

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**“DETECCIÓN DEL VIRUS DE LEUCOSIS BOVINA ENZOOÓTICA EN LA
MOSCA HAEMATOBIA IRRITANS (MOSCA DEL CUERNO) POR LA
TÉCNICA DE PCR”**

por

Ana GARCÍA CUMMINS

Valentina Inés HERRERA COSTABEL

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

2016

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa:

Nombre completo y firma

Segundo miembro (Tutor):

Dr. Carlos Morón

Tercer miembro:

Nombre completo y firma

Fecha:

Autores:

Ana García Cummins

Valentina Inés Herrera Costabel

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al Dr. Carlos Morón y la Dra. Helena Guarino, por permitirnos realizar este trabajo y trabajar junto con ellos en este proyecto.

Al proyecto CSIC de Fomento de la Investigación de Calidad en Salud Animal por financiarnos este proyecto.

Al personal de Biblioteca, por su continua ayuda y paciencia.

A nuestras familias y amigos por el apoyo incondicional durante la carrera.

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN	2
AGRADECIMIENTOS.....	3
1. RESUMEN.....	7
2. SUMMARY	8
3. INTRODUCCIÓN.....	9
4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	11
4.1. DESCRIPCIÓN DEL AGENTE	11
4.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD	11
4.2.1. SITUACIÓN EN URUGUAY	11
4.3. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	14
4.3.1 ROL DE LA TRANSMISIÓN DE VIRUS POR VECTORES ARTRÓPODOS Y EFECTOS QUE CAUSAN SOBRE EL GANADO	16
4.4. PATOGENIA.....	21
4.5. SIGNOS CLÍNICOS	22
4.6. DIAGNÓSTICO.....	23
4.7. CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD.....	27
4.8. ANTECEDENTES DE LA MOSCA DEL CUERNO.....	29
4.8.1. IMPACTO ECONÓMICO:	29
4.8.2. CICLO BIOLÓGICO Y HÁBITOS DE LA MOSCA DEL CUERNO:	30
4.9. CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA MOSCA.....	32
5. HIPÓTESIS	34
6. OBJETIVOS.....	34
6.1. OBJETIVO GENERAL:.....	34
6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	34
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	34
7.1. ANIMALES:.....	34
7.2. MUESTRAS DE SANGRE:	35
7.3. MUESTRAS DE MOSCAS:.....	35
7.4. EXTRACCIÓN DE ADN:.....	35
7.4.1. A PARTIR DE SANGRE ENTERA.....	35
7.4.2. A PARTIR DE LAS MOSCAS.....	36
7.5. PCR - ANIDADO:.....	36
7.6. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS	37
8. RESULTADOS	39

8.1.	PCR EN MUESTRAS DE SANGRE DE VACAS.....	39
8.2.	PCR EN MUESTRAS DE MOSCAS	41
9.	DISCUSIÓN.....	43
10.	CONCLUSIONES.....	47
11.	LISTA DE PROVEEDORES.....	48
12.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	49

LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

Página

Figuras

Figura 1. Resultados de PCR de sangre de vacas (muestras n°1 a n°10).....	40
Figura 2. Resultados de PCR de sangre de vacas (muestras n°11 a n°19, control positivo y negativo).....	40
Figura 3. Resultados de PCR de moscas (muestras n°1 a n°11).....	42
Figura 4. Resultados de PCR de moscas (muestras n°12 a n°19, control positivo y negativo).....	42

Cuadros

Cuadro 1. Ganado lechero exportado en pie en los últimos años.....	13
Cuadro 2. Secuencias, ubicación y tamaño de los amplificadores según los cebadores utilizados en el PCR anidado.....	38
Cuadro 3. Resultados obtenidos por la técnica de PCR en las muestras sanguíneas analizadas según identificación del animal.....	39

1. RESUMEN

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad infecciosa producida por un retrovirus llamado Virus de la Leucosis Bovina (VLB) perteneciente a la familia *Retroviridae*. Esta enfermedad fue diagnosticada por primera vez en el Uruguay en la década del 70, siendo una de las principales barreras sanitarias para el país en materia de comercio exterior. Se evidencia que es una enfermedad ampliamente difundida por todo el país, siendo un grave problema fundamentalmente para la lechería. La mayoría de los animales infectados aparentan ser sanos, evidenciándose solamente una seroconversión frente al virus, siendo que solo un bajo porcentaje de ellos desarrolla la forma tumoral letal. La transmisión ocurre de forma horizontal y en menor medida (15%) de forma vertical. En la transmisión horizontal es importante la transmisión de sangre de un animal infectado, estando implicadas principalmente las prácticas veterinarias (extracción de sangre, vacunación, descorne, castración, etc.) como los insectos hematófagos.

