-1 (Figura 4), se observó una distribución bimodal de las poblaciones de *H. irritans*.

En el E.A.M. se registró para todo el período una media de  $179\pm 45$  moscas/animal, con un conteo máximo de 2115 y mínimo de 0 moscas por animal. El primer pico comenzó a principios del mes de noviembre (7/11/11), se extendió hasta principios del mes de enero (3/1/12), llegando a un pico máximo de 568 moscas/animal. Durante este período la media fue de  $299\pm 62$ . Hacia mediados de enero se observó una disminución en el número de moscas. El segundo pico se produjo desde mediados del mes de marzo (13/3/12) hasta fines del mes de abril (24/4/12). La media en este período fue de  $147\pm 31$  moscas/animal, llegando a un pico máximo de 215 moscas/animal. Durante todo el trabajo se realizaron 482 conteos, de los cuales 359 (74,5%) fueron menores a 200 moscas, 55 (11,4%) entre 201 y 400 moscas y 68 (14,1%) mayor o igual a 401 moscas (Tabla 3).

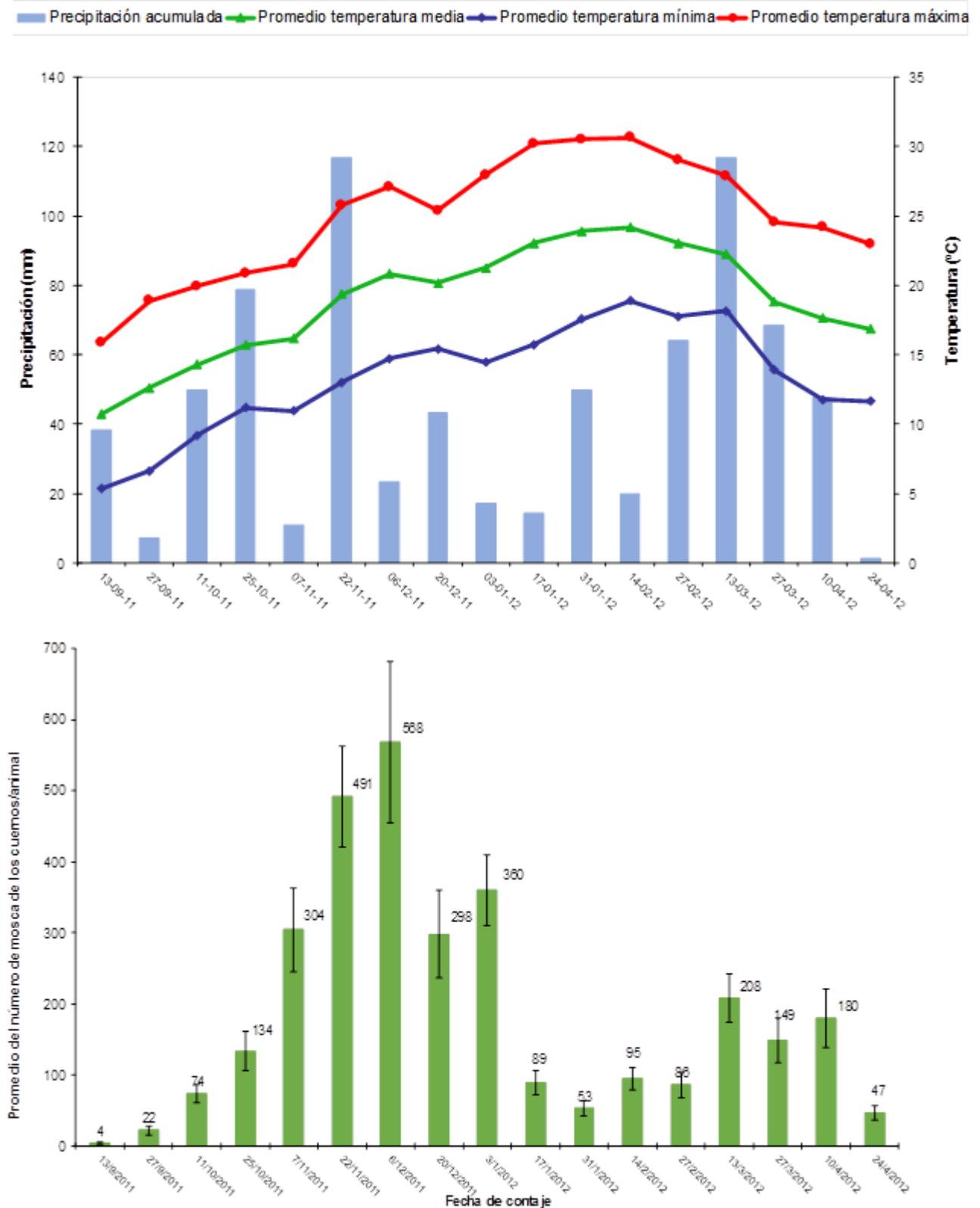
No hubo correlación entre el número de moscas/animal y las precipitaciones acumuladas ( $r=0,19$ ), y ni entre el número de moscas/animal y la temperatura media ( $r=0,25$ ).

En el C.E-1 durante todo el período la media fue de  $167\pm 17$  moscas/animal, con un conteo máximo de 1468 y mínimo de 0. El primer pico que se extendió desde fines de noviembre (24/11/11) hasta principios de enero (4/1/12) se registró en promedio un número superior a 200 moscas/animal ( $\bar{x}=342\pm 18$  moscas/animal), alcanzando un pico máximo de 448 moscas/animal. En el segundo pico comenzó a principio de marzo (5/3/12) y se extendió hasta principios de abril (11/4/12). La media fue de  $163\pm 12$  moscas/animal con un pico máximo de 216 moscas/animal. Durante todo el trabajo se realizaron 407 conteos, de los cuales 289 (70,9%) fueron menores a 200 moscas, 60 (14,8%) entre 201 y 400 moscas y 58 (14,3%) mayor o igual a 401 moscas (Tabla 3).

