

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

PUESTA A PUNTO DE UNA TÉCNICA DE PCR MULTIPLEX PARA EL

DIAGNÓSTICO DE LA RESISTENCIA DE

***Haematobia irritans* A INSECTICIDAS**

Por

Lucia Roth Kelland

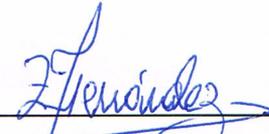
TESIS DE GRADO presentada como
uno de los requisitos para obtener el
título de Doctor en Ciencias Veterinarias
Orientación: Producción animal

MODALIDAD: Ensayo Experimental

MONTEVIDEO
URUGUAY
2018

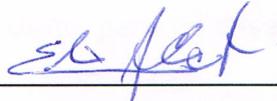
Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:



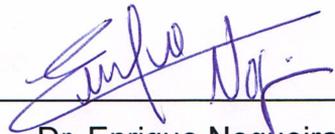
Dra. Zully Hernández

Segundo miembro (Tutor):



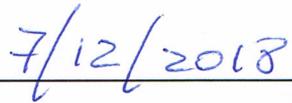
Dra. Eleonor Castro Janer

Tercer miembro:



Dr. Enrique Nogueira

Fecha:



Autores:

Br. Lucia Roth

Agradecimientos:

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

Al Departamento de Parasitología y Enfermedades Parasitarias.

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

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 Br. Florencia Fontes por su apoyo técnico en las actividades del laboratorio y también por el gran compañerismo que se generó.

Al Dr. Diego Buscio por su ayuda con las tareas a campo.

A mi familia y amigas por el apoyo de todos los días.

Tabla de contenidos

	Páginas
Página de aprobación	2
Agradecimientos	3
Tabla de contenidos	4
Lista de Tablas	5
Lista de Figuras	6
Resumen	8
Summary	9
1. Introducción	10
2. Hipótesis	12
3. Objetivos	13
4. Materiales y métodos	14
5. Resultados	23
6. Discusión	36
7. Conclusiones	38
8. Bibliografía	39

Lista de Tablas

	Páginas
Tabla 1. Datos de los establecimientos donde se realizaron los bioensayos fenotípicos.	16
Tabla 2. Valores de FR ₅₀ para fipronil y cipermetrina en las poblaciones estudiadas.	23
Tabla 3. Frecuencia de mutaciones <i>rdl</i> y tipo <i>kdr</i> en poblaciones de <i>Haematobia irritans</i> (Uruguay)	32
Tabla 4. Relación del sexo de <i>Haematobia irritans</i> con la resistencia	33

Lista de Figuras

	Páginas
Figura 1. Distribución espacial en el territorio nacional de los establecimientos correspondientes a las poblaciones estudiadas.	15
Figura 2. Cajas de Petri con papeles filtro impregnados con las distintas concentraciones de insecticidas.	17
Figura 3. Animales con moscas para recolectar del lomo con redes entomológicas.	17
Figura 4. Moscas vivas y muertas, en cajas de Petri con papel de filtro impregnado con fipronil.	18
Figura 5. Separación de la cabeza de moscas machos y hembras.	18
Figura 6. Pellet de DNA extraído de cada individuo de <i>Haematobia irritans</i> .	19
Figura 7. Calidad de DNA de la Población 1, individuos número 1 al 16 en gel de agarosa 0,8 %.	20
Figura 8. Muestras en termociclador con gradiente de temperatura para ensayo de anidamiento para <i>kdr</i> y <i>rdl</i> .	24
Figura 9. Electroforesis de los productos de PCR del mismo individuo en un gradiente de temperatura (57 a 63 °C), con diferentes concentraciones de primer y DNA.	24
Figura 10. Electroforesis de los productos de PCR del mismo individuo en un gradiente de temperatura (58,1 a 61,9 °C), con diferentes concentraciones de dNTP, primer y DNA.	25
Figura 11. Electroforesis de los productos de PCR de 3 individuos en una temperatura de anidamiento 58,5 °C, con diferentes concentraciones de magnesio y enzima taq polimerasa.	26

Figura 12. Electroforesis de los productos de PCR de 4 individuos en una temperatura de anidamiento 58,5°C, con diferentes concentraciones de primer <i>kdr</i> y <i>rdl</i> .	28
Figura 13. Electroforesis de individuos de la población 1	30
Figura 14. Electroforesis de individuos de la población 2	30
Figura 15. Electroforesis de individuos de la población 3	31
Figura 16. Electroforesis de individuos de la población 4	31
Figura 17. Frecuencia alélica de los alelos <i>kdr</i> susceptible y resistente.	32
Figura 18. Porcentaje de hembras y machos de <i>Haematobia irritans</i> resistentes a piretroides sintéticos.	34
Figura 19. Secuencias del alelo <i>rdl</i> en forward y alineadas con la secuencia de <i>Haematobia irritans</i> KC346253.1, sin mutación presente.	35
Figura 20. Secuencias del alelo <i>kdr</i> en forward y alineadas con la secuencia de <i>Haematobia irritans</i> U83874.1, con la mutación presente	35

Resumen

Haematobia irritans es un díptero parásito de los bovinos en pastoreo que ocasiona principalmente intranquilidad. En Uruguay, su control se basa en el uso de insecticidas habiéndose diagnosticado resistencia a piretroides sintéticos a pocos años de su ingreso al país, estando actualmente ampliamente distribuida por el país. En virtud de que se han comenzado a usar otros productos insecticidas, es importante identificar mutaciones relacionadas a resistencia que permitan monitorear las estrategias de control y desarrollar técnicas moleculares que permitan hacer un diagnóstico simultáneo a las mismas. La resistencia tipo *kdr* en poblaciones resistentes a cipermetrina, fue demostrada previamente en el país, pero hasta el momento no se ha estudiado la presencia de mutación *rdl*, asociada a resistencia a ciclodienos y posiblemente asociada a fipronil.

Este trabajo tuvo como objetivos poner a punto la Reacción en cadena de la Polimerasa Multiplex (PCR Multiplex) que permita detectar simultáneamente en un mismo individuo, las mutaciones a cipermetrina y a fipronil y comprobar que los individuos que se mostraron resistentes en los bioensayos poseen la mutación genética que les confiere la resistencia. Dicho ensayo se realizó en el período de marzo 2016 a junio 2017.

Se escogieron 11 establecimientos, de los cuales 9 presentaron resistencia fenotípica a fipronil y 2 eran susceptibles, para cipermetrina también 9 presentaron resistencia fenotípica y 2 eran susceptibles al principio activo. Se extrajo DNA de esas poblaciones con un kit comercial de extracción y también con la técnica de fenol cloroformo. Para evitar interferencia entre la carga genética de moscas machos en moscas hembras, el DNA se extrajo sólo de las cabezas de 15 machos y de 15 hembras de *Haematobia irritans*, por población. Posteriormente se puso a punto una PCR multiplex, alelo específico, en base a protocolos descritos por otros autores, para la mutación *kdr* y para la mutación *rdl* descrita para endosulfan. La puesta a punto comprendió el estudio de diferentes temperaturas de anidamiento para los primers escogidos, concentración de reactivos, y ciclos. Todas las poblaciones resistentes a cipermetrina presentaron resistencia tipo *kdr*, principalmente en la forma de heterocigosis. Ninguna de las poblaciones resistentes a fipronil, presentó la mutación descrita para endosulfan, tal vez porque la resistencia este en una etapa incipiente o porque dicha mutación no es la responsable de la resistencia, pudiendo estar localizada en otro punto del GABA-Cl o porque la resistencia en esas poblaciones sea de origen metabólico. Se presenta el protocolo optimizado de esta técnica multiplex alelo específica.

En conclusión, la resistencia tipo *kdr* está ampliamente distribuida en todo el país, y el proceso de selección para resistencia se encuentra aún en la etapa de meseta para la mayoría de las poblaciones estudiadas. Se llama la atención a que en una población se comenzó a detectar individuos homocigotos resistentes, aumentando las probabilidades de no reversión de la resistencia. Se sugiere seguir secuenciando fragmentos del GABA-Cl para identificar las mutaciones a fipronil.

Summary

Haematobia irritans is a dipterous parasite of grazing cattle that causes mainly unrest. In Uruguay, its control is based on the use of insecticides, resistance to synthetic pyrethroids having been diagnosed a few years after entering the country. It is currently widely distributed throughout the country. Since other insecticide products have been used, it is important to identify resistance-related mutations that allow for the monitoring of control strategies and the development of molecular techniques that allow simultaneous diagnosis of them. *Kdr*-type resistance in populations resistant to cypermethrin was previously demonstrated in the country, but the presence of *rdl* mutation, associated with resistance to cyclodienes and possibly associated with fipronil, has not been studied to date.

The objective of this work was to fine tune the Multiplex Polymerase Chain Reaction (Multiplex PCR) that allows the simultaneous detection in the same individual of cypermethrin and fipronil mutations and to verify that the individuals that were resistant in the bioassays have the mutation genetics that gives them resistance. This trial was conducted in the period from March 2016 to June 2017.

Eleven establishments were chosen, of which 9 had phenotypic resistance to fipronil and 2 were susceptible, for cypermethrin, 9 also presented phenotypic resistance and 2 were susceptible to the active principle. DNA was extracted from these populations with a commercial extraction kit and also with the phenol chloroform technique. To avoid interference between the genetic load of male flies in female flies, DNA was extracted only from the heads of 15 males and 15 females of *Haematobia irritans*, by population. Subsequently, a multiplex PCR, a specific allele was prepared, based on protocols described by other authors, for the *kdr* mutation and for the *rdl* mutation described for endosulfan. The set-up included the study of different nesting temperatures for the selected primes, concentration of reagents, and cycles. All the populations resistant to cypermethrin presented *kdr* resistance, mainly in the form of heterozygosis. None of the populations resistant to fipronil presented the mutation described for endosulfan, so the resistance is incipient or because said mutation is not responsible for the resistance, it may be located in another point of GABA-Cl or because the resistance in the studied populations are of metabolic origin. The optimized protocol of this specific allele multiplex technique is presented.

In conclusion, *kdr*-type resistance is widely distributed throughout the country, and the selection process for resistance is still in the plateau stage for most of the populations studied. Attention is drawn to the fact that in a population homozygous resistant individuals were detected, increasing the probabilities of non-reversal of resistance. It is suggested to continue sequencing fragments of GABA-Cl to identify mutations to fipronil

1- INTRODUCCIÓN:

La mosca de los cuernos (*Haematobia irritans*), es un díptero hematófago obligatorio en su estado adulto, principalmente de los bovinos en pastoreo. Es una de las principales plagas del ganado de los Estados Unidos, produciendo importantes pérdidas económicas. Ingresó a nuestro país a inicios de la década del 90 (Carballo, M.; Martínez, M., 1991), dispersándose rápidamente por todo el país. Las pérdidas que produce no son sólo debidas a su hematofagia, sino principalmente a la irritación y estrés, impidiendo que el animal se alimente bien, con la consiguiente disminución de la ganancia de peso y de la producción láctea (Byford y col., 1999). Fueron estimadas pérdidas económicas anuales de 730 millones de dólares en Estados Unidos (Butler, 1992) y de 865 millones de dólares en Brasil (Grisi y col., 2014)

Los métodos de control utilizados en nuestro país se basan exclusivamente en la utilización de insecticidas, principalmente piretroides sintéticos (PS), órganos fosforados (OF) y fipronil, lo que conduce, inevitablemente, a la selección de individuos resistentes y, consecuentemente, a la disminución de la eficiencia del control (Barros y col., 2002).