El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia del provirus de la LBE en la *Haematobia irritans* (mosca del cuerno) a través de la técnica de laboratorio PCR anidado (Reacción en Cadena de la Polimerasa). Se escogió esta especie por ser un insecto hematófago y porque vuela de un animal a otro, pudiendo ser un posible vector de enfermedades infecciosas. A su vez, se empleó la misma técnica para detectar el ADN proviral de LBE en sangre de vacas anteriormente positivas a ELISA. Se muestreó un total de 19 vacas (n=19), de las cuales se tomó una muestra de sangre de cada una y las moscas que tenían sobre sus respectivos lomos. De las muestras de sangre analizadas 13 resultaron positivas a VLB por PCR; y de las muestras de moscas, dos de ellas dieron positivo. Las muestras positivas de moscas coincidieron con vacas también positivas a PCR. Se determinó que el uso de dos pares de cebadores del gen *env* (PCR anidado) aumentó la sensibilidad de la prueba. En conclusión, se detectó por primera vez la presencia del VLB en la mosca del cuerno. Este trabajo contribuirá a futuras investigaciones en LBE, básicamente en los temas de transmisión y mecanismos de control de la enfermedad.

2. SUMMARY

Enzootic bovine leukosis (EBL) is an infectious disease caused by a retrovirus called Bovine Leukemia Virus (BLV) that belongs to *Retroviridae* family. This disease was diagnosed for the first time in Uruguay in the 70s, being one of the major sanitary barriers for the country in foreign trade. It is evident that this is a disease widely spread throughout the country, remaining a serious problem mainly for the dairy industry. Most infected animals appear to be healthy, showing only one sero-conversion to the virus, with only a small percentage of them developing lethal form of cancer. Transmission occurs both horizontally and to a lesser extent (15%) vertically. In horizontal transmission it is important blood transmission from an infected animal, being both involved, veterinary practices (blood sampling, vaccination, dehorning, castration, etc.) and blood-sucking insects.

The objective of this study was to diagnose the presence of EBL provirus in *Haematobia irritans* (horn fly) by nested PCR (Polymerase Chain Reaction) laboratory technique. This species were chosen for being blood-sucking insects that flies from one animal to another and may be a possible vector of infectious diseases. In turn, the same technique was used to detect BLV proviral DNA in blood from cows previously positive to ELISA. Blood samples were taken individually from a total of 19 cows, and from the flies in their backs too. From the blood samples analyzed, we got 13 positives to BLV by PCR; and from fly samples, 2 of them were positive too. Both flies' samples coincided to positive cows to PCR. It was determined that using two pairs of primers of *env* region (nested PCR) increased the test sensibility. In conclusion, the presence of VLB in the horn fly was detected for the first time. This study contributes to future research studies on ELB, basically in subject of transmission and disease control.

3. INTRODUCCIÓN

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad infecciosa, crónica, producida por un retrovirus denominado Virus de la Leucosis Bovina (VLB) que infecta principalmente a los linfocitos B, causando, en un bajo porcentaje de los bovinos, una transformación maligna que lleva a leucemia crónica con la aparición de linfosarcoma (Ferrer, 1980).

Esta enfermedad afecta a animales mayores de 2 años y tiene un período de incubación largo, de uno a cinco años (Hopkins y col., 1997). La LBE, por las condiciones de manejo y sistemas de producción, afecta especialmente al ganado lechero, habiendo sido demostrada una mayor sensibilidad en líneas genéticas de alta producción (Jacobs y col., 1991; Digiacomo, 1992).

La LBE tiene un impacto significativo en la producción, desde el punto de vista sanitario y económico, debido a la mortalidad causada directamente por la patología tumoral, por la posible alteración directa del sistema inmune del ganado infectado produciendo aumento concomitante de otras enfermedades infecciosas, y principalmente por las restricciones que son impuestas a la exportación de ganado en pie, semen y/o embriones (Trainin y col., 2005). Uruguay siempre ha exportado vaquillonas a distintos países, siendo esta enfermedad una de las principales barreras sanitarias (MERCOSUR, 1996).