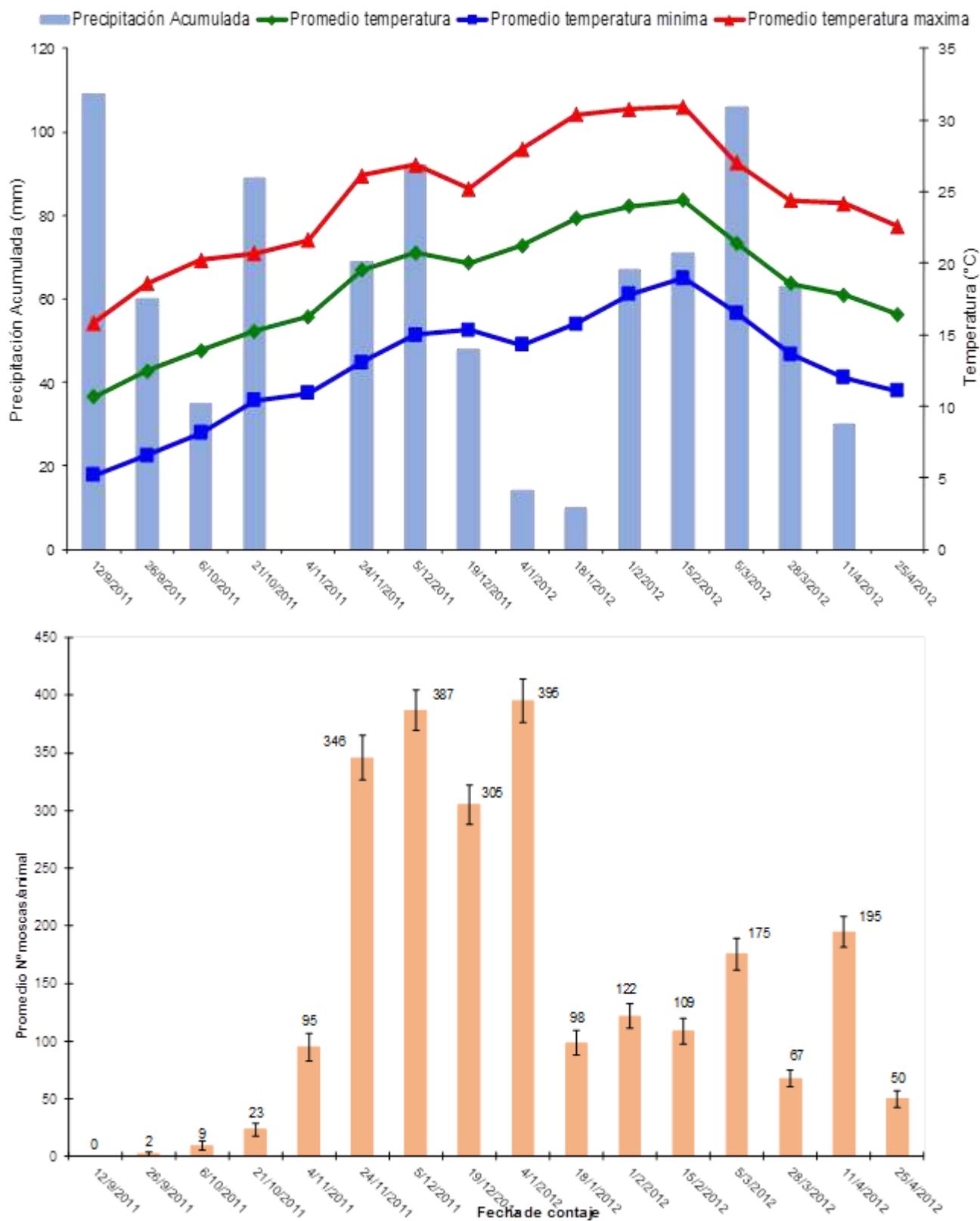
Al igual que en el establecimiento E.A.M., no hubo correlación entre el número de moscas/animal y la precipitación acumulada 15 días previos al contaje ( $r= 0,14$ ), ni entre el número de moscas/animal y la temperatura media ( $r= 0,53$ ).

**Tabla 3.- Distribución de las observaciones realizadas durante el período setiembre 2011-abril 2012, según el N° de moscas/animal, en la Escuela Agraria de Maquinaria y el Campo Experimental N°1.**

N° de moscas	Escuela Agraria de Maquinaria		Campo Experimental N°1	
	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa	Frecuencia Absoluta	Frecuencia Relativa
Menor a 200	359	74,5	289	70,9
201-400	55	11,4	60	14,8
401 o más	68	14,1	58	14,3
Total	482	100	407	100