Según FAO (2012) “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”, siendo de origen genético y heredable.

La resistencia surge como una mutación espontánea en la población, que va siendo seleccionada por los tratamientos insecticidas. La rápida selección para resistencia se ve favorecida por un alto número de tratamientos y por un alto número de generaciones por año, por ejemplo, para mosca de los cuernos, en nuestro país fueron estimadas 12 generaciones por año (Castro Janer y col., 2008).

Los principales tipos de resistencia son:

- a- Por insensibilidad en el sitio de acción habiendo sido descritas mutaciones puntuales en los canales de sodio (*knockdownresistance*: ´mutación tipo *kdr* y *super-kdr*), en el gen de la enzima acetilcolinesterasa (G262A AChE) y en el receptor GABA (A302S - mutación *rdl*), relacionada a resistencia a PS (Guerrero y col., 1997; Jamroz y col., 1998), OF (Foil y col., 2010) y ciclodienos (Domingues y col., 2013, 2014).
- b- De tipo metabólica, donde hay una alteración de la producción de enzimas detoxificantes (aumento en la concentración de esterasas y oxidasas). Esto se puede deber a una duplicación génica o a una desregulación del promotor del gen.

En Uruguay, el primer diagnóstico de resistencia de *H. irritans* a PS fue realizado a pocos años de haber ingresado al país (Marques y col., 1997). Actualmente, dicha resistencia está ampliamente distribuida por todo el país (Castro Janer y col., 2014), habiéndose encontrado, recientemente, casos de resistencia a fipronil (Buscio, 2013).

Como diagnóstico de resistencia se usan bioensayos *in vitro*, siendo el más utilizado el de Sheppard y Hinkle (1987), donde se impregnan papeles de filtro tipo Whatman Nº 1 con diferentes concentraciones de insecticida y se colocan en cajas de Petri cuyas tapas tienen una pequeña perforación para introducir las moscas (n=30). Las

moscas se enfrentan a las diferentes concentraciones de insecticidas por un período de tiempo. La mortalidad de las moscas se determina a las dos horas de la exposición, contando las moscas vivas y muertas por cada dilución. Con estos datos se establece la curva dosis-mortalidad y se determina la concentración letal del 50 % (CL₅₀ es la concentración estimada de una sustancia que mataría al 50% de una población, después de un plazo definido de exposición), para posteriormente interpretar los resultados y definir la característica de población resistente o susceptible. El cociente de este valor con la CL₅₀ de una población de referencia susceptible al insecticida evaluado es conocido como el factor de resistencia (FR), donde valores cercanos a 1 indican susceptibilidad, valores superiores a 2 indican resistencia (Barros y col., 2002) y valores menores a 2 pero significativamente diferentes con la población susceptible de referencia y con intervalos de confianza que no se superponen, son considerados como sospecha de resistencia o resistencia incipiente (Castro-Janer y col., 2008).

Este tipo de bioensayo tiene como inconveniente que se precisa un mínimo de 2000 moscas capturadas de diferentes animales para llenar las cajas, lo cual no siempre está disponible. El llenado debe ser inmediatamente después de esta captura. Por otro lado, realizan el diagnóstico fenotípico de la resistencia o sea cuando el número de individuos resistentes es alto en la población, limitando las alternativas de manejo de la resistencia.

Para el control de la mosca se necesitan técnicas de diagnóstico más precoces o sea cuando el número de individuos mutantes es muy bajo y los cambios de estrategia pueden tener un impacto favorable mayor. Para ello es necesario desarrollar técnicas moleculares que diagnostiquen la resistencia en su estado inicial, cuando son pocos los individuos con genes de resistencia en la población. Pero también es altamente positivo, desarrollar técnicas que diagnostiquen simultáneamente diferentes mutaciones.

En Uruguay, se ha descrito la presencia de la mutación tipo *kdr* en poblaciones de mosca, la cual está ampliamente dispersa por el país (Castro-Janer y col., 2014). Recientemente, se desarrolló una PCR Multiplex donde se diagnostican simultáneamente en el mismo individuo, las mutaciones tipo *kdr*, acetilcolinesterasa y *rdl* (Domingues y col., 2014). La mutación *rdl* ha sido descrita para los insecticidas organoclorados (dieldrin, endosulfan) (Domingues y col., 2013), pero en muchos insectos esa misma mutación ha sido descrita también para los fenilpirazoles (fipronil). La resistencia cruzada entre estos grupos químicos ha sido descrita para insectos y recientemente para garrapatas (Castro-Janer y col., 2014). La mutación *rdl* descrita por Domingues y col. (2014) está asociada a resistencia a endosulfan, un ciclodieno que tiene el mismo mecanismo de acción que los fenilpirazoles como fipronil. Si bien en Uruguay el uso de este insecticida está prohibido, se sospecha que dicha mutación esté presente debido al uso de fipronil en el control de las moscas. En 2013, comenzaron a registrarse algunos casos de resistencia de la mosca de los cuernos a fipronil a través de bioensayos *in vitro* (Buscio, 2013), por lo que cabe esperar que dicha mutación también esté presente en poblaciones resistentes a fipronil en Uruguay.

En resumen, frente a la amplia dispersión de la resistencia, se precisa un monitoreo constante de la misma para la realización de un control químico más eficiente. Si bien hay herramientas para el diagnóstico de la resistencia, como los bioensayos *in*

vitro, el principal inconveniente que tienen es que sólo diagnostican la resistencia fenotípica, lo cual no es precoz, o sea la diagnostica cuando tenemos el problema y precisa de muchísimos individuos para realizar el test. Teniendo en cuenta que la mutación tipo *kdr* ya fue diagnosticada en poblaciones de moscas resistentes a PS en Uruguay, siendo frecuente, y que fenotípicamente se ha demostrado resistencia a fipronil, se decidió poner a punto una técnica PCR Multiplex alelo específica para la mutación tipo *kdr* y *rdl* con el objetivo de diagnosticar la frecuencia de individuos de *H. irritans* resistentes a estos insecticidas.

2- HIPÓTESIS:

La frecuencia de moscas resistentes a cipermetrina es alta y está ampliamente dispersa.

La mutación *rdl* descrita para *Haematobia irritans* en resistencia a endosulfan está presente en poblaciones resistentes a fipronil

3- OBJETIVO:

3.1 General

Utilización de la técnica Reacción en cadena de la Polimerasa Multiplex (PCR Multiplex) para diagnóstico de resistencia de *Hematobia irritans* a insecticidas: cipermetrina y fipronil

3.2. Específicos

3.2.1. Poner a punto la PCR Multiplex que permita detectar simultáneamente en un mismo individuo, las mutaciones a los insecticidas.

3.2.2. Comprobar que los individuos que se mostraron resistentes en los bioensayos poseen la mutación genética que les confiere la resistencia.

4- MATERIALES Y MÉTODOS:

Estrategia de investigación

Con el siguiente plan de trabajo se buscó llevar a cabo los objetivos planteados en no más de un año.

- 1- Usar poblaciones con resistencia fenotípica conocida a PS y fipronil.
- 2- Usar la técnica PCR Multiplex descrita por Domingues y col. (2014).
- 3- Poner a punto el diagnóstico de la mutación de *rdl* (alelo específica) (60 individuos).
- 4- Ajustar la técnica de PCR Multiplex para *kdr* y *rdl*
- 5- Aplicación de la técnica en 11 poblaciones de mosca de los cuernos (n=330).

4.1. Poblaciones

El presente trabajo fue realizado en el período comprendido entre marzo del año 2016 y junio del año 2017, donde se estudiaron poblaciones de *H. irritans* de diferentes establecimientos de Uruguay.

En el laboratorio del Departamento de Parasitología Veterinaria de la Facultad, se preparó el material para la realización de los bioensayos *in vitro* y se realizaron las técnicas moleculares.

Inicialmente, se realizaron bioensayos en algunos establecimientos pero como la población de moscas durante el período de estudio fue baja, se decidió utilizar las moscas del banco de moscas del Departamento (Figura 1). Para poder determinar la frecuencia de las mutaciones se utilizaron individuos de poblaciones generales (se toma al azar pudiendo ser individuos de genoma resistentes o susceptibles) con las que contaba en el laboratorio obtenidas durante 2012 y 2013 que presentaron resistencia fenotípica a cipermetrina y fipronil en los bioensayos *in vitro* y que fueron conservados en etanol 70%. La caracterización toxicológica de estas poblaciones fue realizada previamente por Buscio (2013) (Tabla 1).



Figura 1: Distribución espacial en el territorio nacional de los establecimientos correspondientes a las poblaciones de *Haematobia irritans* estudiadas, adaptado de Buscio (2013). Los números corresponden al correlativo de las poblaciones estudiadas.

Tabla 1: Datos de los establecimientos donde se realizaron los bioensayos fenotípicos para el diagnóstico de resistencia de *Haematobia irritans* a insecticidas.

Pob.	Ha.	Rubro	Cg.	Garrapata	Tratamientos antiparasitarios	Bioensayo Fenotípico	
						Fipronil	Cipermetrina
1	950	GCC	300	No	ethion15%.	Resistente	Susceptible
2	800	GCC	500	No	cipermetrina y sus mezclas.	Resistente	Resistente
3	300	INV	80	Sí	Ivermectina 3,15% ,Alfa-cipermetrina, fipronil 1%.	Resistente	Resistente
4	300	SP	80	No	fipronil 1% , ivermectina 3,15%, cipermetrina	Resistente	Resistente
5	200	CRIA	32	Si	cipermetrina 6% ,ethion 15%-cipermetrina 5%, fipronil 1%	Resistente	Resistente
6	700	INV	400	No	ethion 15% - cipermetrina 5%	Resistente	Resistente
7	1000	GCC	700	Si	Hace 2 años Fipronil, ahora amitraz al 12%	Resistente	Susceptible
8	2000	GCC	1300	No	cipermetrina6%, cipermetrina6%-carbaril2%, cipermetrina 5%-ethion15%.	Resistente	Resistente
9	500	GCC	600	No	ethion 15%- cipermetrina 5%	Resistente	Resistente
10	150	INV	80	No	moxidectina 0,5%	Susceptible	Resistente
11	900	GCC	750	No	cipermetrina 6% , ethion 15%- cipermetrina 5%	Susceptible	Resistente

Datos recogidos de Buscio (2013). *Pob=Población, *Ha.=Hectáreas, *Cg.=Cabezas de ganado, *GCC=GANADERIA DE CICLO COMPLETO, *INV=INVERNADA, *SP=SILVO PASTOREO.

4.2. Bioensayos

Los bioensayos *in vitro* se realizaron según la técnica de Sheppard y Hinkle (1987) con algunas modificaciones (se usaron 6 concentraciones que incluían la sobrevivencia total y la mortalidad total de la mosca, a su vez todas las concentraciones se realizaban por triplicado).