El VLB se transmite por vía horizontal y vertical, siendo la primera la principal vía de contagio. Los animales portadores asintomáticos son las grandes fuentes de infección en los rodeos. Esta transmisión se da por el traspaso de linfocitos infectados con el virus de un bovino enfermo a uno sano (De la Sota, 2005). Como la mayoría de los linfocitos infectados se encuentran en la sangre esto determina que cualquier medida de manejo como por ejemplo el contacto entre categorías o prácticas veterinarias, sean una importante forma de diseminación de la enfermedad por vía iatrogénica (Mammerick y col., 1987; Hopkins y DiGiacomo, 1997, DiGiacomo 1992).

También se ha demostrado que insectos hematófagos pueden jugar un rol importante en la propagación del VLB (Manet y col., 1989). En lugares donde la carga de insectos chupadores es alta se considera que estos pueden contribuir

a la expansión de la enfermedad (Johnson y Kaneene, 1992). Artrópodos e insectos hematófagos, han demostrado ser transmisores del virus en forma experimental, pero su participación en condiciones prácticas resulta difícil cuantificar (Kaja y Olson, 1982; DiGiacomo, 1992; Pollari y col., 1992; Wentink y col., 1993).

El objetivo de este trabajo es detectar el VLB en la mosca del cuerno mediante la técnica PCR anidado. Se eligió realizar el estudio en esta especie ya que es uno de los posibles vectores mecánicos de la LBE por tres razones: 1) son insectos hematófagos; 2) generalmente al ser interrumpidos durante su ingesta sobre un animal, se mueven a otro; y 3) por ser una parasitosis altamente prevalente en el ganado lechero (Buxton, 1982). A su vez, se empleará la misma técnica de laboratorio para confirmar si los mismos animales positivos a ELISA lo son también a PCR.

Por lo tanto, si logramos comprobar la presencia del VLB en la mosca del cuerno, se debería enfatizar el control de este parásito en los planes de control y prevención de la LBE.

4. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

4.1. DESCRIPCIÓN DEL AGENTE

El virus de Leucosis Bovina Enzoótica, es un retrovirus exógeno que pertenece al género Deltaretrovirus, dentro de la subfamilia *Orthoretrovirinae* y la familia *Retroviridae*. Se relaciona estructural y funcionalmente con los virus de los humanos tipo 1 y 2 que infectan a los linfocitos T (HTLV-1 y -2) (Johnson, et al 1985).

Aunque se ha demostrado que el virus de LBE puede persistir en distintos tipos celulares como monocitos y macrófagos, las principales células afectadas por el virus son las células de la línea linfocítica, los linfocitos B, que expresan inmunoglobulina M en su superficie (Gillet y col, 2007).

Las partículas víricas están constituidas por un ARN monocatenario, la nucleoproteína p12, la proteína p24 (de la cápside), la glucoproteína gp30 (transmembrana), la glicoproteína gp51 (de la envoltura), y diversas enzimas entre las cuales se encuentra la transcriptasa inversa. El ADN del provirus se genera tras la transcripción inversa del genoma vírico, el cual se integra al azar en el ADN nuclear de la célula hospedadora, donde se mantiene latente.

4.2. EPIDEMIOLOGÍA DE LA ENFERMEDAD

4.2.1. SITUACIÓN EN URUGUAY

La LBE, es una enfermedad de distribución mundial y se cree que la introducción del virus a nuestro país, haya ocurrido al importar animales infectados provenientes de países de Europa y de los Estados Unidos (Furtado y col., 2013).

La enfermedad ha sido descrita en nuestro país por primera vez en la década del 70 por el Dr. M. Podestá (Perdomo y col, 1977). Nuevos casos siguieron apareciendo y con ello nuevas técnicas de diagnóstico como la IDGA (1977) ELISA y PCR (Guarino H. Saizar, J. Sienna, R. 1989).

En el año 1996 se realizó un relevamiento epidemiológico en predios lecheros del Noreste de Uruguay. De un total de 300 predios se eligieron 30 al azar y se analizaron 400 animales mediante la técnica de ELISA. La prevalencia de LBE

fue de 20%, y por predios fue de un 77% (al menos un animal positivo), indicando que esta enfermedad está ampliamente difundida en las lecherías del Noreste del país (Mederos e Irigoyen, 1998).

