

Universidad Autónoma de Sinaloa
Colegio de Ciencias Agropecuarias
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia
Maestría en Ciencias Agropecuarias



TESIS:

**IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE
Haematobia spp. QUE AFECTA A BOVINOS DE
CULIACÁN, SINALOA**

**Que para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Agropecuarias**

PRESENTA

MVZ JOSÉ DE JESÚS CAMPOS SÁNCHEZ

DIRECTORA DE TESIS

DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CO-DIRECTORA DE TESIS

DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

ASESORES

DRA. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

DR. MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ GAXIOLA

MC. JULIÁN RÍOS SICAIROS

CULIACÁN, SINALOA, JULIO DE 2020

ESTA TESIS FUE REALIZADA POR **JOSÉ DE JESÚS CAMPOS SÁNCHEZ**,
BAJO LA DIRECCIÓN DEL CONSEJO PARTICULAR QUE SE INDICA, Y HA
SIDO APROBADA POR EL MISMO, COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTORA



DRA. IDALIA ENRÍQUEZ VERDUGO

CO-DIRECTORA



DRA. SOILA MARIBEL GAXIOLA CAMACHO

ASESORA



DRA. NOHEMÍ CASTRO DEL CAMPO

ASESOR



DR. MIGUEL ÁNGEL RODRÍGUEZ GAXIOLA

ASESOR



MC. JULIÁN RÍOS SICAIROS

CULIACÁN, SINALOA, JULIO DE 2020



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE SINALOA
COLEGIO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA
FACULTAD DE AGRONOMÍA CULIACÁN
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL FUERTE
FACULTAD DE CIENCIAS DEL MAR
FACULTAD DE AGRONOMÍA VALLE DEL CARRIZO

En la Ciudad de Culiacán Rosales, Sinaloa, el día 10 de julio del año 2020, el que suscribe José de Jesús Campos Sánchez, alumno del Programa de Maestría en Ciencias Agropecuarias, con número de cuenta 0710175-9, de la Unidad Académica Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la UAS, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de la Dra. Idalia Enríquez Verdugo y de la Dra. Soila Maribel Gaxiola Camacho y cede los derechos del trabajo titulado "Identificación Morfológica y Molecular de *Haematobia* spp. Que Afecta a Bovinos de Culiacán, Sinaloa", a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, del Colegio de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma de Sinaloa, para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales, todo esto en apego al artículo 27 de la Ley Federal de Derechos de Autor.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

ATENTAMENTE


José de Jesús Campos Sánchez

DOMICILIO: Col. Villa Arredondo, Costa Rica, Culiacán, Sinaloa, México.
TELÉFONO: 667-2144945
CORREO ELECTRÓNICO: camposjesus06@hotmail.com
CURP: CASJ911030HSLMNS00

DEDICATORIA

A mis compañeras de vida Alejandra y Alessita, por ser el motivo de mi superación continua. Con ellas y para ellas.

A mi madre †Paula hasta el cielo, porque siempre me dijiste “A pesar de las circunstancias tu sigue siempre adelante, te quiero hijo.”

A mi padre Lino, por hacer de mí un hombre honrado y responsable con la familia, por sembrar en mí el amor, cariño y respeto hacia los animales.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco infinitamente a la Dra. Nohemí Castro por todo el esfuerzo puesto en cada momento de cada mensaje textual, llamada telefónica y correo electrónico para ponerme a trabajar y meterme al carril. Así mismo a la Dra. Idalia Enríquez por toda la energía brindada hacia mí y así poder lograr este objetivo. A la Dra. Soila Gaxiola por la persistencia que tuvo siempre y las orientaciones que me brindó. Al MC. Julián Ríos Sicaños por las asesorías y la ayuda brindada.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, especialmente a los laboratorios de Parasitología y Biología Molecular por desarrollarme académicamente y poner a mi disposición todo el equipo y material que se utilizó para poder culminar este estudio.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el apoyo monetario brindado.

Al rancho Santa Lucía y Agrícola Paredes por el trabajo brindado y los apoyos otorgados.

A mi familia, amigos y a todas las personas que influyeron de una manera u otra para poder lograr finalizar este trabajo.

CONTENIDO	Página
ÍNDICE DE CUADROS	VII
ÍNDICE DE FIGURAS	VIII
RESUMEN	IX
ABSTRACT	X
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
2.1 Generalidades de los Dípteros	2
2.1.2 Dípteros Hematófagos.....	3
2.1.3 Características de Díptera: Muscidae.....	3
2.1.4 Características de <i>Stomoxys calcitrans</i>	4
2.1.5 Generalidades de <i>Haematobia irritans</i>	5
2.2 Clasificación taxonómica de <i>Haematobia irritans</i>	6
2.3 Características morfológicas de <i>H. irritans</i>	6
2.4 Ciclo biológico <i>Haematobia irritans</i>	7
2.5 Impacto de <i>Haematobia irritans</i> en el bovino y su impacto económico	9
2.6 Distribución de <i>Haematobia irritans</i>	11
2.7 Identificación genética de <i>Haematobia irritans</i>	12
III. HIPÓTESIS	17
IV. OBJETIVOS.....	18
Objetivo General.	18
Objetivos Específicos.	18
V. MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
5.1. Localización.....	19

5.3. Características de las Unidades de Producción	20
5.4. Colección e identificación morfológica de <i>Haematobia irritans</i>	20
5.5. Extracción de DNA	22
5.6. Amplificación del gen COI de <i>H. irritans</i> por reacción en cadena de la polimerasa (PCR	23
5.7. Secuenciación	24
5.8. Análisis <i>In Silico</i>	24
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
VII. CONCLUSIÓN	32
VIII. LITERATURA CITADA.....	33

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO	TÍTULO	PÁGINA
Cuadro 1.	Clasificación taxonómica de <i>Haematobia irritans</i>	6
Cuadro 2.	Secuencias de genes de <i>Haematobia irritans</i> descritos en genbank (www.ncbi.nlm.-Snih.gov Acceso al 4/02/2020).	15
Cuadro 3.	Unidades de producción bovina cooperantes.....	20
Cuadro 4.	Secuencias parciales del gen COI de <i>H. irritans</i> de especímenes individuales.....	29

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO	PÁGINA
Figura 1.	Ciclo de vida de las moscas asociadas al ganado	9
Figura 2.	<i>Haematobia</i> adulta, lateral. Características del género:.....	21
Figura 3.	<i>Stomoxys</i> adulto, lateral. Características del género.	22
Figura 4.	Vista ventral de <i>H. irritans</i>	25
Figura 5.	Vista dorsal de un espécimen de <i>H. irritans</i>	26
Figura 6.	Gel de agarosa al 2 % teñido con GelRed® (Biotium), donde se visualiza: carril 1-6 y 10 DNA genómico de <i>Haematobia irritans</i>	27
Figura 7.	Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Electroforesis del producto de PCR de COI de <i>H. irritans</i> , Carril 1: marcador de 1Kb, carril 3, 4, 7, 9 y 10: amplificación del gen aproximadamente a 640 pb.	28
Figura 8.	Árbol filogenético basado en secuencias parciales del gen COI sub-1 de distintas especies de dípteros muscoideos registrados en la base del banco de genes (GenBank) usando el método Neighbor-Joining.....	31

RESUMEN

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA Y MOLECULAR DE *Haematobia* spp. QUE AFECTA A BOVINOS DE CULIACÁN, SINALOA

JOSÉ DE JESÚS CAMPOS SÁNCHEZ

Las moscas son insectos que pertenecen al orden Díptera, uno de los grupos de animales con mayor riqueza. Dentro de las moscas hematófagas de bovinos más importantes se encuentra *Haematobia irritans*. Por ello el objetivo del presente estudio fue identificar morfológica y molecularmente a *Haematobia* spp presente en bovinos de Culiacán Sinaloa. La colección de especímenes se realizó en unidades de producción cooperantes en 3 diferentes sindicaturas y el tamaño de muestra se determinó mediante selección intencionada. De las 3 unidades de producción consideradas para este estudio se seleccionaron de cada uno de estos al azar 10 bovinos y en total se recolectaron 86 especímenes mediante la red entomológica, colocándose en tubos con alcohol al 70%, y se trasladaron al laboratorio de parasitología de la FMVZ UAS para la identificación morfológica mediante claves dicotómicas. Se llevó a cabo la extracción de DNA de 30 especímenes individuales y posteriormente se realizó el PCR, se utilizaron los oligonucleótidos del gen COI, las muestras positivas fueron secuenciadas mediante el sistema 3730XL Applied Biosystems®. Por último se realizó el análisis *In Silico*. La identificación morfológica de las moscas obtenidas de los bovinos muestreados dio como resultado que de los especímenes encontrados el 100% correspondió al género *Haematobia*. La amplificación del gen COI de *H. irritans* se observó aproximadamente a 640 pb. Se obtuvieron 3 secuencias genéticas que presentaron una identidad entre 97.6-99.7 % con secuencias del gen COI de *Haematobia irritans*. Por último se determinó que estas secuencias se encuentran en un solo grupo presentando una relación estrecha con una reportada en ASIA, con lo reportado en GenBank. Se identificó la presencia de la mosca *H. irritans* en bovinos de Culiacán, Sinaloa, indicando que las tres secuencias de Culiacán obtenidas poseen una identidad elevada y presentan una estrecha relación filogenética con su pertenencia en el género *Haematobia irritans*.

Palabras clave: Identificación, Caracterización, *Haematobia*, Bovinos.

ABSTRACT

MORPHOLOGICAL AND MOLECULAR IDENTIFICATION OF *Haematobia* spp. AFFECTING CULIACAN, SINALOA CATTLE

JOSÉ DE JESÚS CAMPOS SÁNCHEZ

Flies are insects that belong to the order Diptera, one of the groups of animals with greater richness. *Haematobia irritans* is one of the most important haematophagous flies in cattle. Therefore, the objective of this study was to identify morphologically and molecularly *Haematobia* spp present in Culiacán Sinaloa cattle. The specimen collection was performed in cooperating production units in 3 different syndicates and the sample size was determined by intentional selection. Of the 3 production units considered for this study, 10 cattle were randomly selected from each of these and in total 86 specimens were collected through the entomological network, placed in 70% alcohol tubes, and transferred to the parasitology laboratory for morphological identification by dichotomous keys. The DNA extraction of 30 individual specimens was carried out and later the PCR was performed, the oligonucleotides of the IOC gene were used, the positive samples were sequenced using the system 3730XL Applied Biosystems. Finally, the In Silico analysis was carried out. The morphological identification of the flies obtained from the sampled bovine animals resulted in 100% of the specimens found corresponding to the genus *Haematobia*. Amplification of the COI gene of *H. irritans* was observed at approximately 640 bp. We obtained 3 genetic sequences that presented an identity between 97.6-99.7 % with sequences of the *Haematobia irritans* gene IOC. Finally it was determined that these sequences are in a single group presenting a close relationship with one reported in ASIA, with what reported in Genbank. The presence of the fly *H. irritans* was identified in cattle of Culiacán, Sinaloa, indicating that the three sequences of Culiacán obtained possess a high identity and have a close phylogenetic relationship with their belonging in the genus *Haematobia irritans*.