Se impregnaron papeles de filtro Whatman N° 1 con insecticidas de grado técnico conocido (cipermetrina 95% y fipronil 96,3%). Los papeles se identificaron y se impregnaron dentro de una campana de extracción de gases y se dejaron secar por 12-24 horas a temperatura ambiente. Posteriormente, se guardaron en papel aluminio, se identificaron y se conservaron congelados hasta su uso en el campo.

El día del ensayo a campo, los papeles impregnados se colocaron en las cajas de Petri, cuyas tapas habían sido perforadas previamente (Figura 2).

En los establecimientos, las moscas se capturaron con una red entomológica de los animales (Figura 3) e inmediatamente se colocaron las moscas ($n= 30-40$) en las cajas de Petri. En los primeros minutos, se contaron las moscas muertas por mala manipulación para su posterior descarte del análisis. A las 2 horas de colocadas las moscas en las cajas (Figura 4), se capturaron las moscas sobrevivientes las que se colocaron en etanol absoluto para su posterior procesamiento en el laboratorio.

Inicialmente, se realizaron algunos bioensayos para determinar fenotípicamente la resistencia a los dos insecticidas, pero como la población de moscas en el período fue muy baja, se decidió usar poblaciones conocidas que estaban en el banco de moscas del laboratorio. Concretamente, se usaron poblaciones del laboratorio (material que estaba conservado congelado en etanol) para determinar la frecuencia de genes resistentes de poblaciones testadas previamente por Buscio (2013).



Figura 2: Cajas de Petri con papeles filtro impregnados con las distintas concentraciones de insecticidas.



Figura 3: Animales con moscas para recolectar del lomo con redes entomológicas.



Figura 4: Moscas vivas y muertas, en cajas de Petri con papel de filtro impregnado con fipronil.

4.3. Extracción de DNA genómico

De cada población se extrajeron al azar 15 machos y 15 hembras, diferenciándolas en cada caso por la distancia entre los ojos (machos poseen los ojos mas juntos), que estaban conservados en etanol 70 %. Los individuos se sacaron del etanol y fueron lavados con agua miliq (agua ultra pura) y secados en papel de filtro. Bajo lupa y mediante pinzas, se realizó la separación de la cabeza y del cuerpo (Figura 5) las que se identificaron y se guardaron separadamente en dos microtubos de 1,5 ml con alcohol 70 % a -20°C .

Se utilizó sólo la cabeza previniendo posible contaminación de DNA de los machos en la espermateca de las moscas hembras. Para estandarizar el procedimiento los individuos de cada población se identificaban del número 1 al 15 para las hembras y del 16 al 30 para los machos.

Al inicio se utilizó un kit de extracción de DNA siguiendo las indicaciones del fabricante (BIOMETRA Analytikjena) para las poblaciones N° 1, N° 2, N° 10 y N° 11. Posteriormente, por falta de recursos económicos, se realizó la extracción de DNA con fenol cloroformo. A continuación, se presenta el protocolo de extracción utilizado.



Figura 5: Separación de la cabeza de moscas machos y hembras.

PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE DNA-OVERNIGHT

- 1- Colocar en un eppendorf de 1,5 ml 300 μ l de solución tampón de lisis (EDTA 100 Mm, Tris-HCl 100 Mm, NaCl 100 Mm, SDS 100 Mm)
- 2- Colocar la cabeza de la mosca y macerar suavemente con un pistilo.
- 3- Adicionar 300 μ l de solución tampón de lisis
- 4- Colocar 1,5 μ l de Rnasa 20 mg/ml (invertir los tubos suavemente)
- 5- Llevar los tubos a baño maria a 37 °C por 45´
- 6- Colocar 3 μ l de Proteinasa K 20 mg/ml (invertir los tubos suavemente)
- 7- Llevar los tubos a Block seco 50 °C por 3 horas
- 8- Enfriar en hielo – spin rápido en microcentrífuga
- 9- Colocar 600 μ l de Fenol+cloroformo
- 10- Invertir los tubos manualmente, lentamente y en forma continua por 5´
- 11- Spin 10000 rpm a 4 °C por 5´
- 12- Colectar 500 μ l del sobrenadante y colocarlo en un nuevo microtubo
- 13- Adicionar 500 μ l de una solución que contiene 25 fenol: 24 cloroformo: 1 alcohol isoamilico (fenol/cloroformo 1:1)
- 14- Invertir los tubos manualmente, lentamente y en forma continua por 5´
- 15- Spin 10000 rpm a 4 °C por 5´
- 16- Colectar 400 μ l del sobrenadante y colocarlo en un nuevo microtubo
- 17- Colocar 600 μ l de Cloroformo
- 18- Invertir los tubos manualmente, lentamente y en forma continua por 5´
- 19- Spin 10000 rpm a 4 °C por 5´
- 20- Colectar 300 μ l del sobrenadante y colocarlo en un tubo definitivo conteniendo 30 μ l de acetato de sodio 3 M
- 21- Colocar 600 μ l de Etanol (EtOH) 100 % helado
- 22- Invertir los microtubos varias veces
- 23- OVERNIGHT en freezer –20 °C
- 24- Spin 10000 rpm a 4 °C por 10´- descartar el sobrenadante
- 25- Colocar 1000 μ l de EtOH 100 % helado y repetir paso 24
- 26- Repetir procedimiento con EtOH 70 % helado, 2 veces
- 27- Dejar secar el EtOH en block seco (temperatura ambiente)
- 28- Diluir el DNA (Figura 6) en 50 μ l de TE (100mM Tris-Cl y 10mM EDTA ambos a pH 8.0).



Figura 6: Pellet de DNA extraído de cada individuo de *Haematobia irritans*

Luego de la extracción se observó la calidad de DNA mediante una corrida en gel de agarosa 0,8 % y bromuro de etídeo (1 μ l cada 25 ml). Se sembraron 3 μ l de DNA + 1 μ l “loading buffer” (Figura 7) y se corrió a 80 Voltios de potencia por 45 minutos.

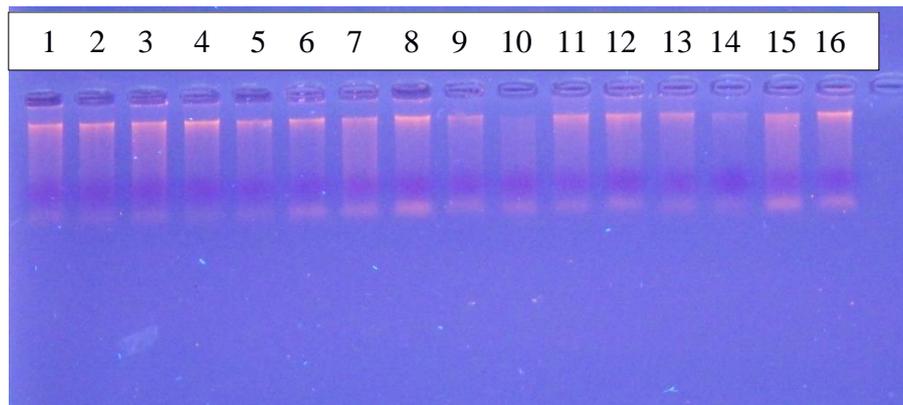


Figura 7: Calidad de DNA (aparición de una banda bien definida al inicio del gel) de *Haematobia irritans*, población 1, individuos número 1 al 16 en gel de agarosa 0,8 %.

4.4. PCR Multiplex

Se puso a punto la técnica de PCR Multiplex descrita por Domingues y col. (2014), realizando dos reacciones por separado que testaron los alelos resistentes y susceptibles. En ambas reacciones se adicionaron primers que amplificaron el control positivo de reacción GAPDH, primers para la mutación tipo *kdr* y *rdl*. Los productos de PCR se visualizaron por electroforesis en gel de agarosa 4% coloreados con GelStar (Lonza). Los tamaños de los amplicones fueron de 285 pb y 98 pb, para las mutaciones *kdr* y *rdl*, respectivamente. El amplicon referente al control positivo GAPDH tiene 154 pb.

Se debieron realizar varios ajustes al protocolo descrito por Domingues y col. (2014), tanto en las concentraciones de los diferentes reactivos de la PCR incluyendo el DNA, como en la temperatura de anidamiento y la cantidad de ciclos. Estos ajustes están detallados en la sección Resultados, conjuntamente con el protocolo final de la PCR Multiplex. Se usó el DNA de individuos ya estudiados previamente (con bandas poco nítidas). En concreto se usaron 5 individuos homocigotos susceptibles para la padronización.

Protocolo de la PCR para detección de mutaciones *kdr* y *rdl* según Domingues y col. (2014)

Secuencia de los primers utilizados:

Kdr _Reverse: 138 común 5'CAATATTACGTTTCACCCAG 3'

_Forward: 130 susceptible 5' TACTGTTGTCATCGGCAATC 3'

134 resistente 5' TACTGTTGTCATCGGCAATT 3'

Rdl _Reverse: 438 común 5' TTTATATACCCTCTGGACTG 3'

_Forward: 434 susceptible 5'AGTGGTGACACCTAAAGC 3'

435 resistente 5'AGTGGTGACACCTAAAGA 3'

Reacción final 20 µl

- 2 µl DNA
- 2 µl buffer
- 2,5 mM MgCl
- 0,05 mM Dntp
- 0,2 µl taq polimerasa
- 1 µl primers 130,134,138
- 2 µl primers 434, 435, 438
- 1 µl primers GAPDH control

Condiciones del termociclador:

- 96° C - 2'
- 94° C - 1', 61° C - 1', 72° C - 1' (9 ciclos)
- 92° C - 1'(25 ciclos)
- 72° C - 7'

4.5. Secuenciación

La secuenciación del ADN significa determinar el orden de los cuatro componentes básicos químicos, llamados "bases", que forman la molécula de ADN. La secuencia muestra la clase de información genética que se transporta en un segmento específico de ADN. Además, y de manera muy importante, los datos de las secuencias pueden resaltar los cambios en un gen que pueden causar enfermedades, resistencias, entre otras.

En la doble hélice de ADN, las cuatro bases químicas se unen siempre con la misma pareja para formar "pares de bases". Adenina (A) siempre forma pareja con timina (T); citosina (C) siempre forma pareja con guanina (G). Este emparejamiento es la base para el mecanismo mediante el que las moléculas de ADN se copian cuando las células se dividen, y también es la base para los métodos usados en la mayoría de los experimentos de secuenciación de ADN.

En este trabajo, luego de tener los productos de las PCR Multiplex el siguiente paso fue mandar el material obtenido a MacroGen (Corea). Ésta es una empresa internacional que utiliza la secuenciación a gran escala desarrollada por secuenciadores "AppliedBiosystems 3730XL".

Para esto se seleccionaron individuos con las siguientes características:

- Homocigotos susceptible *kdr*,
- Homocigotos susceptible *rdl*,
- Heterocigotos *kdr*,
- Homocigotos resistente *kdr*.

Se mandaron a secuenciar 16 muestras (10 individuos heterocigotos, 2 homocigotos resistentes y 4 homocigotos susceptibles)

Guía para mandar el material:

Se colocaron 20 µl de los productos de las PCR Multiplex de cada individuo en una placa. Dichos productos fueron identificados y anotados en una planilla de acuerdo al eje alfabético de la A a la H vertical y el eje numérico del 1 al 12 horizontal de la placa. La misma fue enviada a la empresa, conjuntamente con cada primer utilizado (FG 138 y FG 438 primers comunes para las reacciones *kdr* y *rdl*, respectivamente, FG 130 y FG 434 primers susceptibles para la identificación del segmento *kdr* y *rdl* respectivamente, FG 134 primer resistente *kdr*).

