



Producción in vitro e in vivo de "moscas de los cuerno" (*Haematobia irritans irritans*) para trabajos experimentales.

Anastasia V¹; Balducci, M¹; Bolatto C²; Santos M¹; Abad L.¹; Alonzo P.¹; Basso A.³; Breijo M.^{1,4}

Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación, Facultad de Medicina, UdeLAR. ² Departamento de Histología y Embriología, Facultad de Medicina, UdeLAR. ³ Cátedra de Genética, Facultad de Agronomía Universidad de Buenos Aires. ⁴ Departamento de Ciencias Microbiológicas, Facultad de Veterinaria UdeLAR

Resumen

La mosca de los cuernos es un parásito hematófago de distribución mundial que afecta principalmente al ganado bovino causando importantes pérdidas económicas. Si bien en nuestro país no existen números claros sobre los perjuicios ocasionados por esta plaga, en EUA se considera que esta parasitosis genera pérdidas anuales por 1 billón de dólares (Cupp M *et al* 2004). En la actualidad su control esta basado en el uso de insecticidas, los cuales generan resistencia y contaminan el medio ambiente. Para el desarrollo de estrategias de control alternativas es necesario investigar sobre la biología del insecto. El presente trabajo presenta los avances en la instrumentación de un ciclo cerrado de producción (*in vitro e in vivo*) de *Haematobia irritans* con fines experimentales en Uruguay. Esta herramienta permitirá a investigadores de la región disponer de diferentes estadios del insecto y de un sistema de evaluación de productos antiparasitarios.

Introducción

La mosca de los cuernos (*H. irritans irritans*) es un parásito hematófago, de distribución mundial que en altas cargas puede causar en los bovinos un importante stress, generando así pérdidas en la ganancia de peso, en la producción lechera y disminuyendo la calidad de los cueros obtenidos. También es importante considerar su rol como vector de enfermedades virales, bacterianas y parasitarias (Webster *et al*; 1992). Se ha descrito su rol en la transmisión de *Stafilococcus aureus*, un agente causal importante de mastitis en vacas lecheras (Owens WE *et al*, 1998) así como en la transmisión de nematodos (*Stephanofilaria stiles*) que dañan el cuero (Hibler CP, 1966). Esta mosca es originaria de Europa e ingresó a América del Sur a través de Venezuela y Colombia en la década del 30, diagnosticándose en Argentina y Uruguay en 1991. Este insecto tiene un tamaño de 2 a 3,5 mm donde se destaca su gran aparato succionador, con una probóscide picadora/chupadora la que utiliza para succionar sangre. Su ciclo biológico involucra los siguientes estados: huevo - larva - pupa y adulto (macho y hembra). Mientras los adultos permanecen mayoritariamente sobre el hospedero, el resto del ciclo ocurre en las heces de los bovinos. Su control es muy difícil y está basado en el uso de insecticidas para los cuales rápidamente la mosca genera resistencia. Como método de control alternativo sería deseable el desarrollo de vacunas que reduzcan la capacidad del parásito de alimentarse correctamente y por consiguiente privarlos del equilibrio necesario para su mantenimiento y reproducción. El mantenimiento del ciclo de la mosca de los cuernos en condiciones de laboratorio, es vital para el desarrollo de trabajos experimentales. Este sistema per-

mite desarrollar trabajos de investigación fundamental (estudios genéticos, fisiología y patología de los insectos, inmunología) y de investigación aplicada (desarrollo de vacunas y control de potencia de insecticidas).

El presente trabajo muestra la implementación de un sistema de producción con el fin de obtener estos insectos en condiciones controladas.

Materiales y Métodos

Mantenimiento de insectos de vida libre, puesta de huevos y producción de pupas. Los procedimientos de captura de moscas se realizaron en bovinos del Campo Experimental del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina situado en la ruta 82 km 46, Empalme Olmos, Canelones. Los insectos capturados son anestesiados con CO₂ y colocados en jaulas de 13cm alto, 8cm ancho y 8cm de profundidad. Son alojados en estufa de fotoperíodo a 25 °C, con 12 hs ciclo luz /oscuridad. Para su alimentación, se le administra sangre bovina citrada 2 veces/día y solución de azúcar al 10%.

El éxito de la cría de larvas y pupas depende de la calidad del medio de cultivo de larvas, la temperatura y humedad ambiente. Ensayamos dos métodos de cultivo larvas a) el primero colocamos directamente los huevos de moscas sobre heces frescas, y b) el segundo los huevos los colocamos en una mezcla de heces bovinas previamente congelada por 48 hs para eliminar larvas de otros insectos, cáscara de arroz y una mezcla seca que contiene alfalfa, harina de carne y harina de trigo (descrito por Okine, 1991). Luego de la siembra de huevos el medio se mantiene durante 8 días a 25°C durante este período se forman los distintos estadios larvarios hasta alcanzar el de pupa. A partir del octavo día se cosechan las pupas, utilizando un método de flotación. Las pupas cosechadas son lavadas y secadas para estar prontas para su eclosión.

Es posible refrigerarlas para retrasar su desarrollo. Para ello las pupas son mantenidas a 4°C. Para estudiar la viabilidad de las mismas se analizó el porcentaje de sobrevivencia a lo largo del tiempo.