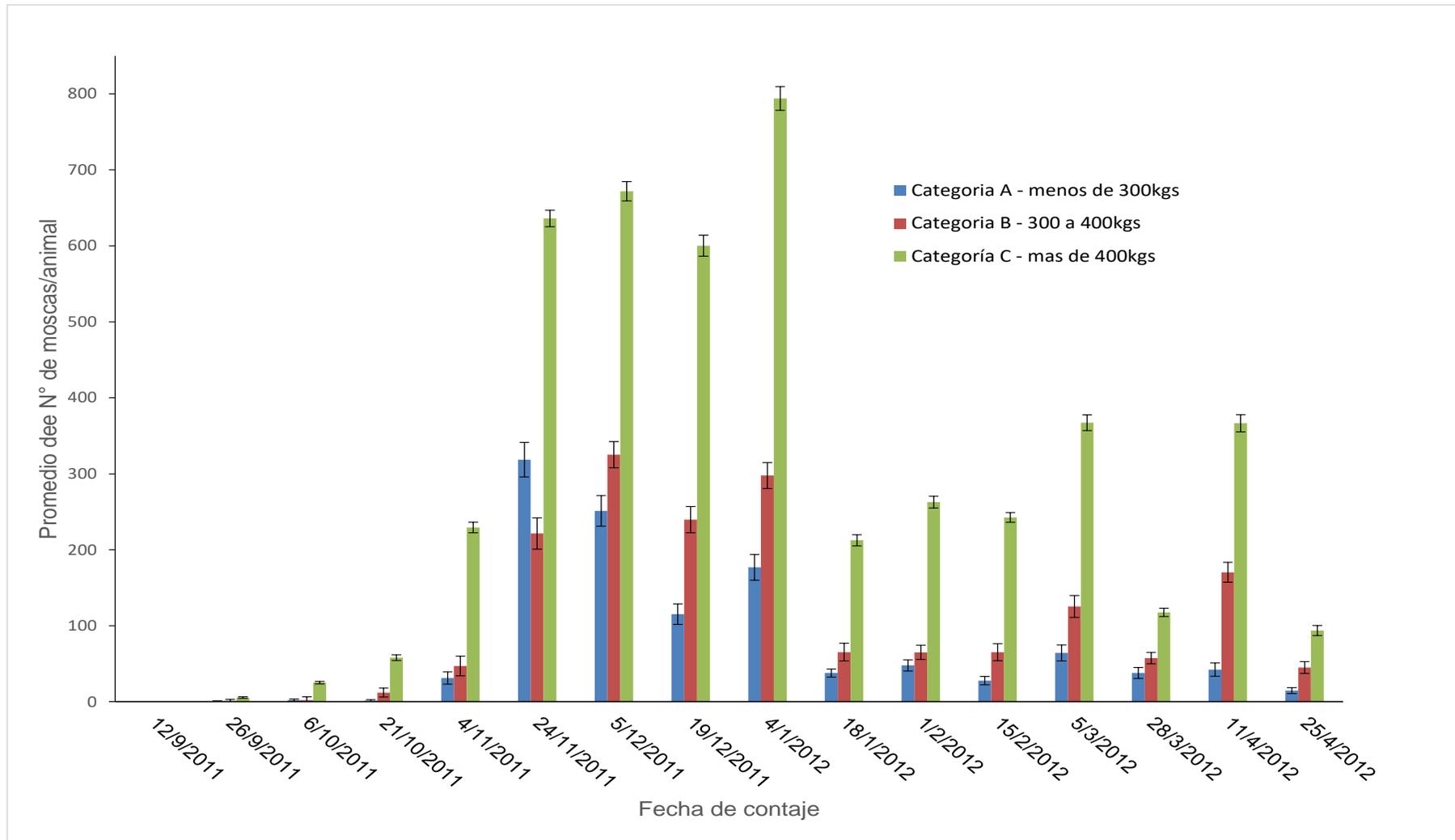


**Figura 3- Relación entre factores abióticos y promedio de moscas en la Escuela Agraria de Maquinaria de Libertad, en el período entre septiembre 2011 y abril de 2012.**



**Figura 4 - Relación entre factores abióticos y promedio de moscas en el Campo Experimental N° 1 Migues, en el período de setiembre 2011 y abril de 2012.**

Dentro del rodeo, la distribución de *H. irritans* sobre los animales no fue homogénea estando algunos animales más parasitados que otros. En la Figura 5 para el C.E-1, se muestra el promedio de moscas/animal para cada categoría según su peso. Nótese que los animales más pesados fueron parasitados por un mayor número de moscas durante todo el periodo experimental. A su vez como se puede observar en las Figuras 6 y 7, categorías B y C respectivamente, dentro de grupo de animales con pesos similares, algunos fueron más atractivos para las moscas que otros.



**Figura 5. Distribución de frecuencias observadas en bovinos parasitados por *H. irritans* discriminados en categorías en base al peso de junio 2012 en el total del período experimental en el Campo Experimental N° 1.**