Análisis de secuencias:

Para analizar las secuencias se utilizó el programa Bio-edit y del Gen Bank se obtuvieron las secuencias de *H. irritans* para *rdl* (KC346253.1) y para *kdr* (U83874.1), con la cual se alinearon las secuencias obtenidas por la empresa MacroGen.

4.6. Análisis de resultados:

Se realizó una estadística descriptiva y la prueba de Chi cuadrado para un nivel de confianza de alfa 0,05.

5- RESULTADOS:

5.1. Estudio de las poblaciones fenotípicamente

Tabla 2: Valores de FR₅₀ para fipronil y cipermetrina en las poblaciones estudiadas.

Nº Establecimiento	FR ₅₀ fipronil	FR ₅₀ cipermetrina
1	2,75	1,03
2	2,67	10,8
3	2,08	2.6
4	5,26	2,1
5	2,26	4.8
6	2,29	6.2
7	3,54	1.7
8	2,85	5.8
9	2,06	3.4
10	1,03	2.9
11	1,05	2.8

Datos recogidos de Buscio (2013).

5.2. Ajuste de la PCR Multiplex

Lo primero que se testó fue la temperatura de los primers. Se usó un termociclador Mastercycler NEXUS- Eppendorf Tanirel en gradiente cuya temperatura fue de 57°C, 58°C, 59°C, 60°C, 61°C, 62°C, 63°C (Figura 8) para incluir la temperatura de 61 °C sugerida por Domingues y col. (2014). Simultáneamente, durante el gradiente, también se testó la concentración de DNA, de los primers, dNTP, enzima taq polimerasa y magnesio. En las Figuras 9 y 10 se muestran los resultados de estos ensayos preliminares.

Luego en las Figuras 11 y 12 se toma como temperatura de anidamiento 58,5 °C, para testear otros componentes de la PCR.

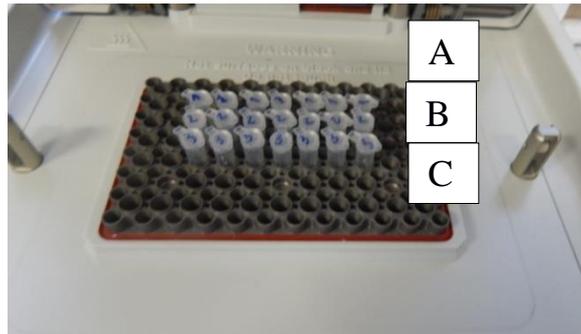


Figura 8: Muestras en termociclador con gradiente de temperatura para ensayo de anidamiento para *kdr* y *rdl*.

Referencias de la figura:

A: Primer *kdr* 2,5 μ l, primer *rdl* 2,5 μ l, DNA 2,25 μ l

B: Primer *kdr* 2,5 μ l, primer *rdl* 2,5 μ l, DNA 1,5 μ l

C: Primer *kdr* 2,5 μ l, primer *rdl* 3 μ l, DNA 2,25 μ l

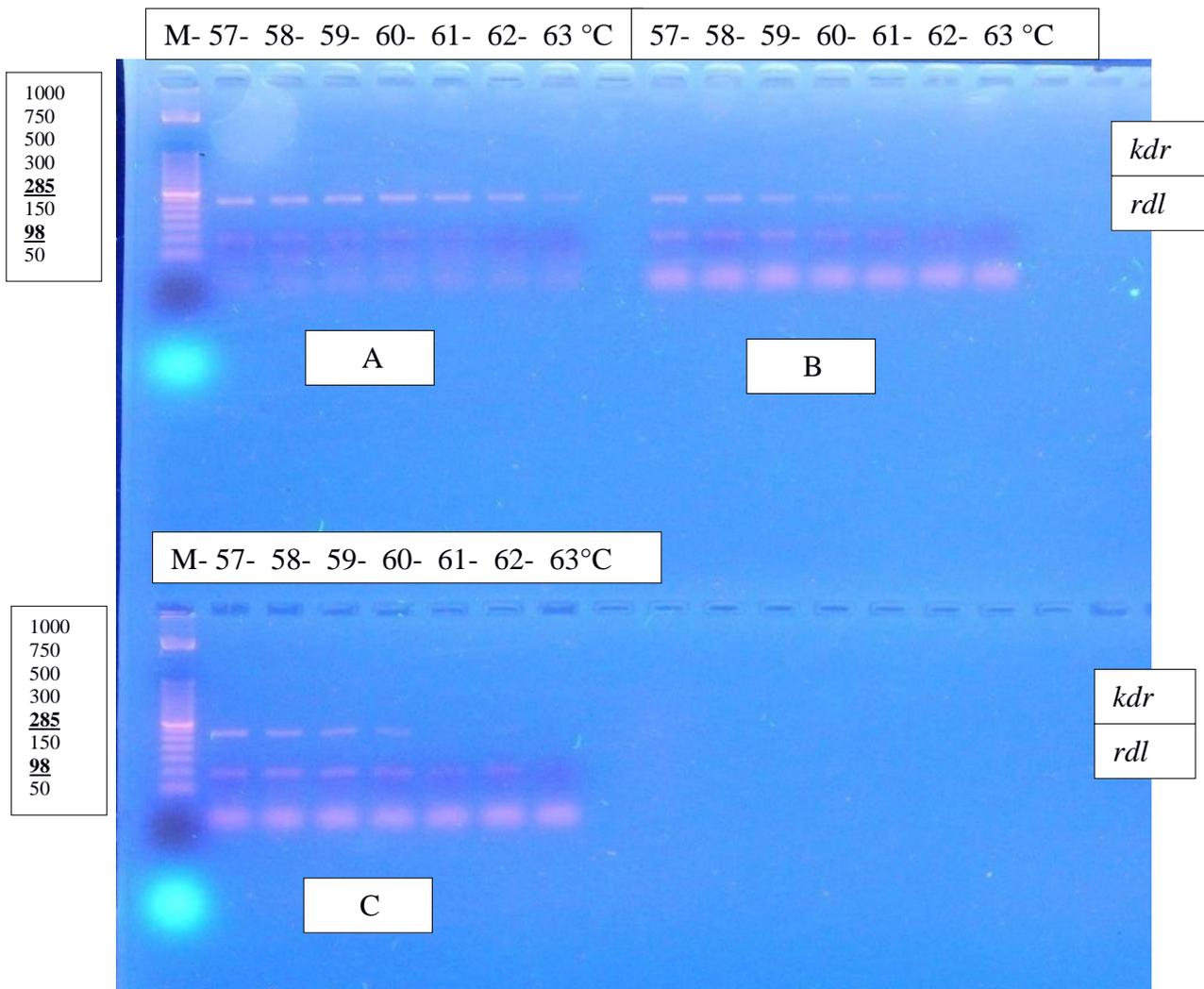


Figura 9: Electroforesis de los productos de PCR del mismo individuo en un gradiente de temperatura (57 a 63 °C), con diferentes concentraciones de primer y DNA.

Referencias de la figura:

A: Primer *kdr* 2,5 μ l, primer *rdl* 2,5 μ l, DNA 2,25 μ l

B: Primer *kdr* 2,5 μ l, primer *rdl* 2,5 μ l, DNA 1,5 μ l

C: Primer *kdr* 2,5 μ l, primer *rdl* 3 μ l, DNA 2,25 μ l

En el primer pocillo se encuentra un marcador cuyo rango va de 50 pb a 1000 pb. El amplicón de *kdr* es de 285 pb y el de *rdl* de 98 pb. Se utilizó DNA del mismo individuo para las tres condiciones, y sólo en reacción susceptible. Por debajo de estos dos amplicones se visualizan restos de primers.

Conclusión: Cuando se utiliza 2,25 μ l de DNA, 2,5 μ l de primer *kdr* y 3 μ l de primer *rdl* se obtiene un mejor amplicón, ósea más visible. Por lo que es recomendable usar estas cantidades. Donde se visualizan mejor los amplicones es en los pocillos 57° C y 58° C por esto se eligió en este PCR 57,5 °C como temperatura de anidamiento, los micro tubos se colocaron en los pocillos grandes del termociclador y no en los pequeños como en el siguiente gradiente.

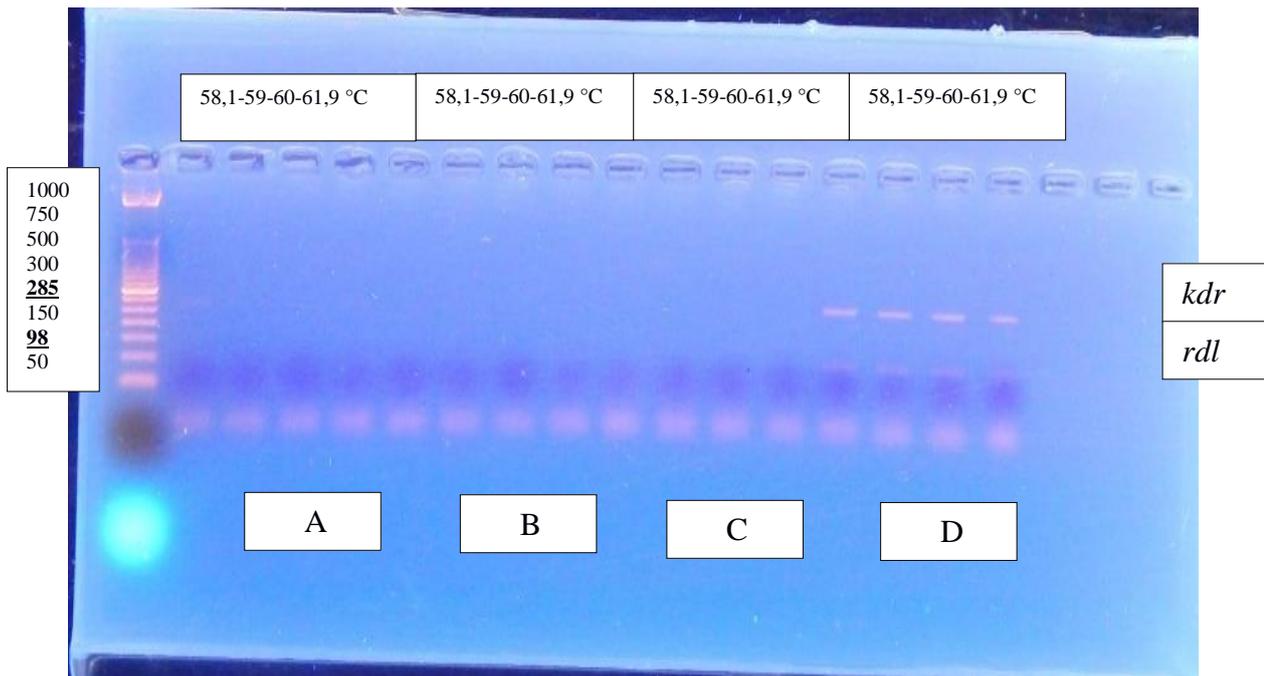


Figura 10: Electroforesis de los productos de PCR del mismo individuo en un gradiente de temperatura (58,1 a 61,9 °C), con diferentes concentraciones de dNTP, primer y DNA.