Mantenimiento y reproducción de insectos nacidos en el laboratorio. Para la eclosión de las moscas, las pupas son colocadas en las jaulas recipientes en la estufa de fotoperíodo. Entre las 48 y 96 hs nacen *Haematobias*. Las mismas tienen 2 destinos

A - Ensayos de mantenimiento y reproducción *in vitro*

B.- Liberadas a bovino estabulado en instalaciones libres de moscas. Brevemente, un bovino Hereford, de 8 meses de edad es mantenido en un establo cerrado al ingreso de insectos, de 16 m², con ciclo luz oscuridad 12/12. Las moscas emergidas o capturadas son liberadas para que infesten el bovino. Diariamente las heces del bovino son recogidas para la producción de pupas.

Resultados

Mantenimiento de insectos de vida libre, puesta de huevos y producción de pupas.

Alimentando los insectos con sangre bovina citratada y solución de azúcar al 10% dos veces al día, la sobrevivencia de los insectos capturados es de 8 días. El 90% de la postura de los huevos se realiza en las primeras 48 hs post captura. Estos pueden ser recogidos directamente sobre un film de PVC, o sembrados directamente sobre las heces o el medio de cultivo de larvas. Mantenido el cultivo a 25°C, al 8 día post siembra se recuperan las pupas de las heces. El estudio comparativo de los rendimientos en las cosechas de pupas utilizando heces bovinas frescas y medio de cultivo de larvas (descrito por Okine J) se describe en la figura 1. Con el fin de estudiar la posibilidad de generar un stock de pupas a 4 °C se estudio la sobrevivencia de las pupas mantenidas en estas condiciones. La figura 2 describe el porcentaje de eclosión de pupas luego de diferentes tiempos de mantenimiento de heladera.

Mantenimiento y reproducción de insectos nacidos en el laboratorio.

Hasta el momento no hemos podido lograr la fecundación de las hembras en cautiverio, por tal razón se ha utilizado una metodología alternativa basada en estabular un bovino. De esta forma se logro cerrar la producción de moscas en cautiverio al recuperar huevos de las moscas producidas *in vitro*.

Nº pupas

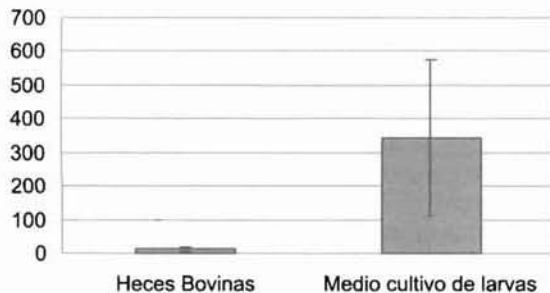


Fig 1. Número promedio de pupas recolectadas utilizando heces frescas y un medio de cultivo de larvas (Okine J.). Obsérvese el incremento en la producción promedio de nº de pupas en la preparación.

% eclosión

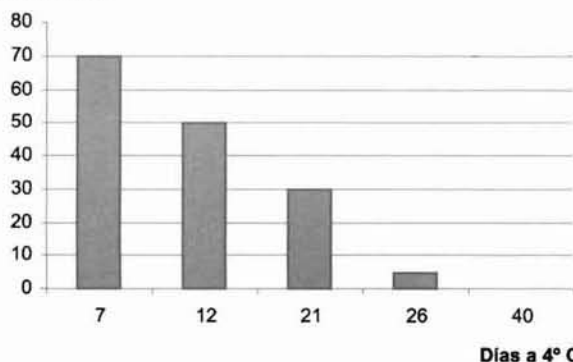


Fig 2. Porcentaje de eclosión de pupas mantenidas a 4°C. Pupas mantenidas por diferentes períodos de tiempo fueron colocadas en estufa a 25°C para su eclosión. Se observa una importante caída en el porcentaje de eclosión a lo largo del tiempo

Discusión

A partir de este trabajo se cuenta con un sistema de producción de *Haematobia irritans* en forma controlada. Esta herramienta permitirá en primera instancia ofrecer a los investigadores, insectos en diferentes etapas de desarrollo para investigación básica y aplicada. En la actualidad, este sistema aporta reactivos a dos proyectos en desarrollo, el primero, busca encontrar antígenos que puedan ser utilizados como vacunas para bovinos y controlar su carga parasitaria (Proyecto INIA FPTA 224). El segundo, se basa en el estudio de extractos vegetales con capacidad insecticida.

Summary

The horn fly (*H. irritans irritans*) is a blood-feeding parasite distributed world-wide. It is one of the most serious and injurious pests of cattle. Our country has no studies evaluating the economic impact of the horn fly infection on the cattle production, but in USA the losses caused by the parasite are estimated to total 1 billion dollars per year (Cupp M et al 2004). To control the cattle infection by the horn fly, the producers use chemical control measures. This practice has two main disadvantages: the flies develop a resistance to the insecticides, and the chemicals are a powerful contaminant of the environment. To develop non contaminant control approaches that target the physiology of the fly, we need to understand the biology of the insect. At the same time, it is important to have the parasite as a reactive, ready to use throughout the year. The aim of this study is to demonstrate some of the knowledge that we have to reproduce the entire life cycle of the fly in a controlled condition (*in vitro* e *in vivo*). This information will be important to obtain different insect stages for regional research work, and to create a system for evaluation of anti-parasite products.

Referencias

- Cupp MS, Cupp EW, Navarre C, Wisnewski N, Brandt KS, Silver GM, Zhang D, Panangala V. (2004). *Vaccine*. 22:2285-97
- Hibler CP. *J Parasitol*. 1966 Oct;52(5):890-8.
- Okine J. S., 1991 Aspects of oogenesis in the Horn Fly . Tesis de Maestría de la Universidad de Florida
- Owens WE, Oliver SP, Gillespie BE, Ray CH, Nickerson SC. *Am J Vet Res*. 1998 Sep;59(9):1122-4.