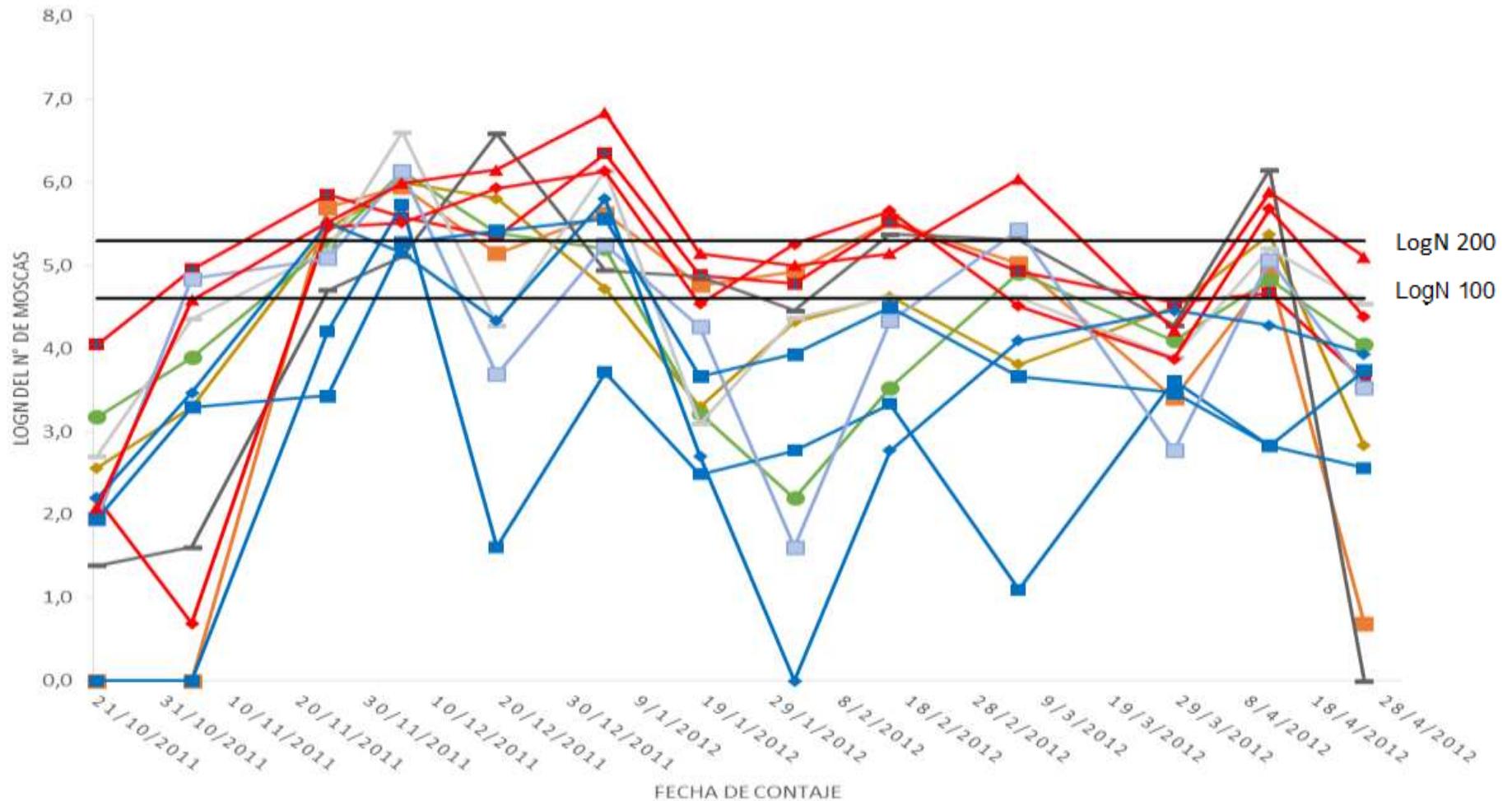


Figura 6. Distribución en base logarítmica de *H. irritans* por animal en el período de experimentación (septiembre/11-abril/12) en animales de entre 300-400kg (categoría B) en el Campo Experimental N°1 Migues. En color rojo, animales que durante todo el periodo tienen un mayor número de moscas y en color azul, los que tuvieron el menor número.