Keywords: Identification, Characterization, *Haematobia*, Cattle

I. INTRODUCCIÓN

La mosca del cuerno *H. irritans* es un ectoparásito hematófago obligado del ganado bovino, que se encuentra ampliamente distribuida en el continente americano (Guglielmone *et al.*, 2002), se distribuye principalmente en la región holártica, aunque fue introducida a América del Norte desde Francia en 1887 mediante humanos y ganado, esta plaga ahora se encuentra en todo el continente americano, así como en Europa, Asia y las regiones no tropicales de África (Iwasa e Ishiguro, 2010; Fitzpatrick y Kaufman, 2011). El ganado parasitado por *H. irritans* sufre no solo por la pérdida de sangre, sino además porque la picadura de esta mosca lo irrita fuertemente y reduce el tiempo dedicado a su alimentación, lo que interfiere la digestión y asimilación de los nutrientes e incrementa el gasto de energía para ahuyentar a las moscas, a esto se le suma un estado generalizado de tensión, lo que finalmente incide en la producción de leche y carne, adicionalmente son vectores mecánicos de diferentes patógenos que causan enfermedades en los bovinos (Cruz *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2011). Los estudios de identificación morfológica son el estándar de oro para identificar moscas, sin embargo presenta limitantes tales como, daños por un mal manejo del espécimen, y la morfología similar de algunas moscas para algunos taxónomos con poca experiencia, debido a esto, la identificación molecular facilita el análisis tomando muchos genes diana en las mitocondrias (Tu'lio de Oliveira *et al.*, 2005; Changbunjong *et al.*, 2016). Una herramienta molecular para la identificación de especies, y de secuencias más usadas se encuentran las subunidades I y II de los genes mitocondriales de la Citocromo C Oxidasa (COI y COII), siendo la subunidad larga (COI) la más utilizada por los estudios en entomología (Aristizábal-Botero *et al.*, 2016). Debido a que la región de estudio tiene una importante actividad ganadera y las condiciones climáticas favorecen la presencia de dípteros el objetivo de este trabajo fue contribuir al conocimiento la identificación y caracterización morfológica y genética de *Haematobia spp* presente en los bovinos de Culiacán Sinaloa.

II. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades de los Dípteros

2.1.1 Orden Díptera

El orden Diptera, está dividido en dos sub-órdenes; Nematocera y Brachycera, los Nematocera están representados por los mosquitos, y otros dípteros con antenas largas, los *Brachycera* incluyen, múscidos, califóridos, sarcófagidos y otros dípteros de antenas cortas, los *Brachycera* a su vez están divididos en varios infra-órdenes. *Asilomorpha*, *Muscomorpha*, *Stratiomyomorpha*, *Tabanomorpha*, *Vermileonomorpha* y *Xylophagomorpha*, la subsección *Calypttratae* del infra-orden Muscomorpha es la mejor representada en cuanto a fauna sarcosaprófaga se refiere, las familias *Calliphoridae*, *Muscidae* y *Sarcophagidae* son las más comunes en la descomposición de un cadáver, tanto en etapa larval como en adulta, siendo así las familias más útiles en la evidencia forense (Colpos, 2019).

Los dípteros como insectos que son, tienen el cuerpo dividido en tres partes que son la cabeza, el tórax y el abdomen; son insectos holometábolos con metamorfosis completa que normalmente incluye cuatro fases: huevo, larva, pupa y adulto; ello significa que el aspecto que presentan como adulto es diametralmente opuesto al del aspecto larvario, las larvas viven generalmente en hábitats claramente diferentes a los de los adultos; la inmensa mayoría de los dípteros tienen hábitos diurnos, pero también los hay crepusculares e incluso nocturnos, otros se han adaptado a vivir en zonas urbanas (especies sinantrópicas) por ejemplo, *Muscidae*, *Calliphoridae*, *Sarcophagidae* (Tolrá, 2015).

Se han descrito 160, 591 especies de dípteros, lo que representa el segundo grupo (Orden) más diverso de seres vivos, sólo superado por los coleópteros con más de 390.000 especies (Zhang, 2013).

Estudios phylogeneticos de Diptera han sido realizados por algunos investigadores, en particular mediante el análisis de secuencias de COI y COII de ADN mitocondrial (ADMmt), siendo útil para la clasificación taxonómica y las

relaciones filogenéticas de las moscas ciclorafásicas; sin embargo, respecto a la filogenia molecular de las moscas *Stomoxys*, hay solo algunos informes sobre el género *Stomoxys* dentro de Calypterate Diptera (Iwasa e Ishiguro, 2010).

2.1.2 Dípteros Hematófagos

El complejo de los dípteros hematófagos contiene muchas especies de moscas, mosquitos y tábanos, lo que separa a los adultos del orden Díptera es que poseen sólo un único par de alas, el segundo par de alas (inferiores), se han modificado en estructuras llamadas halterios, que se utilizan como órganos de equilibrio, a menudo se puede utilizar para propósitos taxonómicos, la mayoría de los dípteros adultos tienen la cabeza grande y de gran movilidad, ojos que son normalmente más grandes en el macho que la hembra, muchas de las especies hematófagas muestran considerablemente una especialización morfológica en las partes bucales para la succión y fácil penetración de la piel del huésped (Rengifo, 2004).

2.1.3 Características de Díptera: Muscidae

Las moscas son insectos que pertenecen al orden Díptera, uno de los grupos de animales con mayor riqueza ya que se han descrito al menos 153,000 especies (Rosales y Huerta, 2013).

Los múscidos incluyen especies de cuerpo robusto a delgado y de tamaño pequeño a grande (2-14 mm), presentan coloración variada, desde gris, negro o amarillo a azul o verde metálico, así mismo los machos son por lo general holópticos (con la frente estrecha y las placas frontorbitales contiguas), pero pueden ser en algunos casos diópticos (con la frente ancha), la hembra es siempre dióptica, con o sin cerda interfrontal (Nihei y Domínguez, 2008). Dentro de las moscas picadoras más importantes se encuentran *Stomoxys calcitrans* (*S. calcitrans*) y *Haematobia irritans* (*H. irritans*) (Aubry y Geale, 2010).

2.1.4 Características de *Stomoxys calcitrans*

S. calcitrans mejor conocida como mosca de los establos es una mosca hematófaga que se alimenta principalmente de los bovinos y una amplia variedad de otros animales, aunque ambos sexos se alimentan sangre, las hembras requieren proteínas de la sangre para el desarrollo del huevo, así mismo estas moscas requieren de tres a siete comidas de sangre para la ovoposición, además la mosca de establo se alimenta de una serie de hospedadores y se ha investigado el potencial reproductivo de diferentes tipos de sangre del huésped, la producción de huevos es más alta en hembras alimentadas con sangre de herbívoros como bovinos, burros, ovejas y caballos en comparación con otras especies omnívoras como cerdos y perros (Pitzer, 2010). Son moscas hematófagas que miden de 3 a 10 mm de largo, con apariencia general de mosca doméstica, pero con un modificación en el aparato bucal para la fácil succión de sangre (Mavoungou *et al.*, 2008).

Hay 18 especies conocidas en el género *Stomoxys* (Kaufman y Weeks, 2016), mismo que comprende 18 especies de las cuales 17 son tropicales (Afrotropical y regiones orientales) y sólo una es cosmopolita: *S. calcitrans* (Mavoungou *et al.*, 2008). *S. calcitrans*, es una plaga grave del ganado en las operaciones de alimentación animal, como los establos lecheros y corrales de engorda a nivel mundial, donde abundan los hábitats perfectos para estas larvas para estas moscas (Broce *et al.*, 2005; Solórzano, 2014).

A diferencia de la mosca de los cuernos, la mosca de los establos se encuentra asociada a condiciones productivas más intensivas, específicamente en producción de carne y leche, donde el sistema estabulado es el más afectado por este insecto, esto es debido a que la ovoposición y los estadíos inmaduros se desarrollan en excretas, restos de silos, henos y alimentos en general que se mezclan con la orina y heces de los bovinos, así mismo los hábitos de alimentación de la mosca de los establos sobre los bovinos producen severas

formas de irritación y estrés que resultan en pérdidas económicas por disminución en la ganancia de peso y en la eficiencia en la conversión alimenticia, cuando son atacados por la mosca de los establos, los bovinos reaccionan con patadas, movimientos de la cola y de la cabeza intentando proteger sus patas delanteras y flancos que son el sitio preferido de alimentación (Anziani, 2013).

2.1.5 Generalidades de *Haematobia irritans*

La mosca del cuerno *H. irritans* se distribuye principalmente en la región holártica, aunque fue introducida a América del Norte desde Francia en 1887 mediante humanos y ganado, esta plaga ahora se encuentra en todo el continente americano, así como en Europa, Asia y las regiones no tropicales de África (Iwasa e Ishiguro, 2010; Fitzpatrick y Kaufman, 2011), es un ectoparásito hematófago obligado del ganado bovino, que se encuentra ampliamente distribuida en el continente americano (Guglielmone *et al.*, 2002). La biología de *H. irritans* es probablemente similar a lo largo del rango geográfico, debido a las estrechas relaciones con los hospedadores y al uso del jardín fresco para la ovoposición, esta especie es capaz de tolerar un alto grado de variación climática y topográfica, y se extiende rápidamente hacia nuevas áreas geográficas (Foil y Hongsette, 1994). El control de las moscas de los cuernos se ha basado principalmente en el uso de insecticidas químicos; esta estrategia ha sido parcialmente exitosa pero ha resultado en la selección de moscas resistentes a la mayoría de insecticidas comerciales disponibles, además de la resistencia, los insecticidas químicos afectan a otros organismos vivos, contribuyen a la contaminación ambiental y contaminan los productos del ganado para consumo humano. Recientemente, se han realizado investigaciones para desarrollar nuevas estrategias de control de la mosca del cuerno que son rentables y amigable con el medio ambiente como los hongos entomopatógenos, *Metarhizium anisopaliniae*, contra las larvas de la mosca del cuerno *in vitro*, sin embargo, la aplicación en el campo es difícil (Konganti *et al.*, 2018).

2.2 Clasificación taxonómica de *Haematobia irritans*

H. irritans es un ectoparásito de bovinos, en México se le halla en zonas tropicales y subtropicales; de acuerdo a las características morfológicas, fisiológicas y filogenéticas su clasificación taxonómica se presenta en el cuadro 1 (De Campos, 2018).