Referencias de la figura:

A: dNTP 0,2 mM, primer *rdl* 3 μ l, primer *kdr* 2,5 μ l, DNA 1 μ l

B: dNTP 0,05 mM, primer *rdl* 3 μ l, primer *kdr* 2,5 μ l DNA 1 μ l

C: dNTP 0,05 mM, primer *rdl* 5 μ l, primer *kdr* 2,5 μ l, DNA 2,5 μ l

D: dNTP 0,2 mM, primer *rdl* 5 μ l, primer *kdr* 2,5 μ l, DNA 2,5 μ l

En el primer pocillo se encuentra un marcador cuyo rango va de 50 pb a 1000 pb. El amplicón de *kdr* se encuentra en 285 pb y el de *rdl* se encuentra en 98 pb. Se utilizó DNA del mismo individuo para las cuatro condiciones, y sólo en reacción susceptible, por debajo de estos dos amplicones se visualizan restos de primers.

CONCLUSIÓN: La amplificación de amplicones se observa sólo en los pocillos que tuvieron más DNA, más primer, y más dNTP. La concentración de primer fue mayor para *rdl* 5 µl y para *kdr* 2,5 µl.

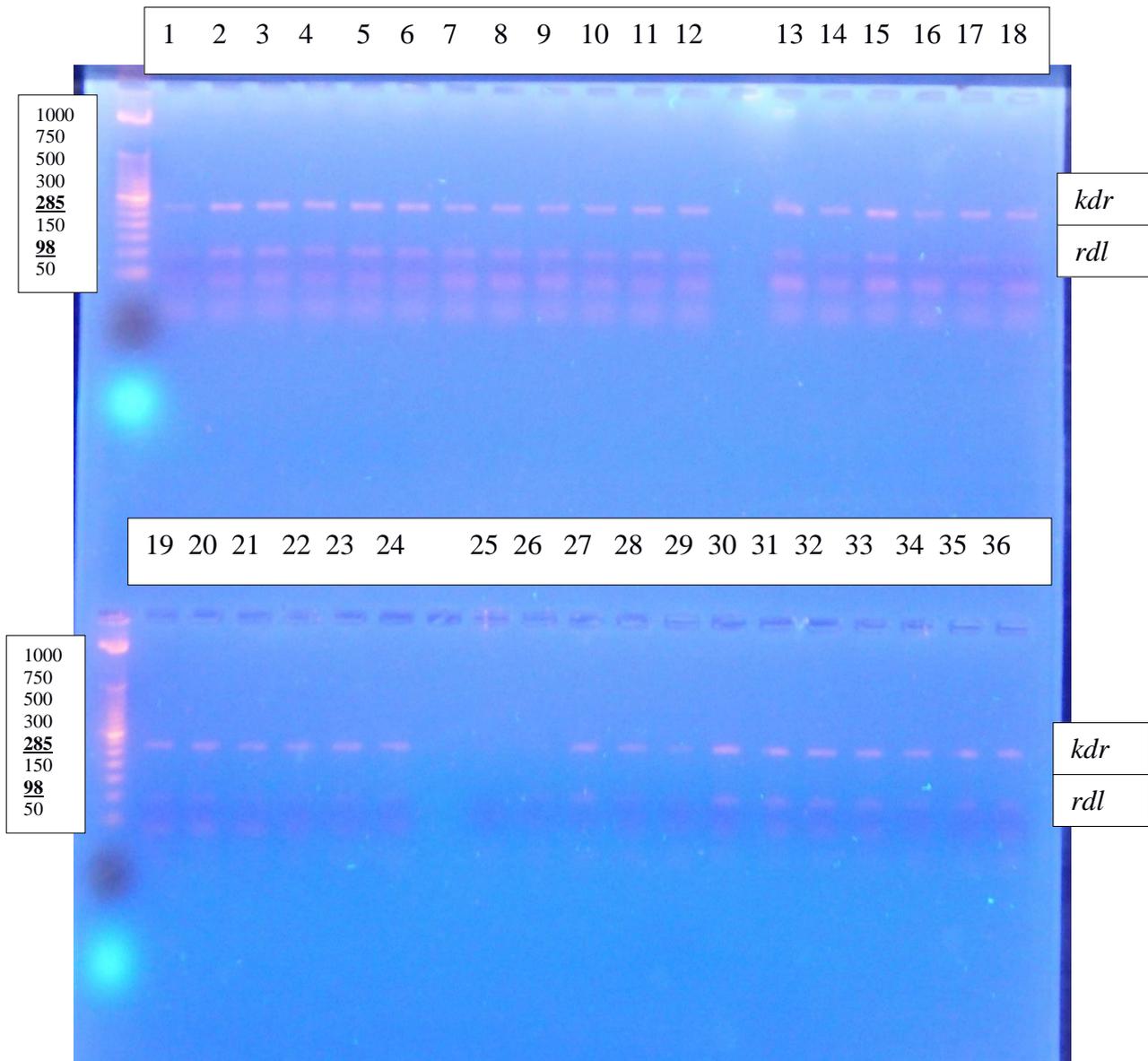


Figura 11: Electroforesis de los productos de PCR de 3 individuos, con una temperatura de anidamiento 58,5 °C, con diferentes concentraciones de Magnesio y enzima taq polimerasa.

Referencias de la figura:

Pocillo 1 a 9: MgCl 1,25 µl, taq 0,25 µl

Pocillo 10 a 18: MgCl 1,5 µl, taq 0,3 µl

Pocillo 19 a 28: MgCl 1,5 µl, taq 0,25 µl

Pocillo 29 a 36: MgCl 1,25 µl, taq 0,3 µl

En el primer pocillo se encuentra un marcador cuyo rango va de 50 pb a 1000 pb. El amplicón de *kdr* se encuentra en 285 pb y el de *rdl* se encuentra en 98 pb. Se utilizó DNA de 3 individuos para las cuatro condiciones, y sólo en reacción susceptible, por debajo de estos dos amplicones lo que se visualiza son restos de primers.

DNA: Pocillo 1 a 12: INDIVIDUO 1 (su DNA fue extraído con kit de extracción BIOMETRA Analytikjenay; la calidad es muy buena cuando nos fijamos en el gel de agarosa al 0,8 % que se le realiza a cada individuo luego de hacer la extracción).

Pocillo 13 a 25: INDIVIDUO 2 (su DNA fue extraído con el protocolo de extracción de fenol cloroformo; calidad es buena, pero algo inferior al anterior cuando nos fijamos en el gel de agarosa al 0,8 %).

Pocillo 26 a 36: INDIVIDUO 3 (su DNA fue extraído con kit de extracción BIOMETRA Analytikjena; la calidad es buena pero no tanto como el INDIVIDUO 1 habiendo tenido la misma técnica de extracción)

Para todos los productos de esta PCR:

DNA 2,5 µl

Primer *rdl* 5 µl

Primer *kdr* 2,5 µl

CONCLUSIÓN: La mejor opción donde los amplicones se vieron más nítidos fue del pocillo 1 al 9 por ende se siguió adelante con estas cantidades mencionadas. En cuanto a la forma de extracción del DNA, es muy variable la calidad del DNA cuando comparamos geles de calidad en poblaciones extraídas con kit BIOMETRA Analytikjena contra poblaciones extraídas con fenol cloroformo, por esto seguimos adelante con la extracción de fenol cloroformo (material con el que se contaba).

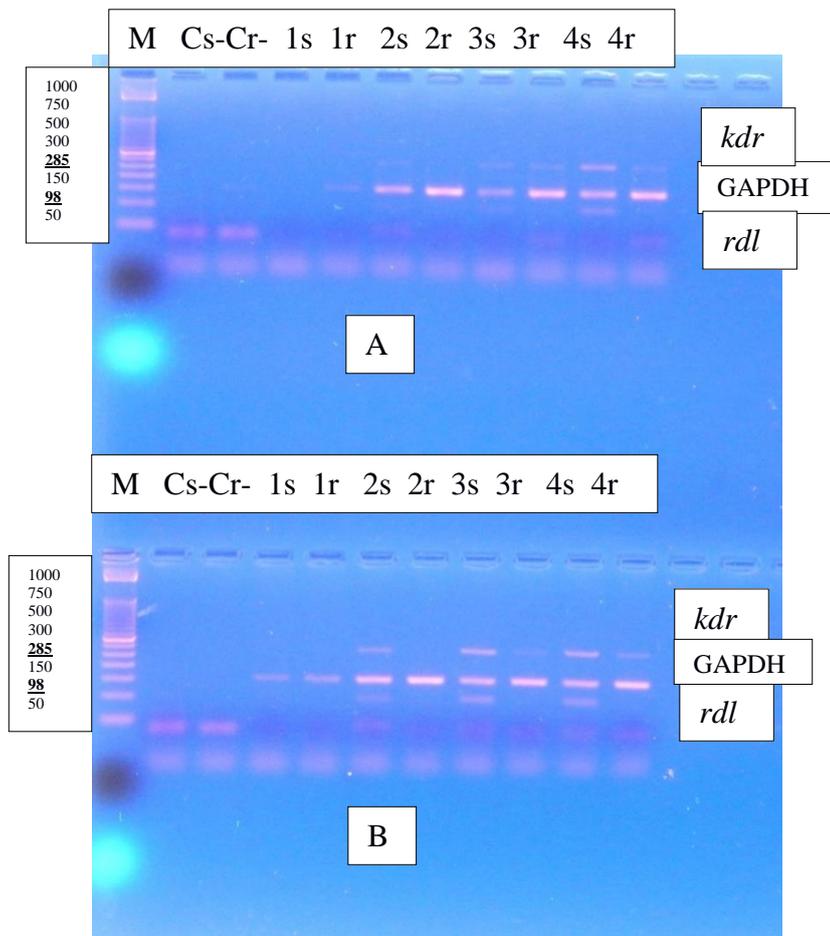


Figura 12: Electroforesis de los productos de PCR de 4 individuos en una temperatura de anidamiento 58,5°C, con diferentes concentraciones de primer *kdr* y *rdl*. *Cs = control susceptible, Cr = control resistente

Referencias de la figura:

A: Primer *kdr* 1,5 µl, primer *rdl* 3,5 µl.

B: Primer *kdr* 2,5 µl, primer *rdl* 5 µl.

En el primer pocillo se encuentra un marcador cuyo rango va de 50pb a 1000pb. El amplicón de *kdr* se encuentra en 285 pb y el de *rdl* se encuentra en 98 pb; se probó colocar un control de reacción (amplicón en 178 pb) para comprobar la reacción y ver también si nos disminuía la nitidez de los otros dos amplicones buscados (*kdr*, *rdl*). Se utilizó DNA de 4 individuos para las dos condiciones, por debajo de estos dos amplicones lo que se visualiza son restos de primers y DNA.

CONCLUSIÓN: Con más primer se obtuvieron mejores amplicones por ende se optó por dejar como estándar el primer *kdr* 2,5 ul y el primer *rdl* 5ul.