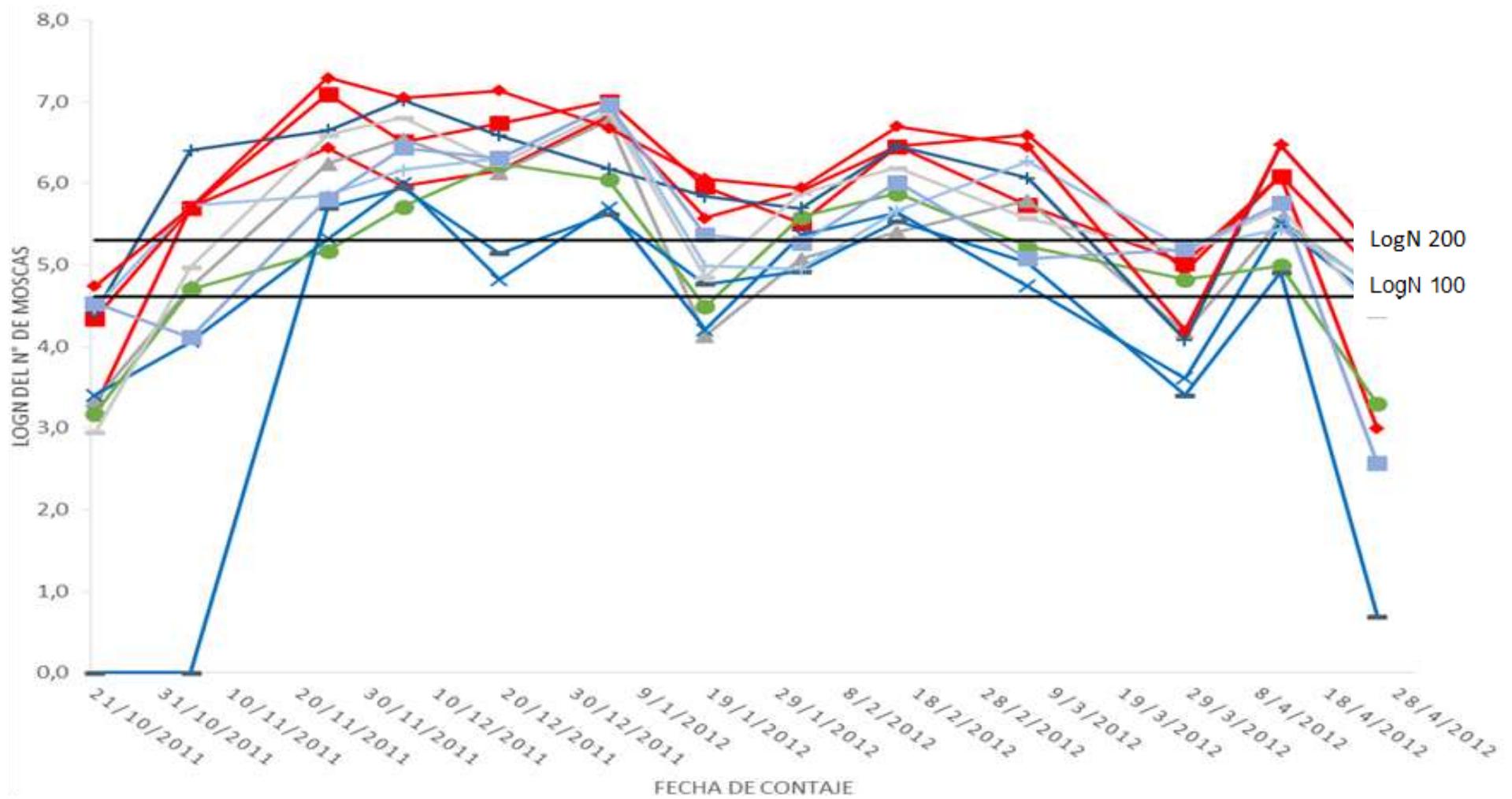


Figura 7. Distribución en base logarítmica (Log.N) de *H. irritans* por animal, en el período de experimentación (septiembre/11-abri/12l) en animales de más de 400kg (categoría C) en el Campo Experimental N°1 Migués. En color rojo animales que durante todo el período tienen un mayor número de moscas, en color azul tienen el menor número.

## 6. Discusión

El presente estudio constituye una aproximación a la situación de resistencia de *H. irritans* a fipronil. Al comparar los resultados de los bioensayos de las poblaciones de los 4 establecimientos que tenían historial de uso de fipronil, con la población de campo más susceptible, se observó que las poblaciones de los establecimientos N°3 y N°4 se encuentran en una etapa incipiente de selección de resistencia, porque si bien el FR<sub>50</sub> es superior a 2, no ocurrió lo mismo con el FR<sub>90</sub>. Contrariamente, en las poblaciones de los establecimientos N°5 y N°6, tanto el FR<sub>50</sub> como el FR<sub>90</sub> fueron superiores a 2, con lo que se puede concluir que la resistencia se está consolidando. Esto tal vez se deba a que en estos dos últimos establecimientos, se usaron productos a base de fipronil de forma frecuente, mientras que en los establecimientos N°3 y N°4 se utilizaron de forma alternada. La aparición de resistencia a fipronil por su uso reiterado fue descrita en otras especies de artrópodos como en *Chilo suppressalis* (Ming Zhang y col., 2004), en *Plutella xylostella* “polilla de la col” (Sayyed y col., 2004;); *Sogatella furcifera* (Tang y col., 2010), *Rhipicephalus (B.) microplus* “garrapata común del ganado” por bioensayos *in vitro* (Castro Janer y col., 2010) y *Musca domestica* (Liu & Yen; 2000).

De los 4 establecimientos sin historial de uso de fipronil, llama la atención que la población de moscas del establecimiento N°7 se presenta en una etapa incipiente de aparición de resistencia, ya que el FR<sub>50</sub> fue superior a 2 pero el FR<sub>90</sub> aún estaba por debajo de este valor. Esta aparición de resistencia incipiente puede deberse al ingreso de moscas resistentes a fipronil desde predios linderos que estuvieran controlando la garrapata (Paysandú es un Departamento que se encuentra en la zona de control de la garrapata) o las moscas con fipronil, ya que la mosca tiene una gran capacidad de vuelo, pudiendo alcanzar distancias de entre 5 y 15km por día, dependiendo del viento (Romano & Ferrari, 1993). Esta capacidad de vuelo sumada a la rotación habitual de los animales dentro del predio, pudo haber hecho posible el ingreso del parásito desde diferentes establecimientos vecinos. También puede deberse a una presión de selección indirecta por el uso del fipronil en el control de plagas agrícolas. Este establecimiento realiza plantaciones de trigo y soja, y está ubicado en una región agrícola donde los establecimientos linderos también realizan plantaciones similares. El fipronil es estable por largo tiempo en las capas superiores del suelo hasta por un año (US, Office of Prevention, Pesticides and Toxic

Substances, 1998), y sus residuos son retenidos en los 15 centímetros superiores del suelo (Gunasekara, 2007). Esta característica pudo haber influido de forma indirecta en la selección de resistencia. Cabe destacar que en el periodo que va del 2005 al 2008 el uso de fipronil para el control de plagas agrícolas aumentó considerablemente (Lista vigente de fitosanitarios” DGSA, 2009). Pero también se debe considerar el endosulfan, insecticida que estuvo ampliamente distribuido para el control de plagas agrícolas hasta su prohibición en 2013. Si bien el endosulfan pertenece al grupo químico de los ciclodienos, su mecanismo de acción es igual al del fipronil, por lo que la población de moscas pudo haber desarrollado resistencia cruzada por el control de plagas agrícolas con ciclodienos. El desarrollo de resistencia cruzada entre ciclodienos y fenilpirazoles (fipronil) ha sido descrito en otras especies de artrópodos (Brooke y col., 2000; Abbas y col., 2016). En Uruguay, en *Rhipicephalus (B.) microplus* fue descrita la aparición de resistencia cruzada entre fipronil y lindano (ciclodieno) (Castro-Janer y col., 2015).

En los estudios de dinámica poblacional, se observó un comportamiento bimodal con un primer pico de moscas a fines de la primavera, y otro pico a fines del verano principios del otoño, en ambos establecimientos. Este comportamiento coincide con lo observado en Argentina (Guglielmone y col., 1997) y previamente en Uruguay (Castro, 2001; Cuore y col., 2005; Solari, 2007; Castro y col., 2008). En Brasil, en la región tropical, también se observaron dos picos coincidiendo con la época de lluvias y seca (Barros, 2001).