Cuadro 1. Clasificación taxonómica de *Haematobia irritans*

Phylum	Arthropoda
Subphylum	Mandibulata
Superclass	Hexapoda
Clase	Insecta
Orden	Diptera
Suborden	Cyclorrhapha
Familia	Muscidae
Especie	<i>Haematobia irritans</i>

2.3 Características morfológicas de *H. irritans*

Las moscas del cuerno adultas tienen cuerpos de color gris parduzco o negro y son brillantes, con alas ligeramente superpuestas que se mantienen planas sobre el abdomen, el cuerpo mide de 3.5 a 5 mm de largo, o aproximadamente la mitad del tamaño de la mosca doméstica común, (*Musca domestica*), la cabeza tiene pequeñas antenas de color marrón rojizo que apuntan hacia abajo, el tórax tiene dos franjas paralelas en la superficie dorsal, justo detrás de la cabeza; tanto la mosca macho como las femeninas tienen cuernos bucales chupadores y se alimentan exclusivamente de sangre (Fitzpatrick y Kaufman, 2011). Las larvas de *H. irritans* tienen aproximadamente 7 mm de largo y los gusanos son de un color amarillo pálido, con un cuerpo simple y alargado que carece de una cabeza dura.

Un par de mandíbulas esclerotizadas, que muerden verticalmente son visibles en el extremo anterior de la cabeza (Harris, 2003).

Existen dos especies de *Haematobia*, morfológicamente parecidas pero con diferencias entre estas menores, donde *H. exigua* se distingue de *H. irritans* por la presencia de 4-6 pelos largos con puntas rizadas en los segundos segmentos del tarso posterior del macho. Estudios genéticos de estas especies de *Haematobia* se realizaron en cuatro poblaciones donde las secuencias mostraron divergencia entre *H. irritans* (Obihiro y Morioka) y *H. exigua* (Taiwán y Vietnam) fueron 1.8% y 1.9% (Low *et al.*, 2014).

2.4 Ciclo biológico *Haematobia irritans*

Los huevos son depositados en estiércol bovino fresco y eclosionan después de 20-24 h para ser larvas pequeñas de primer estadio, estas larvas crecen y mudan a larvas más grandes, de segundo y tercer estadio, las larvas del tercer estadio finalmente forman la etapa de pupa, el desarrollo de huevo a pupa toma aproximadamente 4-8 días, dependiendo de la temperatura, después de aproximadamente 6-8 días en la etapa de pupa a las temperaturas de verano, los adultos emergen para buscar un huésped y alimentarse de sangre, los adultos de ambos sexos son hematófagos y pasan una gran parte de sus vidas en sus hospedadores, los adultos comienzan a aparearse cuando tienen de 3 a 5 días y las hembras comienzan a poner huevos cuando tienen entre 3 y 8 días, sin embargo, hay informes de hembras que ponen huevos cuando solo tienen 2 días de nacidos, los adultos deben tener comidas con sangre para aparearse con éxito, y las hembras necesitan alimentos con sangre para la producción de huevos, las hembras ponen entre 11 y 13 huevos durante un ciclo, en estiércol fresco; se debe alimentar nuevamente de sangre antes de que se pueda producir un segundo lote de huevos, la producción total de por vida es de 100 a 200 huevos, los adultos de *H. irritans* viven hasta 21 días en el laboratorio, pero probablemente sobreviven menos, alrededor de 1 a 2 semanas en el campo (Foil y Hongsette, 1994).

H. irritans parasita a los bovinos en pastoreo, alimentándose de la sangre y desarrollando las fases larvales y pupas en la materia fecal de estos, el tamaño de los adultos es de aproximadamente la mitad de la mosca doméstica, ambos sexos son hematófagos y permanecen constantemente sobre los bovinos al cual abandonan solamente para colocar los huevos en la materia fecal fresca, los huevos eclosionan dentro de las 24 horas dando lugar a las larvas, las cuales se alimentan en la materia fecal y en menos de una semana dan lugar a las pupas, la mosca de los cuernos prefiere alimentarse sobre los animales adultos (con preferencia sobre los pelajes oscuros) y dentro de esta categoría, las mayores cargas parasitarias se observan en los toros siendo común en estos hospedadores poblaciones que superan las 2, 000 moscas por animal, en ausencia de bovinos o cuando existen poblaciones numerosas, *H. irritans* puede parasitar también a los equinos sobre los cuales se la puede observar en formas agregadas o de racimos compactos que generalmente no superan una carga de 200 a 300 insectos por equino pero que pueden ocasionar dermatitis y úlceras superficiales y pruriginosas (Anziani, 2009).

Los estadios del ciclo biológico de la familia Muscidae son huevo, larva, pupa y adulto (Fig. 1), a larva muda dos veces, de modo que hay una primera, una segunda y una tercera fases larvares, siendo cada una de ellas de mayor tamaño que la precedente (Rosales y Huerta, 2013). El ciclo de desarrollo de *H. irritans* es muy corto, demorando de 10 a 14 días en completarse. Las larvas y las pupas se desarrollan en el estiércol y una vez que las moscas emergen de las pupas, comienzan inmediatamente y siguen alimentándose de ganado durante toda su vida. Las moscas salen del huésped solo para moverse a otros o poner huevos en estiércol fresco. Ambos los machos y las hembras se alimentan de 24 a 38 veces por día ingiriendo un promedio de 14.3 mg de sangre por mosca (Torres *et al.*, 2011; Konganti *et al.*, 2018).

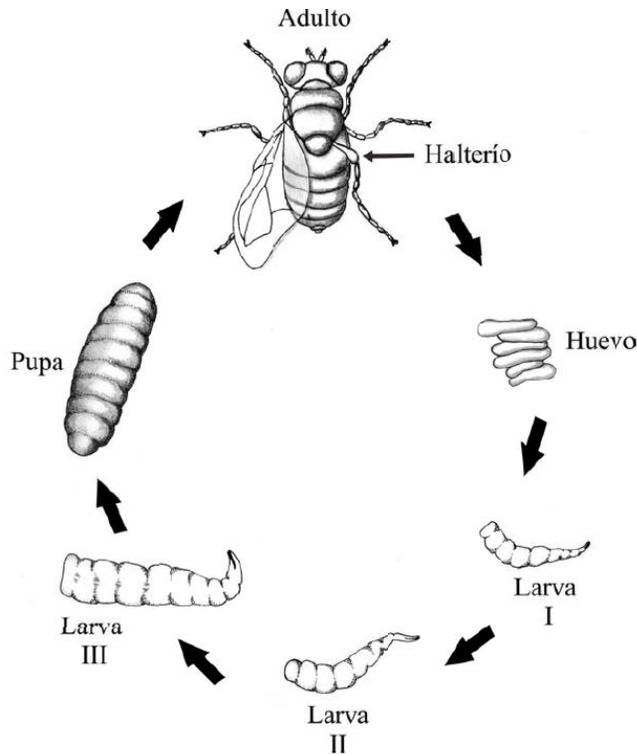


Figura 1. Ciclo de vida de las moscas asociadas al ganado (Rosales y Huerta, 2013).

2.5 Impacto de *Haematobia irritans* en el bovino y su impacto económico

Las pérdidas económicas en la producción de leche y carne, serían el resultado de la irritación que *H. irritans* le produce a los animales durante su alimentación, más que como resultado de la pérdida de sangre (alrededor de 7ml animales con infestaciones de 500 moscas), dicha irritación varía en intensidad de acuerdo a la raza involucrada, la irritación constante les produce un importante estrés, evidenciado por el aumento de cortisol sérico, de los signos vitales y del movimiento, llevando a una menor retención de nitrógeno; además, los animales con moscas del cuerno caminan y descansan más que aquellos animales que no presentan moscas, siendo estos factores lo que provoca las pérdidas en producción (Prieto *et al.*, 1999). El díptero *H. irritans* ha sido indicado como responsable de diversos daños a la producción pecuaria, con el consecuente perjuicio económico en numerosos países, se han estimado pérdidas en la ganancia de peso por efecto directo de la mosca sobre los animales de engorde o

de un modo indirecto a través de las madres en el momento del destete, por otro lado mientras que en otros casos no encuentran pérdidas significativas, en estados unidos han reportado pérdidas totales, otorgándole importancia a un síndrome de factores, nutricionales, climáticos y otros no determinados que podrían potencia su acción al incrementar el estrés en los animales (Cicchino *et al.*, 1998). En México es reconocida la importancia de *H. irritans* en el ganado manejado en pastoreo, particularmente en las regiones tropicales y subtropicales, en las cuales su impacto en la producción es fuerte y en donde debido a dicha situación, los programas de control químico intensivo han provocado la existencia de resistencia a los insecticidas organofosforados y piretroides en ciertas poblaciones de este díptero (Cruz *et al.*, 1999). Son responsables de pérdidas económicas sustanciales debido a su impacto perjudicial en la salud y la productividad del ganado (Younger 2011). Solo en los Estados Unidos, las pérdidas anuales se aproximan a mil millones de dólares y se gastan \$ 60 millones adicionales por año en plaguicidas para controlar los brotes (Torres *et al.*, 2011; Benson *et al.*, 2014). El ganado parasitado por *H. irritans* sufre no solo por la pérdida de sangre, sino además porque la picadura de esta mosca lo irrita fuertemente y reduce el tiempo dedicado a su alimentación, lo que interfiere la digestión y asimilación de los nutrientes e incrementa el gasto de energía para ahuyentar a las moscas, a esto se le suma un estado generalizado de tensión, lo que finalmente incide en la producción de leche y carne, adicionalmente son vectores mecánicos de diferentes patógenos que causan enfermedades en los bovinos (Cruz *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2011). En ganado lechero por infestaciones superiores a 200 moscas por animal produce una pérdida de 520 ml de leche y 28 kg de peso al día; en ganado de carne, las infestaciones por *H. irritans* pueden causar una reducción de 8.1 kg de peso al día, además las lesiones cutáneas causadas por la alimentación intermitente de la mosca del cuerno produce también daños importantes en la piel, afectando la industria del cuero (Torres *et al.*, 2011). Se ha descrito que la mosca adulta es hematófaga y se alimenta de 20 a 40 veces por día del ganado y el impacto económico se ha

estimado en \$ 2.5 mil millones de pérdidas anuales solo en Brasil (Grisi *et al.*, 2014).

En general, *H. irritans* en México afecta al ganado durante 7 meses del año, ganado en el estado de Veracruz (trópico húmedo caliente) experimentó una alta infestación *por H. irritans* (70 a 121 moscas / animal) entre agosto y noviembre, el ganado en el estado de Colima, incluidos los ambientes tropicales y subtropicales subhúmedos, tenía infestaciones elevadas de moscas de cuerno (120 a 236 moscas por animal) durante 6 meses del año, Sin embargo, en el estado de Tamaulipas se observaron niveles altos de infestación por mosca en el ganado bovino durante todo el año, con picos de población superiores a 200 ejemplares por animal en septiembre, abril, mayo y junio, teniendo en cuenta la población de ganado vacuno en riesgo, las pérdidas debidas al parasitismo de la mosca de los cuernos en México se estiman en US \$ 231'665,430 (Rodríguez-Vivas *et al.*, 2017).