Se realizó otro estudio durante 1997-2000 en 4 establecimientos de la cuenca lechera de Salto. Fueron estudiados 534 animales, raza Holando, de distintas categorías. El resultado del estudio serológico demostró que 238 animales (45%) fueron positivos a LBE mediante la técnica de ELISA; y de las muestras que se realizó PCR 24% fueron positivas. Los resultados muestran dinámica de la enfermedad en el tiempo (Collazo y col, 2002).

En el año 1998 se realizó un plan piloto de monitoreo en lechería en el departamento de Florida, para varias enfermedades infecciosas, donde se visitaron 53 establecimientos, recolectando muestras de sangre de 1060 animales seleccionados al azar. La técnica serológica para LBE utilizada fue ELISA, que permitió proyectar una seroprevalencia de un 46,62% para LBE (Guarino, 2001).

En otro trabajo realizado en el año 2003, se determinó la seroprevalencia de LBE, mediante la técnica de ELISA en 60 establecimientos de los departamentos de Florida, San José y Colonia. La seroprevalencia en Florida fue de un 75%, en San José más de un 80% y en Colonia 57% (Zaffaroni y col, 2007).

Por último, Furtado y col (2013), en el año 2009 estudiaron 689 vacas en producción de 41 establecimientos en el centro del país (Durazno, Florida y Tacuarembó). Las muestras fueron procesadas por la técnica de Inmunodifusión en gel de agar, dando un resultado de positividad serológica del 10,4% de los animales estudiados.

Uruguay se encuentra posicionado internacionalmente como gran exportador de productos lácteos. Exporta el 70% de la producción nacional, y en los últimos años ha intensificado su producción en el sector lechero. Esto se ve reflejado ya que hay un aumento de la producción anual de leche (1620 millones de litros en el 2006 vs 2238 millones de litros en el 2013), y una

disminución de la superficie dedicada a lechería (852 mil has vs 811 mil has respectivamente) (DIEA-MGAP, 2014).

Históricamente Uruguay ha exportado vaquillonas Holando a distintos países a nivel mundial (Cuadro 1). Desde el punto de vista económico, la mayor importancia de la Leucosis Bovina, se debe a las restricciones de los mercados internacionales para la compra de animales en pie, ya que esta enfermedad se ha convertido en una de las principales barreras sanitarias (MERCOSUR, 1996). Esto ha llevado que a través de los años, tanto productores como autoridades sanitarias centraran su atención sobre esta enfermedad y los mecanismos para su control y/o erradicación.

Cuadro 1. Ganado lechero exportado en pie en los últimos años:

año	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013
Cabezas de Bovinos	11.466	98.601	45.741	168.582	304.780	210.139	212.955	75.904	41.475

(DIEA, 2014)

Consecuentemente el incremento de animales positivos en nuestro país ha ido en aumento en las últimas décadas. Esto ha llevado a que esta enfermedad sea una de las más prevalentes en el ganado bovino lechero, ocasionando pérdidas económicas directas e indirectas (MERCOSUR, 1996; Guarino, 2001).

Desde el punto de vista legal, la forma clínica de la enfermedad, el linfosarcoma, se incluye a partir de 1992 (Decreto 230/992) como de denuncia obligatoria en el marco de la Ley 3.606 del 13 de abril de 1910.

4.3. TRANSMISIÓN DE LA ENFERMEDAD

La LBE, es una enfermedad infecciosa causada por un retrovirus, de distribución mundial, con alta prevalencia en América del Norte, América del Sur, África, Asia y Australia. Varios estudios realizados en distintos estados de los Estados Unidos, han revelado que la enfermedad se encuentra en un porcentaje notoriamente mayor en animales de producción lechera que en animales de producción carnicera. Esto sugiere que las distintas prácticas de manejo existente entre animales de carne y leche son factores importantes de transmisión del virus de LB. La transmisión del virus de la LBE puede ser tanto vertical como horizontal, siendo esta última la principal vía de contagio (Hopkins y DiGiacomo, 1997).