El protocolo final que se usó para la determinación de la frecuencia de mutaciones fue el siguiente:

Protocolo Final de la PCR Multiplex para detección de mutaciones *kdr* y *rdl* para *Haematobia irritans*:

1 Reacción: 25 µl total

- H₂O: 3 µl
- Buffer: 2,5 µl
- MgCl 2,5 mM: 1,25 µl
- dNTP 0,2 mM: 0,5 µl
- Taq polimerasa: 0,25 µl
- Primers comunes para ambas reacciones (van en el mix): 438 (5 µl) y 138 (2,5 µl)
- Primers mix susceptible: 434 (5 µl) y 130 (2,5 µl)
- Primers mix resistente: 435 (5 µl) y 134 (2,5 µl)
- DNA: 2,5 µl

Condiciones del termociclador:

- 96 °C - 2´
- 94 °C - 1´; 58,5 °C – 1´; 72 °C - 1´ (12 ciclos)
- 92 °C – 1´; 58,5 °C – 1´; 72 °C - 1´ (28 ciclos)
- 72 °C - 7´
- 4 °C end

5.3. Poblaciones estudiadas

Luego de realizar todas las variables anteriores y llegar a los amplicones nítidos de *rdl* y *kdr*, se analizó el DNA de 30 individuos de 11 poblaciones. Los individuos de las poblaciones N°1, N°2, N°3, N°4, N°5, N°6, N°7, N°8, N°9 fueron estudiados para la determinación de alelos resistentes o susceptibles para *kdr* y *rdl* usando PCR Multiplex. Las poblaciones N°10 y N°11 fueron usadas para estudiar la reacción *rdl* usando PCR simple y no se pudo estudiar la de *kdr* debido a falta de reactivos y tiempo.

En las Figuras 13, 14, 15 y 16 se presentan las electroforesis de los productos de PCR de los individuos homocigotos susceptibles y resistentes a *kdr* y heterocigotas a *kdr*, y homocigotos susceptibles a *rdl* de las poblaciones 1, 2, 3, 4 respectivamente en geles de agarosa al 2 %, bromuro de etideo 1 µl cada 25 ml. Condiciones de corrida 50 minutos a 87 volts.

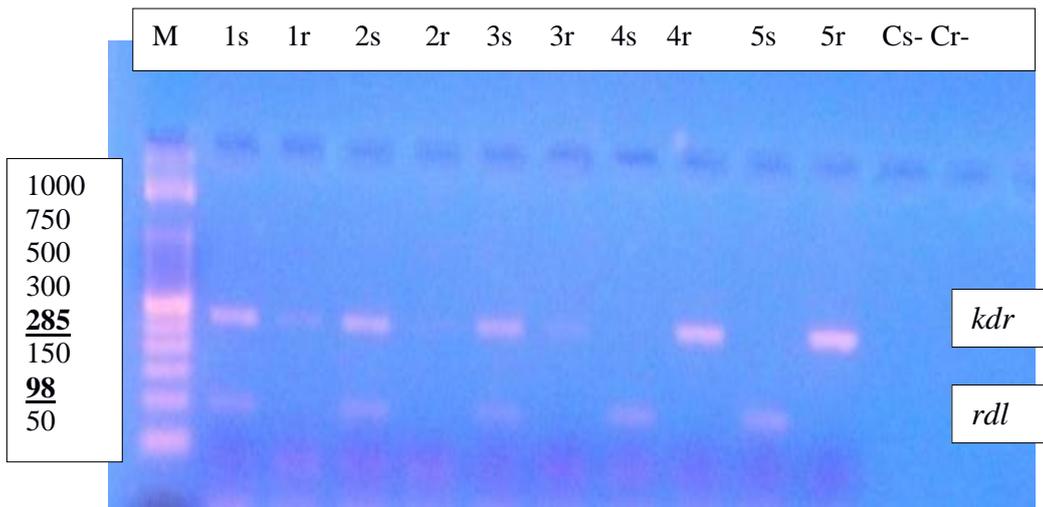


Figura 13: Electroforesis de individuos de la población 1.*M= marcador, Cs = control susceptible, Cr = control resistente.1: *kdr* heterocigoto, *rdl* homocigoto susceptible, 2: *kdr* y *rdl* homocigotos susceptibles, 3: *kdr* y *rdl* homocigotos susceptibles, 4: *kdr* homocigoto resistente, *rdl* homocigoto susceptible, 5: *kdr* homocigoto resistente, *rdl* homocigoto susceptible

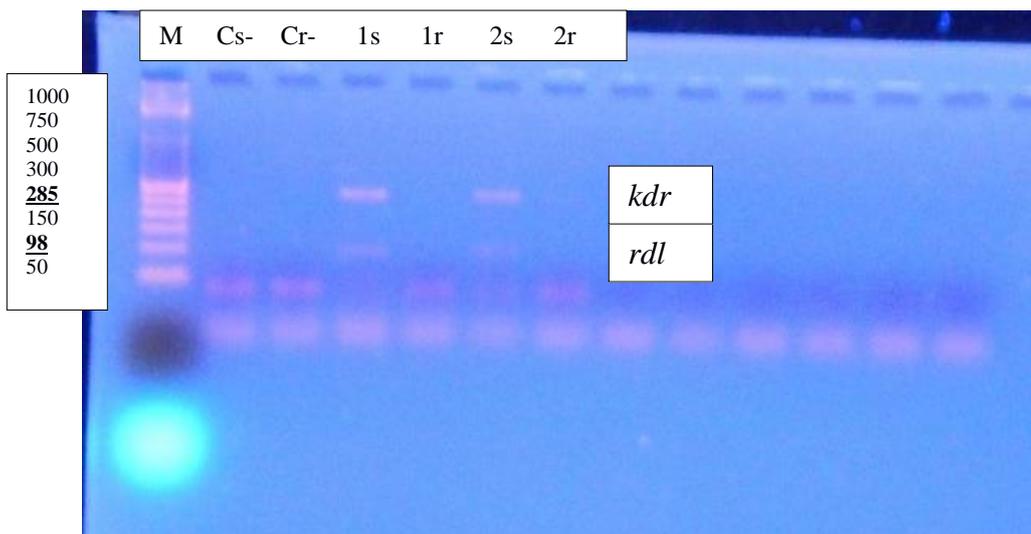


Figura 14: Electroforesis de individuos de la población 2.*M= marcador, Cs = control susceptible, Cr = control resistente. 1: *kdr* y *rdl* homocigotos susceptibles, 2: *kdr* y *rdl* homocigotos susceptibles

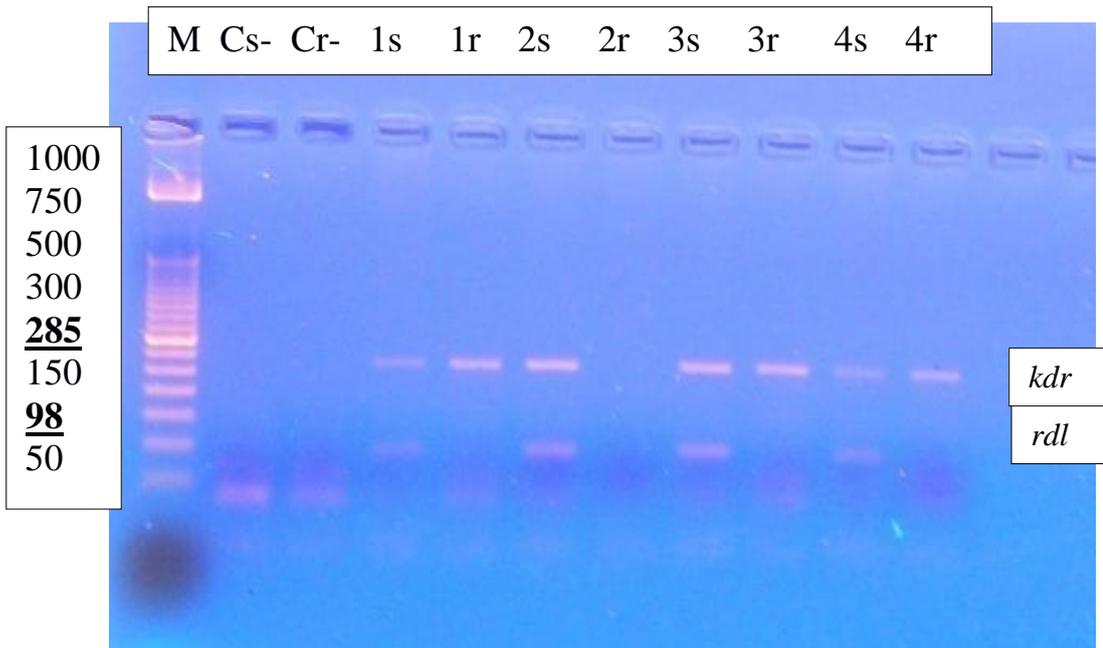


Figura 15: Electroforesis de individuos de la población 3.*M= marcador, Cs = control susceptible, Cr = control resistente.1: *kdr* heterocigoto, *rdl* homocigoto susceptible, 2: *kdr* y *rdl* homocigotos susceptibles, 3: *kdr* heterocigoto, *rdl* homocigoto susceptible, 4: *kdr* heterocigoto, *rdl* homocigoto susceptible

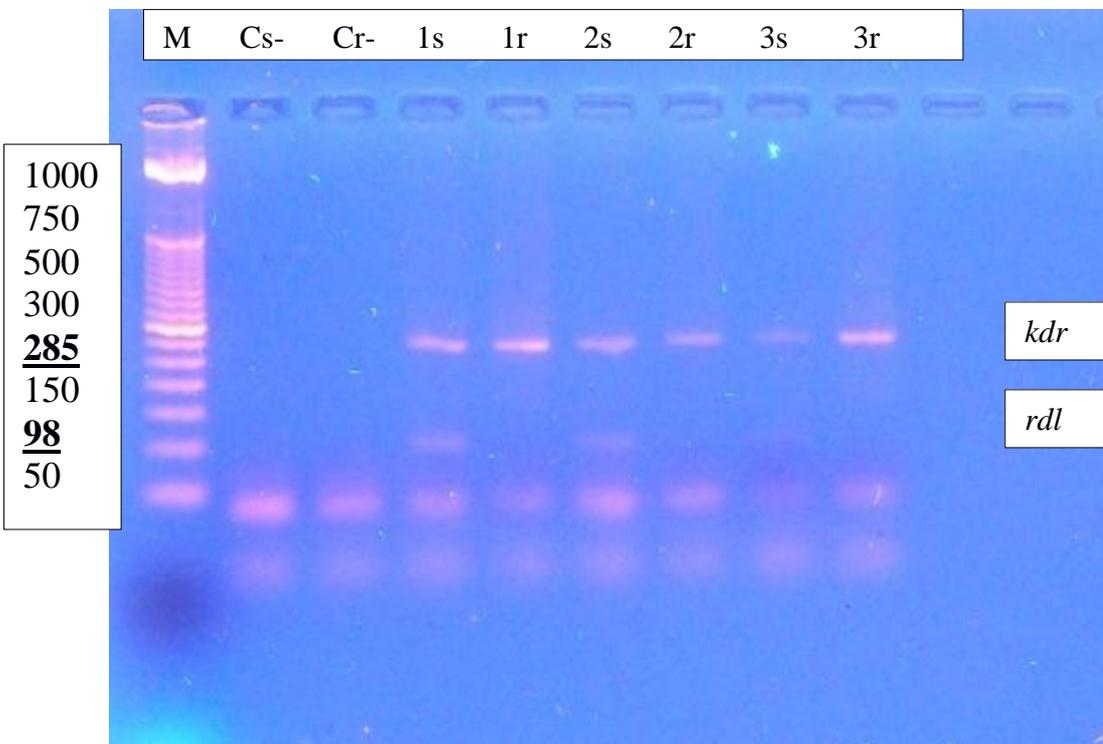


Figura 16: Electroforesis de individuos de la población 4.*M= marcador, Cs = control susceptible, Cr = control resistente.1: *kdr* heterocigoto y *rdl* homocigoto susceptible, 2: *kdr* heterocigoto y *rdl* homocigoto susceptible, 3: *kdr* heterocigoto y *rdl* homocigoto susceptible

De los 60 individuos analizados con la técnica PCR simple para *rdl* ninguno presentó la mutación buscada. De los 270 individuos analizados con la técnica PCR Multiplex, ninguno presentó la mutación *rdl*, y 104 presentaron la mutación *kdr*.