2.6 Distribución de *Haematobia irritans*

El díptero *Haematobia irritans* comúnmente nombrado como mosca de los cuernos es un parásito hematófago de los bovinos (de Velasco *et al.*, 2019), y presenta una amplia distribución, originaria de Europa esta mosca se introduce a América a finales del siglo XIX debido al traslado de bovinos de Europa hacia los Estados Unidos (Riley, 1889), y se extiende a la Costa Oeste y regiones del sur de ese país, y posteriormente alcanza a la república Mexicana por los estados del norte del país (Romano, 1991; Schmidt *et al.*, 1978; Williams *et al.*, 1985). Actualmente su distribución en el continente americano es extensa, donde las principales zonas en las que se le localiza son en zonas de climas tropicales que tienen de 20°C a 30°C y humedad relativa de entre 65 y 90% (Torres *et al.*, 2012).

La frecuencia de infestación por este díptero se ha reportado por diversos autores, en un estudio realizado en Bolivia, en predios ganaderos de bovinos bajo sistemas de producción pecuaria de leche y de doble propósito se mostró una frecuencia de

infestación del 50.69% por *H. irritans* en bovinos (Campos y Mariscal, 2014). Así mismo en Cuba se analizó la dinámica poblacional de la mosca *Haematobia irritans* en bovinos infestados naturalmente y se encontró que la mosca estuvo presente todo el año observando una relación positiva y directa entre las variables climáticas de temperatura media ($r=0,73$), las precipitaciones ($r=0,63$) y la presencia de la mosca sobre los animales; los meses de mayor intensidad de infestación fueron en el periodo de junio a septiembre, lo que coincide con los meses de mayor calor y lluvia en ese país y se reveló la presencia de la mosca en el 72.7% de las unidades muestreadas (Fuentes *et al.*, 2016). Por su parte, Cruz *et al.* (2000) realizaron un estudio en Aguascalientes, México en tres establos de ganado lechero de la raza Holstein donde analizaron la distribución anual de *H. irritans* y observaron en el establo 1 del 90 al 100% de infestación del inicio de verano a la segunda mitad de otoño mientras los otros dos establos mostraron períodos menores en cuanto a la duración de altos porcentajes de infestación pero ubicados en el mismo periodo estacional, siendo este período (verano–otoño) el de más alta infestación y en donde se observaron niveles de parasitosis no tolerables para ganado lechero.

2.7 Identificación genética de *Haematobia irritans*

Aunque la identificación morfológica es convencional, barata y el estándar de oro para identificar moscas, se pueden presentar dificultades tales como, daños por un mal manejo del espécimen, y la morfología similar de algunas moscas para algunos taxónomos con poca experiencia, debido a esto, la identificación molecular ha sido desarrollada para evitar estas limitaciones tomando muchos genes diana en las mitocondrias (DNA Mitocondrial (mtDNA), subunidad I del citocromo c oxidasa, citocromo B, subunidad 5 de la NADH deshidrogenasa) y el núcleo (espaciador interno transcrito 2) como marcadores genéticos para identificar las moscas (Tu'lio de Oliveira *et al.*, 2005; Changbunjong *et al.*, 2016). La mitocondria es un organelo celular que participa en la transformación de energía de oxidación en ATP, una molécula indispensable para la vida, esto se

logra gracias a la gran cantidad de moléculas que se encuentran dentro de la mitocondria, uno de los cuales es el DNA mitocondrial, el cual es una molécula con replicación semi-conservada, con genes únicos que permite contar con una metodología estandarizada para determinar su secuencia, la mitocondria al cumplir funciones de obtención de energía y respiración celular, permite la conservación del DNA con la misma calidad que lo hace el núcleo, con la diferencia que en animales esta información es heredada únicamente vía materna.

El mtDNA es una molécula circular de aproximadamente 16.000 nucleótidos que presenta replicación semi-conservada, con ausencia de proteínas cromosomales (histonas) y ninguna repetición de genes, el tamaño y la cantidad de proteínas que se codifican en el mtDNA varían en un nivel muy alto, al comparar diferentes individuos (Herbert *et al.*, 2004). El ADN Mitocondrial (mtDNA) es considerado un marcador molecular filogenético, de estudios de población y de evolución en una amplia variedad de taxones de los animales, incluidos los insectos. La caracterización de genes mitocondriales contribuye a la identificación de secuencias informativas que han mejorado nuestra comprensión de la evolución de organismos y la diversidad del genoma mitocondrial (Tu'lio de Oliveira *et al.*, 2005). Estudios sobre la secuencia de mtDNA proveen información sobre evolución y patrones estructurales de los trabajos de especies Muscoidea, así mismo la caracterización de genes mitocondriales de la familia Muscidae contribuyen al incremento en el entendimiento acerca de la diversidad y evolución del gen mtDNA del orden díptera (Konganti *et al.*, 2018).

Otra herramienta molecular para la identificación de especies, y de secuencias más usadas se encuentran las subunidades I y II de los genes mitocondriales de la Citocromo C Oxidasa (COI y COII), siendo la subunidad larga (COI) la más utilizada por los estudios en entomología (Aristizábal-Botero *et al.*, 2016). El gen mitocondrial citocromo c oxidasa I (COI) es la subunidad principal del complejo citocromo C oxidasa (complejo proteico transmembrana o complejo respiratorio IV) , se encuentra en bacterias y en la mitocondria de eucariotas, es la última enzima en la cadena de transporte de electrones respiratorios y a menudo se usa en la identificación de especies animales debido a que tiene una alta tasa de

sustitución, presentando variación de la secuencia entre especies del mismo género, en la última década, estudios realizados en grupos animales como aves, peces, mamíferos, lepidópteros, hemípteros y otros insectos han demostrado que el fragmento COI presenta una variación interespecífica lo suficientemente amplia para permitir una buena correspondencia entre la identificación molecular y la identificación basada en caracteres morfológicos de las especies (Herbert et al. 2004). Se ha descrito un fragmento de 648 pb del gen mitocondrial citocromo c oxidasa subunidad I (COI o *cox1*), que sirve como marcador molecular (Crawford et al., 2011; Lancheros-Piliago et al., 2013; Daza, 2018). Entre los genes que codifican proteínas en el genoma mitocondrial, la subunidad del citocromo c oxidasa I (COI) se ha utilizado ampliamente para estudios evolutivos en insectos, debido a que este gen muestra diversos grados de conservación a lo largo de su secuencia, y un rango de tasas de sustitución de nucleótidos que pueden usarse para diferentes análisis evolutivos. La identificación de oligonucleótidos conservados capaces de amplificar regiones COI específicas ha mejorado la utilidad de este gen como marcador molecular. Por ejemplo, más del 68% de todas las secuencias mitocondriales de Diptera: Brachycera que se encuentran depositadas en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov) están relacionados con el gen COI (Torres et al., 2011). Algunos grupos taxonómicos de la superfamilia Muscoidea están pobremente representados en datos de bases con secuencias de genes nucleares de pocas especies. Estudios filgenéticos son fundamentados por marcadores moleculares (Konganti et al., 2018). Las secuencias de genes de *Haematobia irritans* que se encuentran depositadas en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), se describen en el cuadro XX, donde se describen un total de 22 911 secuencias de 26 genes que van desde 33 hasta 6 162 pb, donde el gen COI posee 76 secuencias que van desde 237 a 2 272 pb.

Cuadro 2. Secuencias de genes de *Haematobia irritans* descritos en genbank (www.ncbi.nlm.nih.gov Acceso al 4/02/2020).

<i>Haematobia irritans</i> -GEN	NÚMERO	PB
mRNA	17,964	33-3,718
transcribed RNA sequence	4,717	201-6,162
Mitque ochondrial COI gene	76	237-2,272
mitochondrion, complete genome	2	16,078
mitochondrion, partial genome	1	15,043
converting enzyme	1	2,664
tRNA-Ile gene, partial sequence	11	1,270-1,723
18S ribosomal RNA gene	9	359-2,450
28S ribosomal RNA gene	6	564-1,003
16S ribosomal RNA gene	1	465
mariner transposase pseudogene, complete cds	5	1,170-1,692
Resistance-associated marker	1	1,402
dehydrogenase subunit 2	1	990
dehydrogenase subunit 5	12	874
Cytochrome b (CytB) gene	61	399-872
D50 small subunit ribosomal RNA gene	1	537
transposase pseudogene	17	200-463
microsatellite sequence	10	67-185
sodium channel alpha subunit HF-para-like gene	3	125-398
sodium channel alpha-subunit homolog	1	542
sodium channel pseudogene	1	162
sodium channel (SKDR) gene	1	78
shaker-like potassium channel homolog, transmembrane segments S1-S5 gene, partial cds	1	903
transposase gene, partial cds	6	228-231
pyrethroid-resistant marker E-AAG x M-CAC genomic sequence	1	152
Orco (Orco) gene, partial cds	1	399
TOTAL	22,911	

El tamaño del genoma de la mosca de los cuernos *H. irritans* se estimó por citometría de flujo con aproximadamente 1.2 Gb, donde el tamaño final del ensamblaje del genoma pulido es de 1.143 Gb, el cual es aproximadamente el 95,4% del tamaño del genoma de 1.197 Gb *H. irritans* anteriormente estimado (Picard et al. 2012), este comparado con el tamaño de otras moscas de la misma familia como la *Musca domestica* y *Stomoxys calcitrans*, los cuales están reportados con un tamaño de 1.0 Gb y 1.1 Gb, respectivamente, lo cual indica que la mosca de los cuernos poseen un genoma más grande (Konganti et al., 2018). Konganti et al. (2018), secuenciaron y ensamblaron el primer genoma de la mosca *H. irritans*, donde determinaron el tamaño del genoma v1.0 en 1.14 Gb, y pronosticaron 34,413 modelos de genes utilizando datos de RNA-Seq como evidencia. Además identificaron genes relacionados con la resistencia a los insecticidas, desintoxicación de xenobióticos y determinación del sexo, que respalda nuevos conocimientos sobre los mecanismos de resistencia a los insecticidas y nuevos métodos para el control, aunque el ensamblaje actual tiene 47% de brechas, y el análisis de BUSCO indicó un 78% de integridad del genoma. En el 2018, la USDA - Agricultural Research Service, USA, describieron el genoma completo donde describen un tamaño de 1 143.54 MB, depositada en GenBank número GCA_003123925.1 (www.ncbi.nlm.nih.gov).

III. HIPÓTESIS

Las especies de moscas hematófagas que afectan a bovinos de Culiacán, Sinaloa son *Haematobia irritans*.

IV. OBJETIVOS

Objetivo General.

Identificar morfológica y molecularmente a *Haematobia spp* presente en bovinos de Culiacán Sinaloa.

Objetivos Específicos.

Identificar morfológicamente la mosca *Haematobia spp* presentes en bovinos de Culiacán, Sinaloa.