En los dos establecimientos donde se realizaron los contajes, el primer pico de moscas fue el más extendido en el tiempo y donde se contó un mayor número de moscas/animal, a diferencia de otros estudios realizados en el país (Castro, 2001; Solari y col., 2007; Castro y col., 2008) en los cuales el segundo pico fue el de mayor número de moscas/animal. Esta diferencia puede deberse a las intensas precipitaciones ocurridas durante los meses de febrero y marzo, momento en el que tuvo lugar el segundo pico de moscas, donde se registraron precipitaciones acumuladas de 250ml aproximadamente. Las altas precipitaciones en poco tiempo permiten el encharcamiento del agua por varias horas lo que produce una disminución en el porcentaje de eclosión y también afecta negativamente a las etapas larvarias (Thomas & Kunz 1985). Episodio similar fue descrito por Castro y col. (2008) en el último año de contaje (2002), en el cual no se observó el primer

pico, y esto fue atribuido a las altas precipitaciones acumuladas en los meses previos al comienzo de la temporada de mosca (900ml acumulados en el trimestre setiembre, octubre y noviembre). La temperatura en el presente trabajo fue similar a la registrada en años anteriores en el país.

La baja correlación entre la población de moscas y los factores abióticos en este estudio, se puede deber al bajo número de contajes por ser un período de tiempo corto en el cual no hubo una gran variación de temperatura y las precipitaciones fueron variables, con algunos días de lluvias intensas intercalados con períodos secos.

Con respecto a la densidad poblacional, los datos obtenidos en el presente experimento son similares a los obtenidos en estudios previos realizados en nuestro país (Castro, 2001; Castro y col., 2008), donde la media de moscas/animal durante el período favorable no superó el límite económico de 200 moscas/animal, en ambos establecimientos. Más de 70% de las observaciones realizadas tenían menos de 200 moscas/animal. La distribución de moscas en los animales, fue similar a la obtenida por Castro (2001) donde un pequeño número de animales tiene el mayor número de moscas. Dentro de cada categoría en la que fue dividido el rodeo del C.E.-1 para su estudio, se pueden observar algunos animales con mayor número de moscas que el resto. En la categoría B (300-400kgs a mayo 2012), 4 animales de un total de 14 animales, cargaban casi la mitad de la población total de moscas, en otras palabras, casi el 30% de los animales cargaba aproximadamente el 50% de la población de moscas de ese rodeo. Contrariamente, se observaron muchos animales con un número bajo de moscas durante todo el período. Una distribución similar fue observada en la categoría C (más de 400kgs a mayo 2012), 3 animales de 10 fueron parasitados por el 43% de las moscas. Estos resultados confirman lo observado por otros autores (Barros, 2001; Castro, 2003a). El hecho de que el mayor número de moscas de una población se concentre en pocos animales, permitiría realizar un tratamiento selectivo, reduciendo la contaminación ambiental y de residuos en los animales, y de esta manera tener un impacto positivo en el control de la mosca.

## 7. Conclusiones

1. Los bioensayos *in vitro* fueron útiles para la determinación del perfil toxicológico de *H. irritans* en poblaciones de campo.
2. Se comprueba por primera vez en el Uruguay la resistencia fenotípica de *H. irritans* a fipronil.
3. El control de plagas agrícolas y de otras plagas de importancia veterinaria puede interferir en el perfil toxicológico del fipronil en la mosca de los cuernos.
4. La estación de moscas va de fines de setiembre a abril y la fluctuación poblacional es bimodal con un pico a fines de primavera e inicios de verano y otro a fines de verano y principio de otoño.
5. Un pequeño porcentaje de animales cargan el mayor número de moscas.

## 8. Bibliografía

1. Abbas, N., Ijaz, M., Ali Shad, S., Binyameen, M. (2016). Assessment of resistance risk to fipronil and cross resistance to other insecticides in the *Musca domestica* L. (Diptera: Muscidae). *Veterinary Parasitology*. 223: 71–76.
2. Barros, A.T.M. 2001. Dynamics of *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) infestation on Nelore cattle in the Pantanal, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 96(4): 445-450.
3. Bianchin, I., Alves, R. F. (1997), Mosca dos Chifres comportamento e danos em bovinos nelores. EMBRAPA – CNPGC Comunicado técnico. 55: 1-9.
4. Bianchin, I., Koller, W.W., Detmann, E. (2006). Sazonalidade de *Haematobia irritans* no Brasil Central. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 26: 79-86.
5. 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.
6. Butler, J.F. (1992). External Parasite control -En: Van Horn H.H., Wilcox C.J., DeLorenzo M.A., Large Dairy Herd management. Wisconsin, Management Service, American Dairy Science Association, p.568-583.
7. Byford, R, L, Broce, A. B.; Lockwood, J. A.; Smith, S. M., Morrison, G. G.; Bagley, C. P.(1992). Horny fly (Diptera: Muscidae) dispersal among cattle herds. *Journal of Economic Entomology*. 80: 421-426.
8. Byford, R.L. Craig., M.E., DeRouen, S.M., Kimball, M.D., Morrison, D.G., Wyatt, W.E., Foil, L.D. (1999). Influence of permethrin, diazinon and ivermectin treatments on insecticide resistance in the horn fly (Diptera: Muscidae). *International Journal Parasitology*. 29: 125-135.
9. Carballo, M., Martínez, M. (1992). Hallazgo de *Haematobia irritans* en Uruguay. *Veterinaria*, 27: 20-21.
10. Castro, E. (2001). Flutuação Populacional de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) e Impacto Produtivo da Infestação Sobre um Rebanho de Cria no