Todas las poblaciones analizadas con la técnica PCR Multiplex (de la N° 1 a la N° 9) presentaron individuos con la mutación tipo *kdr* y el porcentaje de individuos con esta mutación en las poblaciones fue alto, variando de 13 a 67 % (Tabla 3, Figura 17), confirmando el diagnóstico de resistencia fenotípica a cipermetrina.

En promedio, 12 individuos de cada 30, de cada población presentaron esta mutación. A su vez como media, 7 de estos 12 individuos con mutación son machos y 5 son hembras

Tabla 3: Frecuencia de mutaciones *rdl* y tipo *kdr* en poblaciones de *Haematobia irritans* (Uruguay).

Poblaciones	Frecuencia de Mutaciones						Porcentaje de individuos con mutación tipo <i>kdr</i> (%)	
	<i>rdl</i>			<i>kdr</i>			Susceptibles	Resistentes
	SS	SR	RR	SS	SR	RR		
1	30	0	0	25	3	2	83	17
2	30	0	0	10	20	0	33	67
3	30	0	0	19	11	0	63	37
4	30	0	0	21	9	0	70	30
5	30	0	0	16	14	0	53	47
6	30	0	0	13	17	0	43	56
7	30	0	0	26	4	0	87	13
8	30	0	0	12	18	0	40	60
9	30	0	0	24	6	0	80	20
10	30	0	0	Nr*	Nr*	Nr*	-	-
11	30	0	0	Nr*	Nr*	Nr*	-	-

*Nr (no realizado).

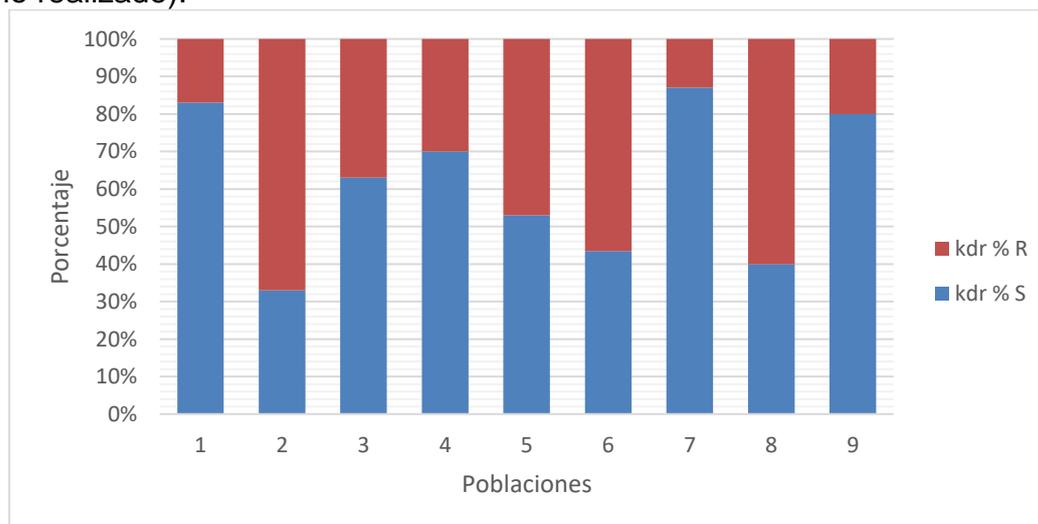


Figura 17: Frecuencia alélica de los alelos *kdr* susceptible y resistente en las poblaciones de *Haematobia irritans*.

Tabla 4: Relación del sexo de *Haematobia irritans* con la resistencia.

Población	Sexo	Total	SS	SR	RR	% Individuos Resistentes
1	Hembras	15	12	3	0	20
	Machos	15	13	0	2	13
	Total	30	25	3	2	17
2	Hembras	15	6	9	0	60
	Machos	15	4	11	0	73
	Total	30	10	20	0	67
3	Hembras	15	9	6	0	40
	Machos	15	10	5	0	33
	Total	30	19	11	0	37
4	Hembras	15	14	1	0	6
	Machos	15	7	8	0	54
	Total	30	21	9	0	30
5	Hembras	15	7	8	0	54
	Machos	15	9	6	0	40
	Total	30	16	14	0	47
6	Hembras	15	8	7	0	46
	Machos	15	5	10	0	66
	Total	30	13	17	0	56
7	Hembras	15	12	3	0	20
	Machos	15	14	1	0	6
	Total	30	26	4	0	13
8	Hembras	15	9	6	0	40
	Machos	15	3	12	0	80
	Total	30	12	18	0	60
9	Hembras	15	13	2	0	13
	Machos	15	11	4	0	26
	Total	30	24	6	0	20

En 5 de las 9 poblaciones (N°2, N°4, N°6, N°8 y N°9) hubo más porcentaje de machos que de hembras resistentes (Tabla 4, Figura 18), a pesar de esto no hubo diferencias significativas en relación al sexo con la resistencia, $p=0,07$

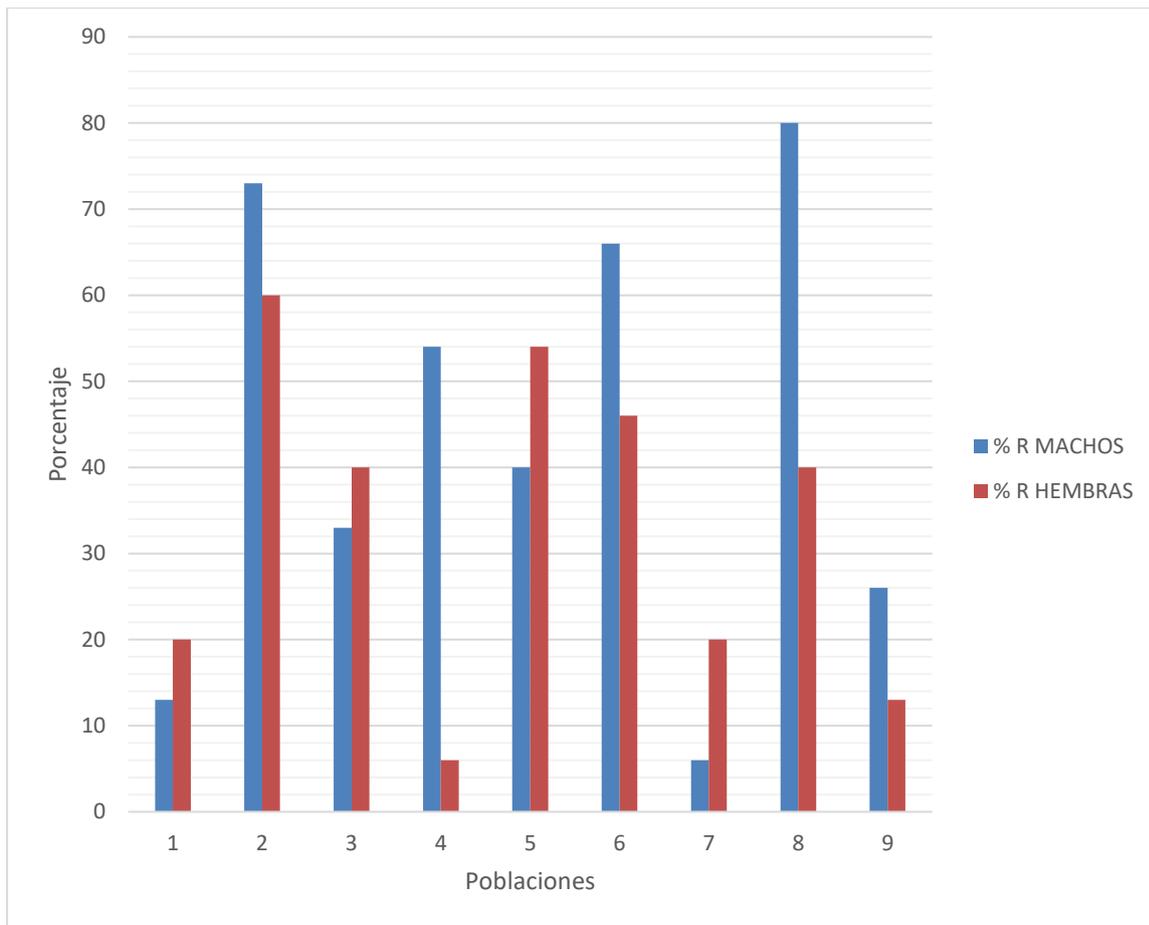


Figura 18: Porcentaje de machos y hembras de *Haematobia irritans* resistentes a cipermetrina.

5.4. Secuenciación y alineación

Se mandaron a secuenciar 16 muestras (10 individuos heterocigotos resistentes, 2 homocigotos resistentes y 4 homocigotos susceptibles)

En la Figura 19 se muestra el alineamiento para *rdl* y en la Figura 20 para *kdr*.