Caracterizar genéticamente a *Haematobia spp* presentes en bovinos de Culiacán, Sinaloa.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1. Localización

La recolección de especímenes se realizó en unidades de producción cooperantes en 3 diferentes sindicaturas como lo son Adolfo López Mateos (El tamarindo) con coordenadas 24°.89 75 91 y -107.630831, Las Tapias 24°. 68 89 65 y -107, 24 70 37, y Tacuichamona 24°. 36 73 92 y -107. 08 22 19, esto con objeto de obtener muestras del norte, centro y sur del municipio. Posteriormente se continuó el trabajo en el laboratorio de parasitología, de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia -UAS, ubicada en la ciudad de Culiacán, Sinaloa, México; geográficamente ubicada en las coordenadas 24° 46' 18.68" latitud Norte y 107°21' 17.22" longitud Oeste, con una altura de 76 msnm, el clima se clasifica como semiseco muy cálido y cálido (BS1(h')), con temperatura media anual de 24.9 °C, con máximas de 45 °C en los meses de julio y agosto, y mínimas de 10 °C en diciembre y enero, la precipitación pluvial anual es de 671.4 mm, con precipitaciones máximas en los meses de julio, agosto y septiembre (INEGI, 2015).

5.2. Tamaño de muestra

El tamaño de muestra se determinó mediante selección intencionada o muestreo por conveniencia siendo esta una técnica de muestreo no probabilístico, quedando el tamaño de muestra a consideración del investigador (Thrusfield *et al.*, 1990)

De las 3 unidades de producción consideradas para este estudio se seleccionaron de cada uno de estos al azar 10 bovinos y en total se recolectaron 86 especímenes que se encontraban sobre ellos.

5.3. Características de las Unidades de Producción

En el estudio se muestrearon a 3 Unidades de Producción Bovina y se presenta en el cuadro 3.

Cuadro 3. Unidades de producción bovina cooperantes

Unidad de Producción	Zona	Sistema de Producción	Finalidad	Raza
El Tamarindo	Norte	Semi-Extensivo	Doble Propósito	Suiz-bú, Simbrah y girolando
La Tapias	Centro	Semi-Extensivo	Carne	Brahman, Simbrah y Brangus
Tacuichamona	Sur	Semi-Extensivo	Doble Propósito	Suiz-bú, Simmental-Fleckvieh y Girolando

5.4. Colección e identificación morfológica de *Haematobia irritans*

La recolección de los especímenes se hizo directamente de los bovinos mediante la red entomológica, una vez capturados se colocaron en los tubos de ensayo estériles mismos que tenían alrededor de 4 mL de alcohol al 70%, se identificaron con plumón indeleble, posteriormente se colocaron en una hielera con refrigerantes para su traslado hacia el laboratorio de parasitología de la FMVZ-UAS.

Una vez en el área de laboratorio se colocaron en una porción de plastilina de color azul (esto con el objetivo de su fácil visualización), posteriormente se colocaron en una caja de Petri para observarse en el microscopio estereoscópico de la marca CARL ZEISS Stemi DV4 MicroImaging GmbH 37081 Göttingen, Germany (la identificación morfológica se hizo mediante claves dicotómicas y características físicas de la especie (Fig. 2 y 3).

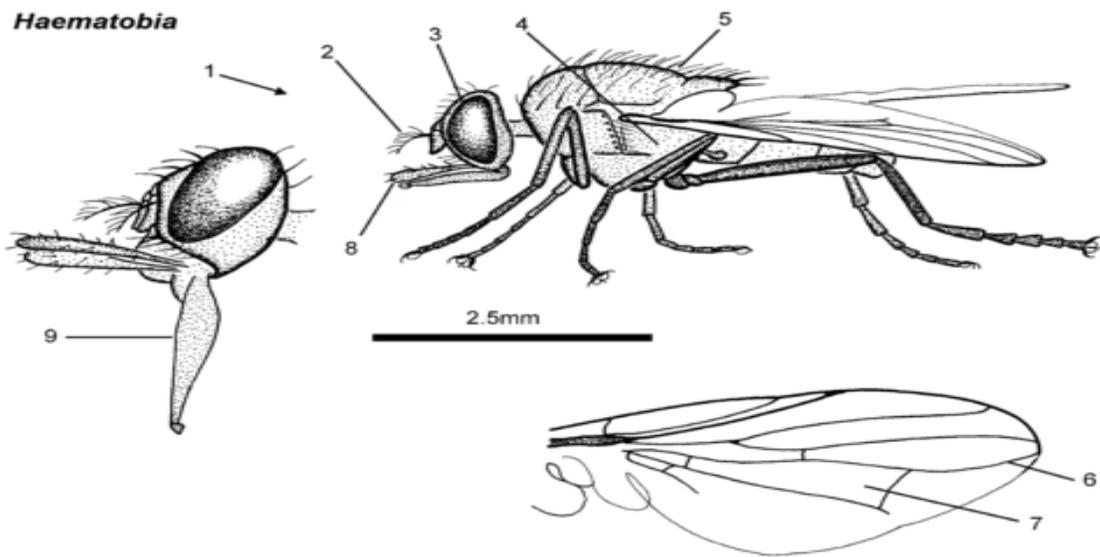


Figura 2. *Haematobia* adulta, lateral. Características del género:

1- Similar a *Stomoxys* pero aproximadamente la mitad de ese tamaño. 2- La antena tiene arista con setas cortas en la superficie dorsal solamente. 3- Los ojos son grandes y rojos / marrones. 4- El tórax tiene un hipopleuron sin una fila de setas gruesas. 5- El tórax y el abdomen son de color marrón claro opaco. 6- El ala tiene la vena 4 que se curva uniformemente hacia el borde inferior externo. 7- El ala tiene una celda discal de forma bastante simétrica, trapezoidal; Las alas se sostienen en ángulo con el cuerpo cuando las moscas se alimentan formando una forma angular reflectante. 8- Los palpos son tan largos como la trompa. 9- Las piezas bucales se proyectan hacia adelante como una trompa única cuando no están en uso.

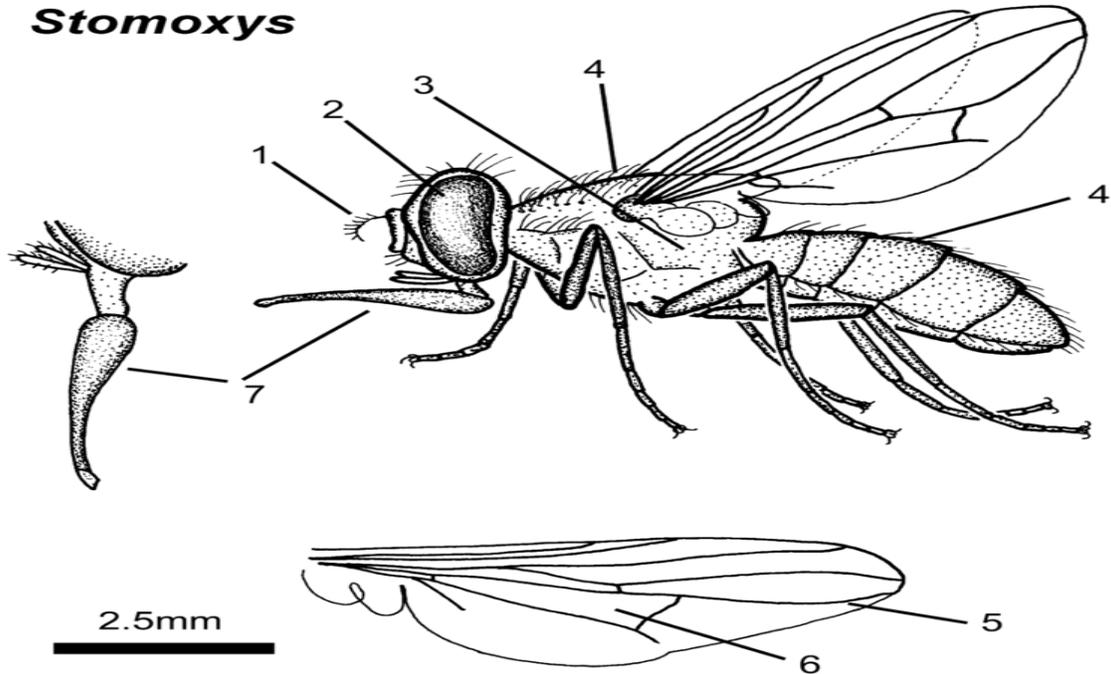


Figura 3. *Stomoxys* adulto, lateral. Características del género.

1- Antena tiene arista con setas cortas en la superficie dorsal solamente. 2- Los ojos son grandes y de color marrón medio. 3- El tórax tiene un hipopleurón sin una fila de setas gruesas. 4- El tórax es de color negro con rayas grises dorsales prominentes; El abdomen tiene un patrón moteado de gris y negro dorsalmente, pero es amarillo pálido ventralmente. 5- El ala tiene la vena 4 que se curva uniformemente hacia el borde exterior más bajo. 6- El ala tiene una celda discal de forma bastante simétrica, trapezoidal. 7- Las piezas bucales se proyectan hacia adelante como una trompa única cuando no están en uso; los palpos son mucho más cortos que la trompa.

5.5. Extracción de DNA

Para la extracción de DNA se colocó el espécimen en tubo eppendorf, se le agregaron 60 μL de EDTA y 250 μL de solución lisis (tris) y fueron colocados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta que coaguló, después se maceró en un mortero con pistilo y se le agregó 250 μL de TE. Una vez macerada la muestra se colocó en tubo eppendorf y se agregó 10 μL de proteinasa K (20 mg/mL), posteriormente se incubó el tubo a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 2 h, transcurrido este tiempo se incubó la muestra a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, después se dejó la muestra a temperatura ambiente por 5 min para posteriormente agitarse en el vortex durante 20 seg, después se colocó la muestra

a -20 °C durante 5 min, después se centrifugó a 13, 000 rpm por 2 min, se extrajo el sobrenadante y se agregó 300 µL de isopropanol y se agitó manualmente 20 veces, así mismo se centrifugó a 13,000 rpm durante 2 min. Una vez centrifugado se separó el sobrenadante y se agregó 300 µL de etanol al 70% y se agitó de manera invertida 20 veces, se centrifugó a 13, 000 rpm durante 2 minutos y se removió el sobrenadante para posteriormente ponerlo a 40 °C en baño maría durante 30 min, después se agregó 50 µL de agua estéril inyectable (Sambrook *et al.*, 1989). La integridad del DNA se verificó a partir de 5 µL de la muestra, se homogenizó con 2 µL de azul de bromo fenol, se colocó en gel de agarosa al 2% teñido con Gelred® (Biotium inc. Hayward, CA 94545 USA) y fue sometido a una diferencia de potencial por medio de una cámara de electroforesis a 80 volts, 250 mA durante 30 min y se observó con una lámpara de luz ultravioleta (Huan *et al.*, 2010). Cada DNA obtenido, fue almacenado a -20°C hasta su posterior utilización.