En rebaños en los cuales la LBE está presente, ocurren pérdidas económicas debido a muertes, servicios veterinarios, disminución en producción de leche entre otros. El control y erradicación de cualquier tipo de agente que se considere transmisor de la enfermedad es muy importante para disminuir o prevenir la incidencia de la enfermedad.

Los animales sometidos a sistemas de producción intensivos, donde hay estrecho contacto físico entre animales y participación importante del ser humano tienen mayor prevalencia de la enfermedad. En cuanto a la raza y edad no hay diferencias significativas de infección (Johnson y col., 1985).

La transmisión natural en rodeos lecheros es más lenta en aquellos con una baja o moderada prevalencia de la infección, mientras que en establecimientos con alta prevalencia, difunde mucho más rápidamente (Dimmock y col, 1991; Hopkins y DiGiacomo, 1997).

El contacto prolongado entre animales sanos y enfermos, es considerado un factor de alto riesgo para que los animales sanos contraigan la enfermedad (Rodríguez y col, 2011).

Jacobs y col (1995), encuentran que hay una tendencia a que las vacas de alta producción y calidad de leche, sean seropositivas a LBE. Creen que esto se debe a que las vacas de gran producción tienden a permanecer más tiempo en el establecimiento, aumentando así las posibilidades de infección, ya que la manera más probable de transmisión es horizontal.

La transmisión vertical ocurre en un 15% de los casos, y ésta ocurre cuando una vaca infectada lo transmite a la progenie vía transplacentaria o vía digestiva por medio del calostro y leche, aunque esta última vía de transmisión solo pudo ser demostrada experimentalmente (Martin y col, 2001; Ferrer y Piper, 1981).

Si bien en el calostro y en la leche se pueden detectar cantidades importantes del virus de LBE, estudios realizados por Ferrer y Piper (1978), demostraron que su importancia en la transmisión natural de la enfermedad es de poca importancia. Los terneros nacidos de madres positivas ingieren con el calostro, cantidades importantes de anticuerpos anti-vLB, fruto del pasaje de los mismos desde la sangre hacia la glándula mamaria en las etapas finales de la preñez. Ello explica que las madres puedan ser serológicamente "falsas negativas" durante el parto, y los terneros positivos como resultado de la absorción de anticuerpos maternos. Estos anticuerpos maternos declinan progresivamente con la edad, hasta desaparecer en su totalidad hacia el 6to u 8vo mes de vida (Villonata y col, 1990; Sierra y col, 1996a; Ferrer y Piper, 1978; Felmer y col, 2006).

En condiciones naturales, LBE es transmitida por sangre ya que la mayor proporción de linfocitos infectados se encuentran en la sangre (Mammerick y col, 1987). Esto también determina que cualquier medida de manejo como por ejemplo el contacto entre categorías o práctica veterinaria como extracción de sangre, vacunación, descorne, tatuajes, castración, aplicación de inyectables, palpación rectal que se practique sin tomar medidas profilácticas correspondientes, son una importante forma de diseminación de la enfermedad por vía iatrogénica (Mammerick y col., 1987; Hopkins y DiGiacomo, 1997, DiGiacomo 1992).

En un trabajo realizado por Van Der Maaten y Miller (1977), demostraron que una inoculación de 2500 linfocitos intradérmica es suficiente para causar infección.

Los artrópodos hematófagos, también cumplen un rol en diseminación de enfermedades, al ingerir sangre con células infectadas e inocularlas en otro animal susceptible (McCluskey, 2002).

Varios trabajos experimentales fueron realizados evidenciando la presencia del virus en los artrópodos hematófagos, como por ejemplo un ensayo realizado por Bech-Nielsen (1978), en el cual linfocitos infectados con BLV fueron recuperados de tábanos los cuales se alimentaron de vacas positivas a LB.

Oshima et al (1981), realizaron un experimento en el cual permitieron la alimentación de tábanos sobre una vaca positiva a LBV, luego recolectaron los tábanos y les dieron acceso a que se alimentaran de ovejas seronegativas a LBV, las cuales luego de un tiempo pasaron a ser seropositivas.

Por otro lado, Buxton y col (1982) inocularon a ovejas seronegativas a LB con partes de aparato bucal de mosquitos que previamente habían sido alimentados de sangre de vacas positivas a linfocitosis persistente. Luego de tres meses, las ovejas dieron positivo mediante ensayos de IDGA y radioinmunoensayos a infección con LBV.