- Uruguai. M.S. Tesis. Universidad Federal de Pelotas, Rio Grande do Sul (Brazil), 58 pp.
11. Castro, E., (2003a). Mosca de los cuernos: efecto en ganado de carne en Uruguay. *Revista Plan Agropecuario*. 108: 46-48.
  12. Castro, E., Gil, A., Piaggio, J., Farias, N.A., Solari, M. A. (2003b). Influencia de factores abióticos en una población de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) en el Uruguay. *International Congress of Veterinary Epidemiology and Economic*, Viña del Mar, Chile. CD-ROM.
  13. Castro, E., Gil, A., Solari, M. A., Farías, N. A. (2005). Validation of a subjective counting method for a horn flies (*Haematobia irritans*) (Diptera: Muscidae) population in a cattle herd. *Veterinary Parasitology*. 133: 363-367.
  14. Castro, E., Gil, A., Piaggio, J., Chifflet, L., Farias, N.A., Solari, M.A, Moon, R.D. (2008). Population dynamics of horn fly, *Haematobia irritans irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), on Hereford cattle in Uruguay. *Veterinary Parasitology*. 151: 286–299.
  15. Castro-Janer, E. Rifran, L. González, P., Piaggio, J., Gil, A., Schumaker, T.T.S. (2010). *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) fipronil resistance reports in Uruguay and its evaluation by *in vitro* bioassays. *Veterinary Parasitology*. 169: 172–177.
  16. Castro-Janer, E., Díaz, A., Buscio, D., De Oliveira-Madeira, L., Piaggio, J., Barros, A.T.M. (2014). Resistencia de *Haematobia irritans* a cipermetrina e diazinon en Uruguai. XVIII CONGRESSO BRASILEIRO DE Parasitologia Veterinaria, Gramados, Brasil, Poster.
  17. Castro-Janer, E., Klafke, G.M., Capurro, M.L., Schumaker, T.T.S. (2015). Cross-resistance between fipronil and lindane in *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Veterinary Parasitology*. 210: 77-83.
  18. Chaton P.F., Ravanel P., Tissut M., Meyran J.C. (2002). Toxicity and bioaccumulation of fipronil in the nontarget arthropodan fauna associated with

- subalpine mosquito breeding sites. *Ecotoxicology Environmental Safety*.52(1):8-12.
19. Colliot, F., Kukorowski, K. A., Hawkins, D. W., Roberts, D. A. (1992). A new soil and foliar broad spectrum insecticide. Brighton Crop Protection Conference Pests and Diseases, Brighton, 23-26 noviembre, p29-34.
  20. Cuore, U., Reberon, S., Alza, D., Tarelles, A., Mautone, G., Solari, M.A: (2005). Epidemiología y Control de *Haematobia irritans* en la Cuenca Lechera Sur. Congreso Nacional de Veterinaria, Montevideo, Uruguay. CD-ROM.
  21. Dirección General de Servicios Agrícolas, Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca, República Oriental del Uruguay. Lista de productos fitosanitarios (2009). Disponible en la web: <http://www.mgap.gub.uy/unidad-ejecutora/direccion-general-de-servicios-agricolas/tramites-y-servicios/servicios/datos>. Fecha de consulta: 4/5/2016.
  22. Domingues L.N., Guerrero F.D., Becker M.E., Alison M.W., Foil L.D., (2013). Discovery of the Rdl mutation in association with acyclodiene resistant population of horn flies, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Veterinary Parasitology*. 198: 172-179.
  23. 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. *Journal of Medical Entomology*. 51(5):964-70.
  24. FAO (2012). Código Internacional de Conducta para la Distribución y Utilización de Plaguicidas Directrices sobre la Prevención y Manejo de la Resistencia a los Plaguicidas. p 59. Disponible: [www.fao.org/3/a-a0220s.pdf](http://www.fao.org/3/a-a0220s.pdf). Fecha de consulta: 15/5/2016.
  25. Foil, L.D., Hogsette, J.A., (1994). Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Revue scientifique et technique*. 13: 1125–1158.

26. 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.
27. 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 Biochemistry and Molecular Biology*. 27: 754-755.
28. Gunasekara, A.M., Truong, T., Goh, K.S., Spurlock, F., Tjeerdema, R.S.(2007). Environmental fate and toxicology of fipronil. *Journal of Pesticides Science*, 32(3): 189-199.
29. Guglielmone A.A., Anziani, O. S., Mangold, A. J., Giorgi, R.E., Volpogni, M.M., and Flores, E.G. (1997). Diagnóstico de poblaciones de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) in a recently infested region of central Argentina. *Bulletin of Entomological Research*. 87: 55-59.
30. Guglielmone, A.A., Curto, E. Anziani, O.S., Mangold, A.J. (2000). Cattle Breed-variation in infestation by the horn fly *Haematobia irritans*. *Medicine and Veterinary Entomology*. 14: 272-276.
31. Grisi L., Leite R.C., Martins J.R.D.S., Barros A.T.M.D., Andreotti R., Cançado P.H.D, Villela H.S. (2014). Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinaria*. 23(2):150-156.
32. Haufe, E. O. (1979). Reduced productivity of beef cattle infested with horn flies En: Croome G.C.R., Holmes N.D., Research highlights, Agriculture Canadian Research Station, Lethbridges, Alberta, p. 61-63.
33. Jamroz, R. C., Guerrero, F.D., Kammlah, D.M., Kunz. S.E. (1998). Role of *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 Biochemical and Molecular Biology*. 28: 1031-1037.