5.6. Amplificación del gen COI de *H. irritans* por reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se preparó una mezcla de reacción de 25 µL (amortiguador 10X, MgCl₂, dNTPs, H₂O libre de nucleasas, Taq Polimerasa, oligonucleótidos y ADN). La reacción se llevó a cabo en un termociclador (T100TM BioRAD). Los oligonucleótidos utilizados para la amplificación del fragmento del gen COI de aproximadamente 640 pb fueron LCO1490-L (5'-GGTCWACWAATCATAAAGATATTGG-3') y HCO2198-L (5'-TAAACTTCWGGRTGWCCAAARAATCA-3'), Las condiciones incluyeron un primer paso de desnaturalización a 94°C por 2 min, seguido por 30 ciclos a 94°C por 30 s, 58°C durante 30 s para alineamiento y 72°C por 2 min para extensión y un paso final de extensión a 72°C por 5 min (Nelson *et al.*, 2007).

5.7. Secuenciación

Las muestras positivas resultantes de la amplificación por PCR del gen COI, fueron secuenciadas mediante el sistema 3730XL Applied Biosystems®, en la empresa Macrogen inc., Seoul, Korea.

5.8. Análisis *In Silico*.

Se realizó con las secuencias genéticas obtenidas, de cada muestra secuenciada. La corrección de errores de lectura se analizó con el software editor de secuencias Chromas Pro (2.6.6). El análisis de alineamientos múltiples de las secuencias se realizó con los softwares MultAlin (Corpet, 1988) y Clustal Omega. Las secuencias se compararon con las secuencias disponibles en la base de datos del Centro Nacional para la Información de Biotecnología (NCBI) de la Biblioteca Nacional de Medicina de los Estados Unidos (NIH), mediante el programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), (Dantas-Torres *et al.*, 2013). Para el alineamiento de secuencias múltiples y árbol filogenético se utilizó el programa Clustal Omega donde se generaron alineaciones entre las secuencias reportadas en GenBank. Para la confección del árbol filogenético se utilizó el método de NJ (Neighbour Joining) descrito por Saitou y Nei (1987), se realizaron 1000 réplicas de muestras aleatorias con remplazo (bootstrap).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados de la identificación morfológica reflejaron que de las tres unidades de producción incluidas en el estudio y en los bovinos muestreados los especímenes encontrados correspondieron en un 100% a *H. irritans*, observando en ellos las características específicas del díptero (Shinonaga, 1978, Zump 1973) como se muestra en la Figura 4 y 5, palpos maxilares y probóscide relativamente del mismo tamaño y alas membranosas (1,2,3) antena con tres articulaciones que está situada debajo de línea ptilineal (4) (de Freitas y Paolucci, 2018; Mancebo *et al.*, 2001) y ojos dicópticos de color marrón rojizo con tonalidad oscura (5) (Lohmeyer *et al.* 2009).

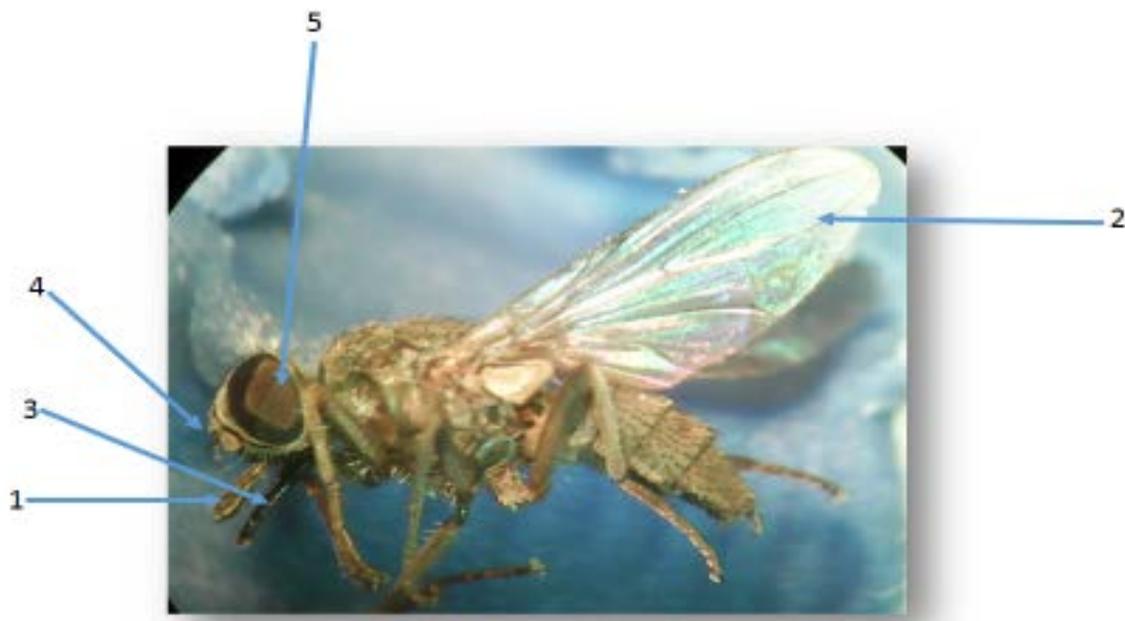


Figura 4. Vista ventral de *H. irritans*.



Figura 5. Vista dorsal de un espécimen de *H. irritans*.

De las unidades de producción incluidas en el estudio se observó una mayor presencia del díptero en los animales de la unidad de producción correspondiente a la sindicatura de Las Tapias (100%). La región anatómica afectada de los bovinos generalmente eran los costados con un 35%, parte ventral en un 45%, extremidades 3%, cuello 10% y cuernos 7% respectivamente y el promedio de moscas por animal fue de 30 en la sindicatura de El Tamarindo, 490 en Las Tapias y 100 en Tacuichamona; de 30 a 490 respectivamente. Esto concuerda con lo observado por Almazán *et al.* (2001) al encontrar en la zona de Soto La Marina Tamaulipas a *H. irritans* de forma continua con ligeras variaciones en el período estudiado y que fue de entre 22 a 296 moscas por animal, donde el mayor número se observó en septiembre y disminuyó en agosto cuando la temperatura se encontró por encima de los 20°C y la precipitación pluvial disminuyó drásticamente.

La mayor presencia del díptero en la unidad de producción perteneciente a la sindicatura de Las Tapias se atribuyen a que en esta localidad se observaron algunas características como la cercanía de otras unidades de producción de bovinos, así como también uno de éstos era centro de acopio y la característica de este predio es que arribaban animales de diferentes procedencias por lo que los

bovinos procedían de manejos sanitarios muy distintos entre sí y coincide con Campos y Mariscal (2014) al reportar que la aplicación irregular de esquemas sanitarios, limitados a tratamientos esporádicos propician condiciones para la mayor presencia de *H. irritans*.

Por el método de fenol-cloroformo obtuvimos 30 muestras de DNA genómico a partir de las moscas y se visualizó en gel de agarosa al 2%, este método resultó adecuado ya que al ser observado por luz ultravioleta las bandas demuestran un DNA de alto tamaño molecular como se indica el DNA genómico de la mosca *H. irritans* es de aproximadamente 1.14 Gb (Konganti *et al.*, 2018). Este DNA se observa íntegro, no exhiben degradación, proteínas o RNA (Figura 6). Estos resultados coinciden con el trabajo que realizaron Fraga *et al.* (2004), donde indican que el método fenol-cloroformo presenta pureza de 1.96% y concentración de 100 mg/kg. Además Konganti *et al.*, (2018) realizaron una biblioteca genómica de *H. irritans*, donde obtuvieron la secuencia del genoma al obtener el DNA genómico con el mismo método de fenol-cloroformo. Low *et al.* (2014), obtuvieron DNA de 15 moscas individuales de *H. irritans* con i-genomic CTB DNA Extraction Mini Kit (iNtRON Biotechnology, Inc., Seongnam, SouthKorea), en donde utilizan el DNA obtenido directamente para el PCR sin comprobar su pureza, sin embargo Betina *et al.* (2000), describieron que la pureza del kit comercial es de 0.84 ± 0.4 , pero con bajo rendimiento.

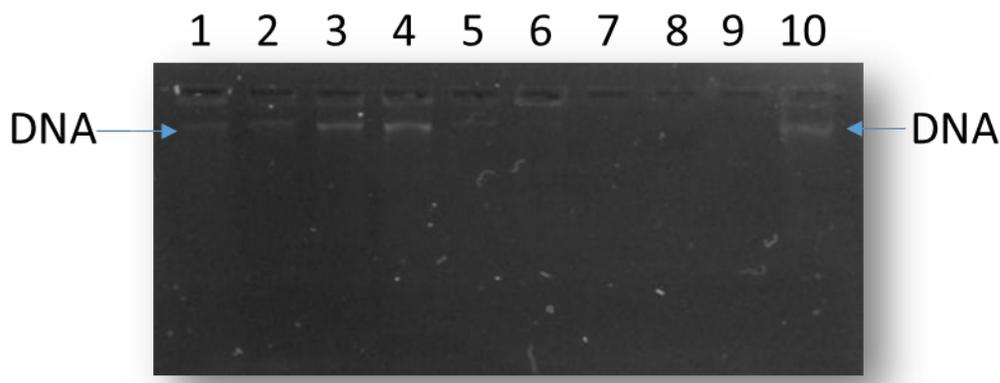


Figura 6. Gel de agarosa al 2 % teñido con GelRed® (Biotium), donde se visualiza: carril 1-6 y 10 DNA genómico de *Haematobia irritans*.

Para ayudar a distinguir las especies de moscas estrechamente relacionadas, el gen COI se ha utilizado predominantemente (Low *et al.*, 2014). En este trabajo, la amplificación del gen COI de *H. irritans* se observó aproximadamente a 640 pb como se observa en la figura 7. El amplicón del gen coincide en el tamaño descrito por Nelson *et al.* (2007) donde amplificaron un fragmento del gen COI de alrededor de 658 pb a partir de 56 especímenes de moscas, sin embargo difiere de Low *et al.* (2014), debido a que amplificaron una región del mismo gen pero con 920 pb, esto debido a que utilizaron diferentes oligonucleótidos y abarca diferente región en del gen mitocondrial.

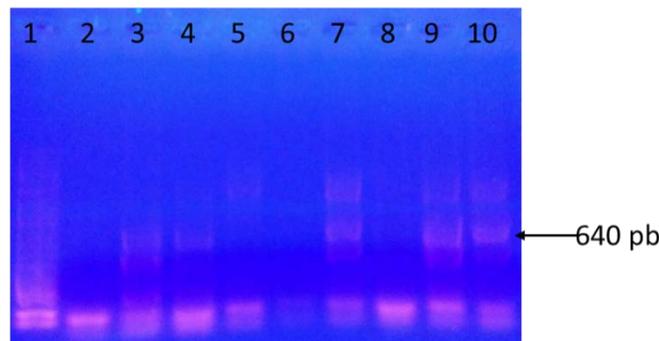


Figura 7. Gel de agarosa al 2% teñido con gel red. Electroforesis del producto de PCR de COI de *H. irritans*, Carril 1: marcador de 1Kb, carril 3, 4, 7, 9 y 10: amplificación del gen aproximadamente a 640 pb.