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
                10         20         30
HAEMATOBIA AGTGGTGACA CCTAAAGCTA CACGGGCTGG TGTAGCAT
1_FG434     -GTGGTGACA CCTAAAGCTA CACGGGCTGG TGTAGCAT
14_FG_434   AGTGGTGACA CCTAAAGCTA CACGGGCTGG TGTAGCAT
15_FG_434   AGTGGTGACA CCTAAAGCTA CACGGGCTGG TGTAGCAT
```

Figura 19: Secuencias del alelo *rdl* en forward y alineadas con la secuencia de *Haematobia irritans* KC346253.1, sin mutación presente (AGTGGTGACACCTAAAGC)

```
.....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....| .....|.....
                10         20         30         40
HAEMATOBIA TTACTGTTGT CATCGGCAAT CTTGTGGTAA GTATCTTAGA AAAAAATAA
2_FG134     TTACTGTTGT CATCGGCAAT TTTGTGGTAA GTATCTTAGA AAAAAATAA
3_FG134     TTACTGTTGT CATCGGCAAT TTTGTGGTAA GTATCTTAGA AAAAAATAA
6_FG134     TTACTGTTGT CATCGGCAAT TTTGTGGTAA GTATCTTAGA AAAAAATAA
9_FG130     TTACTGTTGT CATCGGCAAT CTTGTGGTAA GTATCTTAGA AAAAAATAA
```

Figura 20: Secuencias del alelo *kdr* en forward y alineadas con la secuencia de *Haematobia irritans* U83874.1, con la mutación presente (TACTGTTGTCATCGGCAATT) y sin mutación presente (TACTGTTGTCATCGGCAATC)

Las mutaciones son cambios en la información hereditaria y como muestra la Figura 20hubo un cambio de bases (C por T). Para buscar la mutación presente en las secuencias se buscó dentro de éstas la secuencia del primer *kdr* utilizado (TACTGTTGTCATCGGCAATT de 285 pb.)

6- DISCUSIÓN:

La presencia de un alto porcentaje de individuos heterocigotos en poblaciones resistentes a cipermetrina está en concordancia con los resultados de los bioensayos fenotípicos realizados para este principio activo que tenían factores de resistencia mayores a 2 (establecimiento N° 2, N° 3, N° 4, N° 5, N° 6, N° 8, N° 9). Sin embargo, poblaciones con factores de resistencia de 1,03 y 1,7 que se comportaron susceptibles fenotípicamente a la cipermetrina, presentan individuos con alelos resistentes lo cual puede estar relacionado a una etapa incipiente de aparición de resistencia. Como consecuencia si se siguen exponiendo estas poblaciones a los piretroides, los heterocigotos van a seguir siendo seleccionados y van a aumentar los porcentajes de resistencia genotípica (Guglielmone y col. 2002).

La resistencia genotípica varió entre 13 y 67%. Los porcentajes de resistencia encontrados en el presente trabajo fueron más elevados que los encontrados por Cuore, U.; Solari, M.A, (2013) que variaron entre 3,8 y 25% esto confirma la dispersión de la resistencia y su consolidación en el país.

La homocigosis fue muy baja y sólo se observó en una población. Esto difiere de estudios realizados en la región por Guglielmone y col. (2002) donde detectaron moscas heterocigotas y homocigotas resistentes en todas las muestras de moscas sometidas al diagnóstico por PCR.

En el presente trabajo, al igual que en la mayoría de los trabajos publicados de resistencia a los piretroides en la mosca de los cuernos se confirma la importancia de la insensibilidad del sitio de acción como mecanismo principal de resistencia. El mecanismo *kdr* prevalece en varias partes de los Estados Unidos (Jamroz y col. 1998, Foil y col. 2010), México (Li y col. 2003) y Argentina (Guglielmone y col. 2002). Sin embargo, en Brasil (Guerrero y Barros, 2006) detectaron altos niveles de resistencia fenotípica a la cipermetrina, sin niveles apreciables de mutaciones *kdr*, sugiriendo que otros mecanismos están presentes. Esto puede estar ocurriendo, simultáneamente, en algunas de nuestras poblaciones

Con respecto a los resultados referentes a la resistencia asociada al sexo no se observaron diferencias significativas lo que concuerda con Castelli y col. (2010). La resistencia a cipermetrina no estaría asociada al sexo.

La resistencia cruzada entre los insecticidas fipronil y dieldrin está bien documentada en cepas resistentes de cucarachas alemanas y moscas domésticas (Scott, J. y Wen, Z. 1997) y la utilidad de otros miembros de este grupo de insecticidas para controlar la población de moscas de los cuernos en el sitio de estudio es dudosa. Por dicha razón nosotros asumimos que puede haber resistencia cruzada entre fipronil y endosulfan, dos grupos químicos diferentes pero que actúan en el mismo sitio de acción; resultando que la mutación descrita por Domingues y col. (2013) a endosulfan podría estar presente en nuestras poblaciones para fipronil.

El hecho de no encontrar la mutación *rdI*, puede ser tal vez porque esté en muy baja frecuencia y la cantidad de individuos estudiados no fue suficiente, ya que la resistencia a fipronil es incipiente (Buscio, 2013) o pueda estar en otro sector del GABA. La mutación descrita en los Estados Unidos de América para endosulfan

(Dominguez y col., 2014), quizás no es la misma que se pueda llegar a encontrar aquí en Uruguay. Ya se ha visto que para garrapata (*Rhipicephalus microplus*), la localización de la mutación *rdl* es diferente para poblaciones de Australia y de Uruguay (Castro-Janer y col., 2018, en revisión). También puede deberse a mecanismos metabólicos como describen Guerrero y Barros en Brasil (2006). Es por dicha razón que convendría secuenciar otro segmento del GABA para poder dilucidar este aspecto.

7- CONCLUSIONES:

La mutación *kdr* está presente en todas las poblaciones resistentes fenotípicamente a cipermetrina

El proceso de selección insecticida para PS se encuentra en la etapa de meseta.

La mutación *rdl* descrita para endosulfan no estaría presente en individuos resistentes a fipronil, o estaría en muy baja frecuencia.

La PCR Multiplex es útil para detectar las mutaciones específicas pudiendo ser utilizada para establecer estrategias de control o de monitoreo.

Se sugiere seguir estudiando la región *rdl* con individuos sobrevivientes a fipronil, para identificar la mutación

Las poblaciones con mayor FR_{50} demostraron mayor porcentaje de individuos heterocigotos.

Las modificaciones de susceptibilidad / resistencia en las poblaciones sería independiente del sexo.

8- BIBLIOGRAFÍA:

- 1- Barros, A.T.; Guglielmone, A.A, Martins, J.R. (2002)<<Mosca de los cuernos>> (*Haematobia irritans*): Control Sustentable y Resistencia a los Insecticidas. Disponible en: www.corpoica.org.co/SitioWeb/Archivos/Publicaciones/Moscuernredectopar.pdf. Fecha de consulta: 5 de marzo de 2018.
- 2- Bianchin, I.; Koller, W.W.; Detmann, E. (2006) Sazonalidade de *Haematobia irritans* no Brasil Central. Pesquisa Veterinaria Brasileira, 26: 79-86.
- 3- Buscio, D. (2013) Adecuación de un bioensayo con fipronil para el diagnóstico de resistencia de *Haematobia irritans* (mosca de los cuernos). Cidec
- 4- Butler, J.F.; (1992) External Parasite control-En: Van Horn HH, Wilcox CJ, DeLorenzo MA, Large Dairy Herd management Wisconsin, American Dairy Science Association, p. 568-583.
- 5- 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). Int. J. Parasitol. 29 :125-135.
- 6- Carballo, M.; Martinez, M. (1991) Hallazgo de *Haematobia irritans* en Uruguay. Vet. (Uruguay) 27:20-21.
- 7- Castelli.; Mirta, E.; Mangold, A.J.M.; Bertello, C.; Faletti, C.M.; Guglielmone.; Alberto, A. (2010) Estudio de la relación entre el sexo de la *Haematobia irritans* [Diptera: Muscidae] y la susceptibilidad - resistencia a la Cipermetrina. Universidad Nacional del Litoral. Facultad de Ciencias Veterinarias. UNL. AR; 9:17-25.
- 8- Castro Janer, 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. Vet. Parasitol. 151: 286 – 299.
- 9- Castro Janer, E.; Díaz, A.; Buscio, D.; De Oliveira-Madeira, L.; Piaggio, J.; Barros, A.T.M. (2014) Resistência de *Haematobia irritans* à cipermetrina e diazinon no Uruguai. XVIII Congresso Brasileiro de Parasitologia Veterinária. 21-24 outubro de 2014. Gramado, RS, Brasil.
- 10- Cuore, U. ; Solari, M.A. (2013) Dípteros en estado adulto : epidemiología y control de *Haematobia irritans*.
- 11- Domingues, L.N.; Guerrero, F.D.; Becker, M.E.; Alison, M.W.; Foil, L.D. (2013) Discovery of the *Rdl* mutation in association with a cyclodiene resistant population of horn flies, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). Veterinary Parasitology. 198: 172-179.
- 12- 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.
- 13-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. Fecha de consulta: 15/5/2016.
- 14-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.
- 15-Garrod, W.T.; Zimmer, C.T.; Gutbrod, O.; Lüke, B.; Williamson, M.S.; Bass, C.; Nauen, R.; Emyr Davies, T.G. (2017) Influence of the RDL A301S mutation in the brownhoppers lugens *Nilaparvata* in the activity of phenylpyrazole insecticides *PesticBiochemPhysiol*. 142: 1-8.
- 16-Guerrero, F.D.; Jamroz, R.C.; Kammlah, D.; Kunz, S.E. (1997) Toxicological and molecular characterization of pyrethroid-resistant horn flies, *Haematobia irritans*: identification of *kdr* and super-*kdr* point mutations. *Insect Biochem Mol Biol* 27 (8-9): 745 – 755
- 17-Guerrero, F.D.; Barros A.T.M (2006) Role of *kdr* and Esterase-Mediated Metabolism in Pyrethroid-Resistant Populations of *Haematobia irritans irritans* (Diptera: Muscidae) in Brazil. *Journal of Economic Entomology* 43 (5): 896–901
- 18-Guglielmone, A.A.; Castelli, M.E.; Volpogni, M.M.; Medus, P.D.; Martins, J.R.; Suarez, V.H.; Anziani, O.S.; Mangold, A.J. (2001) Toxicity of cypermethrin and diazinon to *Haematobia irritans* (Diptera:muscidae) in its American Southern range. *Veterinary Parasitology*101: 67 - 73.
- 19-Guglielmone, A.A.; Castelli, M.E.; Volpogni, M.M; Anziani, O. S.; Mangold, A. J. (2002) Dynamics of cypermethrin resistance in the field in the horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera:muscidae). *Veterinary Entomology* 11: 1365-2915.
- 20-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.
- 21-Jamroz, R.C.; Guerrero, F.D.; Kammlah, D.M.; Kunz, S.E. (1998) Role of the *kdr* and super-*kdr* sodium channel mutations in pyrethoid resistance: correlation of allelic frequency to resistance level in wild and laboratory populations of horn flies (*Haematobia irritans*) *Insect and Biochemistry and molecular biology* 28 : 1031 - 1037.
- 22-Li, A.Y.; Guerrero, F.D.; Almazan Garcia, C.; George, J.E. (2003) Survey of resistance to permethrin and diazinon and the use of a Multiplex polymerase

chain reaction assay to detect resistance alleles in the Horn Fly, *Haematobia irritans irritans* (L) J. of Medic Entomol 40 (6): 942 - 949.

- 23-Marques, L.; Moon, R.; Cardozo, H.; Cuore, U.; Trelles, A. y Bordaberry, S. (1997) Primer diagnóstico de resistencia de *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) en Uruguay. Determinación de susceptibilidad a la cipermetrina y al diazinon. Veterinaria (Montevideo) 33 (133):20-23.
- 24-Scott, G.J.; Wen, Z. (1997) Toxicity of Fipronil to Susceptible and Resistant Strains of German Cockroaches (Dictyoptera: Blattellidae) and House Flies (Diptera: Muscidae), in *Journal of Economic Entomology* 90: 1152–1156
- 25-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
- 26-Zhang, Y .; Meng, X.; Yang, Y.; Li, H.; Wang, X.; Yang, B.; Zhang, J.; Li, C.; Millar, N.S.; Liu, Z. (2016) Synergistic and compensatory effects of two mutations points conferring in situ resistance to fipronil in the insect GABA receptor RDL .Sci Rep. 6: 32335. doi: 10.1038 / srep32335.