34. Jones, S.R., Kunz, S.E., (1998). Effects of Cold Stress on Survival and Reproduction of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *Journal of Medical Entomology* 35 (5): 725-731.
35. Krafur, E.S., Ernest, C.M. (1983). Physiological age composition and reproductive biology of horn flies populations, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), in Iowa, USA. *Journal of Medical Entomology*. 20: 664-669.
36. Kunz, S.E., Cunningham, J.R. (1977). A population prediction equation with notes on the biology of the horn fly in Texas. *Southwest Entomology*. 2: 79-87.
37. Kunz, S.E., Murrell, K.D., Lambert, G., James, L.F., Terrill, C.E. 1991. "Estimated losses of livestock to pests" EN: Pimentel, D. (Ed) *Handbook of pest Management in Agriculture*. Boca Raton. CRS, V1: 69-88.
38. LeOra Software. (2003). En: Robertson, J.L., Preisler, H.K., Russel, R.M. (Eds.), *Polo Plus Probit and Logit Analysis, User's Guide*. Berkeley, p. 36.
39. Liu, N., Yue, X. (2000). Insecticide resistance and cross-resistance in the house fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Economic Entomology*. 93: 1269–1275.
40. Lysyk, T.J.; (2000). Comparison of simple units for units for estimating population abundance and rates of change of adults horn fly (Diptera: Muscidae). *Journal of Medicine Entomology* 37: 299-307.
41. Márquez, L., Moon, R.; Cardozo, H., Cuore, U., Trelles, A., Bordaberry, S. (1997). Primer diagnóstico de resistencia de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) en Uruguay. Determinación de susceptibilidad a cypermetrina y diazinón. *Veterinaria*, 33: 20-23.
42. MingZhang, C., JinLiang, S., SinZhen, Z., Mei, L., XianioYu, L., WeiJun, Z. (2004). Monitoring of insecticide resistance and inheritance analysis of triazophos resistance in the striped stem borer (Lepodoptera: Pyralidae) *Chinese Journal Rice Science*. 18(1): 73-79.
43. Riley C., (1889). The horn Fly. *Insect life*. 2:93-103.

44. Romano, A., Ferrari, O. (1993), Mosca de los cuernos *Haematobia irritans* (L). Buenos Aires, Edigraf, 135p.
45. Sayyed, A.H.; Omar, D.; Wright, D.J. (2004). Genetics of spinosad resistance in a multi-resistant field-selected population of *Plutella xylostella*. *Pest Management Science*. 60: 827-832.
46. Sheppard, D.C., Hinkle, N.C. (1987). A field procedure using disposable materials to evaluate Horn fly insecticide resistance. *J. Agric. Entomol.* 4: 87-89.
47. Solari, M., Cuore, U., Trelles, A., Sanchís, J., Gayo, V. (2007). Aplicación del Control Integrado de Parásitos (CIP) en Establecimiento Comercial. En "Seminario Regional Aplicación del Control Integrado de Parásitos (CIP) a la Garrapata *Boophilus microplus* en Uruguay". 11-26.
48. Sparks, T.C., Quisenberry. S.S., Lockwood, J.A., Byford R.L., Roush, R.T. (1985). Insecticide resistance in the horn fly *Haematobia irritans*. *Journal of Agricultural Entomology*. 2: 217-233.
49. Stone, B.F., Haydock, R.P. (1962). A method for the cattle tick *Boophilus microplus* (Can.). *Bulletin of Entomological Research*. 53: 563–578.
50. Tang Jian; Li Jian; Shao Ying; Yang BaoJun; Liu ZeWen. (2010). *Pest Management Science*. 66 (2): 121-125.
51. Taylor, M. A. (2001). Recent Developments in Ectoparasiticides. *The Veterinary Journal*. 161 (3): 253-268.
52. Thomas, D. B., Kunz, S. E. (1985). Effects of season and density on the fecundity and survival of caged populations of adult horn flies (Diptera: Muscidae) *Journal of Economic Entomology*. 78: 106-109.
53. United States Environmental protection Agency. Fipronil for use on Rice (Regent, Icon) and Pets (Frontline), (1998). USEPA. Office of Prevention, Pesticides and Toxic Substances Washington DC, US. Disponible: [nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/40001EGT.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Clie](http://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/40001EGT.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Clie)

nt=EPA&Index=1995+Thru+1999&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C95thru99%5CTxt%5C00000022%5C40001EGT.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL. Fecha de consulta: 10/5/2016

54. United States Environmental protection Agency. New Pesticide Fact Sheet, (1996), USEPA. Office of Prevention Pesticides and Toxic Substances. Washington DC, US. p 10. Disponible: [nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P1001KCY.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1995+Thru+1999&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C95thru99%5CTxt%5C00000021%5CP1001KCY.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL](http://nepis.epa.gov/Exe/ZyNET.exe/P1001KCY.TXT?ZyActionD=ZyDocument&Client=EPA&Index=1995+Thru+1999&Docs=&Query=&Time=&EndTime=&SearchMethod=1&TocRestrict=n&Toc=&TocEntry=&QField=&QFieldYear=&QFieldMonth=&QFieldDay=&IntQFieldOp=0&ExtQFieldOp=0&XmlQuery=&File=D%3A%5Czyfiles%5CIndex%20Data%5C95thru99%5CTxt%5C00000021%5CP1001KCY.txt&User=ANONYMOUS&Password=anonymous&SortMethod=h%7C-&MaximumDocuments=1&FuzzyDegree=0&ImageQuality=r75g8/r75g8/x150y150g16/i425&Display=hpfr&DefSeekPage=x&SearchBack=ZyActionL&Back=ZyActionS&BackDesc=Results%20page&MaximumPages=1&ZyEntry=1&SeekPage=x&ZyPURL). Fecha de consulta: 10/5/2016.