Se realizaron 3 secuencias a partir de producto de PCR de COI purificado, numerándose como Seq2, Seq3 y Seq4, donde correspondieron a 643 pb, 640 pb y 648 pb, respectivamente, como se observa en el cuadro 4. Las tres secuencias se revisaron y editaron en el programa informático Chromas 2.6.6 (Technelysium Pty Ltd, 2018).

Cuadro 4. Secuencias parciales del gen COI de *H. irritans* de especímenes individuales.

Seq2	TAATCTGAACTTCATTAAGAATTTTGGTTCGAGCTGCAATTAGGACACTCCTGGA GCTTTAATTGGTGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCTCATGCATTTATT ATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATTATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTACTT CCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTT TTGATTACTACCTCCTGCTTTAACATTATTGTTACTAAGCAGTATAGTAGAAAAGG GAGCTGGTACAGGATGAACAGTTTACCCTCCTTTATCATCTAATATTGCTCATGG AGGAGCTTCACTAGATTTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATTTCTTCTAT TTTAGGACCTGTAATTTTATTACACCTGTAATTAATATACGAGCTACTGGAATTA CATTTGATCGAATACCTTTATTTGCATGATCTGTTGTAATTACTGCATTATTATTAC TTTTATCTTTACCAGTATTAACTGGATCTATTACTATATAATTAAGTATCCGAAAT TTAAATACTTCATTCTTTGATCCATCCGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAACA TTATTTTGATTTTTTGGACATCC
Seq3	ATAATTGAACTTCATTAAGAATTTTAATTCGAGCTGAATTAGGACATCCTGGAGCT TTAATTGGTGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCTCATGCATTTATTATA ATTTTCTTTATAGTTATACCTATTATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGTTCCCT TTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTTTTTG ATTACTACCTCCTGCTTTAACATTATTGTTACTAAGCAGTATAGTAGAAAAGGGAG CTGGTACAGGATGAACAGTTTACCCTCCTTTATCATCTAATATTGCTCATGGAGG AGCTTCACTACATTTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATTTCTTCTATTTTA AGAGCTGTAATTTTATTACAAGTGAATTAATATACGAGCTACTGGAATTACATTT GATCGAATACCTTTATTTGCATGATCTGTTGTAATTACTGCATTATTATTACTTTTA TCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATATTATTAAGTACCGAAATTTAAAT ACTTCATTCTTTGATCCAGCTGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAACATTTATT TTGATTTTTTGGACAGCC
Seq4	TGGATAATTGGAACCTTCATTAAGAATTTTAATTCGAGCTGAATTAGGACATCCTGG AGCTTTAATTGGTGATGATCAAATTTATAATGTAATTGTTACAGCTCATGCATTTAT TATAATTTTCTTTATAGTTATACCTATTATAAATTGGAGGATTTGGAAATTGATTAGT TCCTTTAATATTAGGAGCTCCTGATATAGCATTCCCTCGAATAAATAATATAAGTT TTTGATTACTACCTCCTGCTTTAACATTATTGTTAGTAAGCAGTATAGTAGAAAAG GGAGCTGGTACAGGATGAACAGTTTACCCTCCTTTATCATCTAATATTGCTCATG GAGGAGCTTCACTAGATTTAGCTATTTTTTCTTTACATTTAGCTGGAATTTCTTCTA TTTTAGGAGCTGTAATTTTATTACAAGTGAATTAATATACGAGCTACTGGAATTA CATTTGATCGAATACCTTTATTTGTATGATCTGTTGTAATTACTGCATTATTATTAC TTTTATCTTTACCAGTATTAGCTGGAGCTATTACTATATTATTAAGTATCCGAAAT TAAATACTTCATTCTTTGATCCAGCAGGAGGAGGAGATCCAATTTTATATCAACAT TTATTTTGATTTTTTGGACATCCAAA

Para establecer la identidad de los genes, se analizaron las tres secuencias (Seq2, Seq3 y Seq4) utilizando la herramienta básica de búsqueda de alineación local (BLAST) de la base de datos del banco de genes (GenBank) donde la Seq2 corresponde a una secuencia parcial de 643 pb, con una identidad del 97.6 % con una secuencias del gen Citocromo-C-oxidasa (COI) subunidad 1 de *Haematobia irritans irritans* depositada en la base de datos del banco de genes GenBank (KJ470639.1) y un 94.5 % de identidad con la secuencia del mismo gen registrado para *H. irritans exigua* (KC960693.1). Comparada con otras especies de dípteros,

la secuencia Seq2 registró una identidad entre el 88.6 y 89.2 % (KU932138.1, EU627715.1, JX861430.1, KR921622.1).

La Seq3 corresponde a una secuencia parcial de 640 pb, con una identidad del 98.1 % con una secuencias del gen Citocromo-C-oxidasa (COI) subunidad 1 de *Haematobia irritans irritans* depositada en la base de datos del banco de genes GenBank (KJ470639.1) y un 97 % de identidad con la secuencia del mismo gen registrado para *H. irritans exigua* (KC960693.1). Comparada con otras especies de dípteros, la secuencia Seq3 registró una identidad entre el 90.1 y 90.8 % (KU932138.1, EU627715.1, JX861430.1, KR921622.1).

La Seq4 corresponde a una secuencia parcial de 648 pb, con una identidad del 99.7 % con una secuencia del gen Citocromo-C-oxidasa (COI) subunidad 1 de *Haematobia irritans* (JF872366.1) y un 99.6 % con *Haematobia irritans irritans* (KJ470639.1), depositadas en la base de datos del banco de genes GenBank. Comparativamente con secuencias del mismo gen registrado para *H. irritans exigua* (KC960693.1), la identidad es del 98 %. Respecto a otras especies de dípteros, la secuencia Seq4 registró una identidad de 91.8 % con *Hydrotaea parva* (KU932138.1), 92.2 % con *Hydrotaea chalcogaster* (EU627715.1), 92 % con *Hydrotaea armipes* (JX861430.1) y 92.14 % con *Chrysomya nigripes* (KR921622.1).

Las secuencias de genes de *Haematobia irritans* que se encuentran depositadas en GenBank (www.ncbi.nlm.nih.gov), del gen COI posee 76 secuencias que van desde 237 a 2 272 pb, para la realización del árbol filogenético se utilizaron 8 de mayor homología, observándose la filogenia de poblaciones, donde separó las secuencias correspondientes a *H. irritans* en tres clados principales, los cuales pertenecen a tres continentes, Asia, Europa y América, quedando el primer clado con un grupo con 4 secuencias de Asia, 1 de Europa y 1 de América mostrando una estrecha relación filogenética, en un segundo clado se obtuvo una estrecha relación entre las tres secuencias realizadas en Culiacán con una obtenida de Asia, por último una secuencia separada de ambos grupos perteneciente a América (Figura 8). A pesar de no tener una delimitación hacia el continente, hace

suponer que la secuencia obtenida confirma la identidad de las moscas al pertenecer al género *Haematobia irritans*.

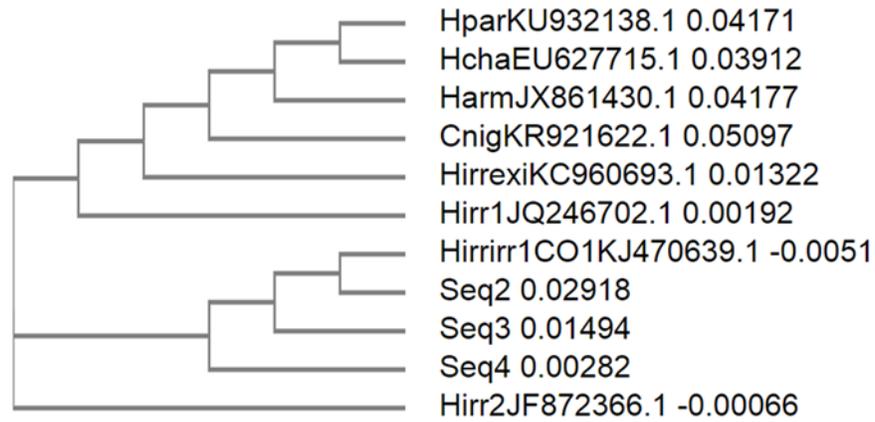


Figura 8. Árbol filogenético basado en secuencias parciales del gen COI sub-1 de distintas especies de dípteros muscoideos registrados en la base del banco de genes (GenBank) usando el método Neighbor-Joining.

Clustal O 1.2.4 HparKU932138.10.04171 Polonia (Europa), HchaEU627715.1 China (Asia), HArmJX861430.1 Korea (Asia), CnigKR921622.1 Tailandia (Asia), HirrexiKC960693.1 Tailandia (Asia), Hirr1JQ246702.1 Brasil (América), Hirr1CO1KJ470639.1 Malasia (ASIA), Hirr2JF872366.1 Canadá (América), Seq2 0.02918, Seq3 0.01494, Seq4 0.00282 Culiacán (América).

El análisis de secuencias COI muestra las distancias genéticas entre secuencias de *Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans* y *Musca domestica*, pero las distancias relativas entre pares de especies coinciden altamente (de Oliveira *et al.*, 2005). Las distancias genéticas de *H. irritans* entre *H. irritans irritans* y *H. irritans exigua*, es muy pequeña y la divergencia de la secuencia también, el gen COI muestra 1.47–2.08% de diferencia genética entre *H. irritans* y *H. exigua*, y con base citocromo oxidasa I y II (COI y COII) son 1.8–1.9% (Low *et al.*, 2014).

VII. CONCLUSIÓN

Se concluye que la presencia de *H. irritans* predomina en los bovinos de la región analizada y la estrecha relación filogenética entre las tres secuencias de Culiacán con la de Asia, confirma una heterogeneidad en los distintos continentes, confirmándose su identidad en la pertenencia al género *Haematobia irritans*.

Se identificó la presencia de la mosca *H. irritans* en bovinos de Culiacán, Sinaloa, indicando que las tres secuencias de Culiacán obtenidas poseen una identidad elevada y presenta una estrecha relación filogenética con su pertenencia en el género *Haematobia irritans*.

VIII. LITERATURA CITADA

- Alier Fuentes Castillo, Yuniel Hernández Rodríguez, Dalia Quintana Torrente, Rafmary Rodríguez Fernández, Luis Méndez Mellor. 2016. Dinámica poblacional de la mosca *Haematobia irritans* (Linnaeus 1758) (Diptera: Muscidae) en Cuba Rev. Salud Anim. Vol. 38 No. 3 (sep.-dic. 2016): 137-141 ISSN: 2224-4700
- Almazán G.C., Castillo S.S., Loredó O.J., García V.Z. Vet. Méx., 32 (2) 2001. Dinámica poblacional de *Haematobia irritans* en un hato de bovinos de Soto la Marina, Tamaulipas, México.
- Anziani, O. S. 2013. Mosca brava *Stomoxys calcitrans*, biología, importancia económica, aspectos epidemiológicos y tendencias estacionales en el área central de la Argentina, control. Guía para el control de los parásitos externos en bovinos de carne del área central de la Argentina. Disponible en <https://inta.gov.ar/> accesada febrero de 2016.
- Anziani, O. S. y A. G. Suarez. 2017. Guía para el control de los parásitos externos en bovinos de leche del área central de la Argentina. Disponible en <http://rafaela.inta.gov.ar/> Accesada junio de 2018.
- Aristizábal-Botero A, Groot H, Ginna Paola Camacho GP, Realpe E, Paredes M. 2016. Análisis de las secuencias citocromo oxidasa I y espaciadores ribosomales transcritos internos (ITS I y II y 5.8S) para la identificación de especies de interés forense. Entomología mexicana. 3:695-706.
- Aubry, P. and D. W. Geale. 2010. A Review of Bovine Anaplasmosis, Transboundary and Emerging Diseases. (58): 1-30.
- Benson, G., T. Ho., A. Thornton, and T. Wilson. 2014. Population survey of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) on cattle in sale barn in Navasota, Texas. Instars. (1): 1-6.
- Bettina L., Aguirre M., Gorodner J. 2000. Comparación de técnicas de extracción de ADN para la detección de tripanosoma cruzi mediante la técnica de PCR. Comunicaciones científicas y tecnológicas.

- Broce, B. A., J. Hogsette and S. Paisley. 2005. Winter feeding sites of hay in round bales has major developmental sites of *Stomoxys calcitrans* (Diptera: Muscidae) in pastures in spring and summer. *J. Econ. Entomol.* 98 (6): 2307-2312.
- Campos C.Y. y Mariscal P.C.A. 2014. Frecuencia de infestación por *haematobia irritans* (I) en bovinos de predios ganaderos, casarabe, provincia cercado, Beni Bolivia 2014. *Agrociencias Amazonia*, Número 4: 37-43.
- Carlos Cruz-Vázquez * Jorge Bautista Hernández * Irene Vitela Mendoza * Miguel Ramos Parra * Ma. Teresa Quintero Martínez ** Zeferino García Vázquez. 2000. Distribución anual de *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) en tres establos lecheros de Aguascalientes, México. *Vet. Méx.*, 31 (3).
- Cicchino A, Abrahamovich A, Torres A, Núñez A, Prieto, O. Mosca de los cuernos, *Haematobia irritans* (Linnaeus, 1758), (Diptera: Muscidae). Contribuciones para su conocimiento en la Argentina. I: aspectos morfológicos básicos. *Rev Med Vet* 1983; 75:170-186.
- Cruz, V. C., B. J. Hernandez., M. I. Vitela., P. M. Ramos., M. M. T. Quintero y V. Z. García. 2000. Distribución anual de *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae) en tres establos lecheros de Aguascalientes, México. *Veterinaria México*. 31 (3): 1-7.
- De Campos, P. M. 2018. The veterinary parasitology images gallery, Arthropoda: Insecta and Acari. Disponible en <http://www.icb.usp.br> Accesada febrero 9 de 2018.
- de Oliveira TM, Lima de Azeredo-Espin AM, Lessingerdna AC. 2005. Evolutionary and structural analysis of the cytochrome c oxidase subunit I (COI) gene from *Haematobia irritans*, *Stomoxys calcitrans* and *Musca domestica* (Diptera: Muscidae) mitochondrial. *DNASequences*. 16(2): 156–160.
- Fitzpatrick, D. and P. E. Kufman. 2011. Horn fly *Haematobia irritans irritans* (Linnaeus) (Insecta: Diptera: Muscidae). Disponible en <http://entnemdept.ufl.edu> Accesada febrero 9 de 2018.
- Foil, L .D. and J. A. Hongsette. 1994. Biology and control of tabanids, stable flies and horn flies. *Rev. Sci. Tech. Off. Int., Epiz.* 13. (13): 1125-1158.

- Fraga, N.J., Rodríguez, J., Fuentes, O., Castex, M., Fernández, C. 2004. Comparación entre 5 métodos para la extracción de ADN de tiratomíneos: su utilización en la técnica de ADN polimórfico amplificado al azar. *Rev. Cubana med trop.* 56 (3): 2008 – 13.
- Grisi L, Leite RC, Martins JRS, Barros ATM, Andreotti R. 2014. Reassessment of the potential economic impact of cattle parasites in Brazil. *Braz. J. Vet. Parasitol.* 23(2):150–156.
- Guglielmone, A. A., M. M. Volpogni, H. Castro, A. J. Mangold, and O. S. Anziani. 2002. A study of relative horn fly, *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae), abundance on Holstein steers and steers of two Holstein crosses. *Vet. Parasitol.* 109. 141-145.
- Harris, M. 2003. *Haematobia irritans*, Animal Diversity Web. Disponible en <http://animaldiversity.org> Accesada febrero 9 de 2018.
- https://en.wikibooks.org/wiki/Parasitic_Insects,_Mites_and_Ticks:_Genera_of_Medical_and_Veterinary_Importance/Houseflies_and_similar
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=haematobia+irritans>
- <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/?term=haematobia+irritans>
- Huang, Q., Baum L, Fu WL, 2010. Simple and Practical Staining of DNA with GelRed in Agarose Gel Electrophoresis. *Clin Lab* 56: 149 – 152. DOI: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20476647>
- INEGI. 2015. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Marco Geoestadístico Nacional. Disponible en <http://www.inegi.org.mx/geo/contenidos/geoestadistica/catalogoclaves.aspx> Accesado el 15 septiembre de 2015.
- Institute
- Iwasa, M. And N. Ishiguro. 2010. Genetic and morphological differences of *Haematobia irritans* and *H. exigua*, and molecular phylogeny of Japanese Stomoxyini flies (Diptera: Muscidae). *Med. Entomol. Zool.* 61 (4): 335-344.
- Konganti K, Guerrero FD, Schilkey F, Ngam P, Jacobi JL, Umale PE, Perez de Leon AA, Threadgill DW. 2018. A Whole Genome Assembly of the Horn Fly,

- Haematobia irritans, and Prediction of Genes with Roles in Metabolism and Sex Determination. *G3 Genes/Genomes/Genetics*. 8:1675-1686.
- Lohmeyer, H. K., D. M. Kamlah, and J. H. Pruett. White eye color mutant in *Haematobia irritans* (DIPTERA: MUSCIDAE)
- Low VL, Tan TK, Lim PE, Nogueira-Domingues L, Tay ST, Lian-LimYA, Goh TG, Panchadcharam C, Bathmanaban P, Sofian-Azirun M. 2014. Use of COI, CytB and ND5 genes for intra- and inter-specific differentiation of *Haematobia irritans* and *Haematobia exigua*. *Veterinary Parasitology*. 204: 439–442.
- Mavoungou, J. F., P. Jay-Robert, J. Guilles, A. Atsame Eda and G. Duvallat. 2008. Ecology of *Stomoxys* flies (Diptera: Muscidae) in Gabon. I. First survei in different ecological areas. *Parasite*. (15): 27-34.
- Mitsuhiro IL y Naotaka IH. 2010. Genetic and morphological diferences of *Haematobia irritans* and *H. exigua*, and molecular phylogeny of Japanese *Stomoxysi* flies (Diptera, Muscidae). *Med Entomol Zool*. 61(4):335-344.
- Nelson LA, Wallman JF, Dowton M. 2007. Using COI barcodes to identify forensically and medically important blowflies. *Medical and Veterinary Entomology*. 21: 44–52.
- Nihei, M. S. S. and M. C. Domínguez. 2008. Biodiversidad de artrópodos argentinos, MUSCIDAE. Vol 2: 319-328.
- Picard CJ, Johnston JS, Tarone AM. 2012. Genome Sizes of Forensically Relevant Diptera. *J Med Entomol*. 49(1): 192-197.
- Pitzer, B. J. 2010. The ecology of stable flies (Diptera: Muscidae) associated with Rengifo , G. P. 2004. Enfermedades infecciosas endémicas en el Perú transmitidas por dípteros hematófagos. *Ciencia e Investigación*. VII (2): 54-57.
- Riley, C.V. The horn-fly. *Insect Life* 2: 93-103, 1889
- Romano A. 1991. La mosca de los cuernos (*H. irritans*) un serio peligro que amenaza nuestra ganadería. *Clínica y Producción Veterinaria* 4: 8-10.
- Rosales M. And Huerta C. 2013. Hacia una ganadería sustentable, Estudio de caso: Jilotepec, Veracruz.

- Saitou N, Nei M. The neighbor – joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987; 4: 406 - 425
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2da Edition, Cold spring harbor laboratory press.
- Schmidt D,Ch and Kunz E,S. 1978. *Haematobia irritans*. *Handbook of Insect Rearing 2*: 113-117.
- Solórzano, A. J. 2014. Manejo integrado de la mosca de establo *Stomoxys calcitrans* en Costa Rica. INTA Costa Rica. *Innovación Tecnológica*. 1-15.
- Thrusfield, M. 1990. *Epidemiología veterinaria*. ACRIBA, S. A. Zaragoza, España. 192-193.
- Tolrá Hjorth, A. M. C. 2015. Clase Insecta Orden Diptera. *Rev Ide@-sea*. 63, 1-22
- Torres L, Almazán C, Ayllón N, Galindo RC, Rosario-Cruz R, Quiroz-Romero H, Gortazar C, de la Fuente J. Identification of microorganisms in partially fed female horn flies, *Haematobia irritans*. *Parasitol Res.* 2012;111(3):1391-1395.
- Torres L, Consuelo Almazán C, Ayllón N, Galindo RC, Rosario-Cruz R, Quiroz-Romero H, de la Fuente J. 2011. Functional genomics of the horn fly, *Haematobaiirritans* (Linnaeus, 1758). *BMC Genomics*. 12:105-119.
- Williams E.R., Hall D.R., Broce B.A. and Scholl J.L. 1985. *Livestock Entomology* John Wiley & Sons. 335.
- Younger, C. D. 2011. A study of horn fly, *Haematobia irritans* (L.) (Diptera: Muscidae), target-site sensivity, susceptibility, and resistance management at selected sites in Lousiana. Ph. D. LSU Doctoral Dissertations. Lousiana State University and Agricultural and Mchanical College. Lousiana, E.E.U.U.
- Zhang, Z. Q. 2013. Phylum Arthropoda. *Zootaxa*. 3703 (1): 017-026.