Estudios de laboratorio ejecutados por Evermann et al (1986), han demostrado la capacidad de los tábanos de transmitir mecánicamente el LBV tras alimentarse de sangre con linfocitos infectados.

4.3.1 ROL DE LA TRANSMISIÓN DE VIRUS POR VECTORES ARTRÓPODOS Y EFECTOS QUE CAUSAN SOBRE EL GANADO

Un amplio rango de enfermedades y desórdenes de los bovinos son causados directamente por artrópodos. Además, las picaduras de las moscas y diversos insectos artrópodos resultan en grandes molestias para el animal, generando fatigas y pérdidas en la producción por la falta de ingesta que provocan.

En los rodeos con gran número de animales infectados y alta carga de animales por superficie se ve muy favorecida la transmisión horizontal porque se acentúa el contacto físico entre animales y la transmisión del virus (McCluskey, B.J. 2002).

Varios estudios experimentales, han demostrado que la transmisión de patógenos va a depender principalmente del volumen de sangre que queda en los aparatos bucales de los artrópodos hematófagos luego de alimentarse, la densidad de insectos hematófagos, el nivel de infección del animal, y cantidad de animales susceptibles (Foil y col, 2000).

La transmisión mecánica de las enfermedades involucra el movimiento físico de los patógenos de un animal hacia otro sin que haya una replicación extensiva del patógeno en el vector o algún tipo de efecto patógeno sobre el artrópodo.

La transmisión biológica requiere de multiplicación del patógeno dentro del artrópodo vector, o que ocurra algún cambio de fase de estado del ciclo biológico del animal, esto puede involucrar a más de un artrópodo (McCluskey, B.J. 2002).

El riesgo de transmisión de un artrópodo infectado al bovino está muy asociado a la densidad y habilidad de los insectos vectores. La densidad del vector está influenciada por factores climáticos incluyendo temperatura, precipitaciones y humedad. La competencia entre vectores es también un factor de riesgo primario de transmisión. Un artrópodo vector para ser efectivo debe soportar al patógeno con el que va a infectar. La habilidad del vector para la transmisión mecánica está limitada a la habilidad del insecto para adquirir al patógeno ya sea mediante ingestión de sangre (hematófago) o simple contacto y luego movimiento transportando al patógeno hacia otro animal susceptible de manera eficaz. En este caso el patógeno no se multiplica pero si ocurre una conexión que permite la sobrevivencia del patógeno durante el transporte (física o química).

La supervivencia de los vectores es también importante para la transmisión, es por esto que muchos artrópodos desarrollan mecanismos para sobrevivir el invierno, y también transmisiones verticales de la enfermedad entre ellos para mantener al patógeno en la población del insecto (McCluskey, B.J. 2002).

Dentro de las enfermedades infecciosas del ganado bovino, es importante tener en cuenta a los distintos tipos de vectores (hematófagos) como propagadores de las mismas. Dentro de estos se encuentran con mayor frecuencia las garrapatas, las moscas y mosquitos.

A continuación mencionaremos brevemente las que generan mayor impacto en el ganado bovino

Enfermedades transmitidas por garrapata:

La garrapata *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* transmite tres agentes de gran importancia en la ganadería: *Babesiabovis*, *Babesiabigemina* y *Anaplasma marginale* (Arenas 1991). Han tenido importante impacto en el desarrollo de la industria ganadera a nivel mundial, son una de las causas de mayor mortalidad para el ganado. Serias pérdidas continúan ocurriendo debido al movimiento del ganado de áreas libres de garrapatas infectadas a áreas endémicas (Garifas, et al, 2010).

Por otra parte la *Coxiellaburnetti* también se propaga por medio de las garrapatas, que transmiten las bacterias de animales infectados a otros susceptibles. Los abortos al final de la gestación son la consecuencia más grave. La fiebre Q es una enfermedad muy extendida, provocada por la bacteria *Coxiella burnetti* (OIE, 2014).

Las especies *Theileria annulata* y *T. parva*, también transmitida a través de las garrapatas, son responsables de una mortalidad y de pérdidas en la producción.

Enfermedades transmitidas por mosquitos:

La lengua azul es una enfermedad viral de los rumiantes con morbilidad y mortalidad muy variable, transmitida por insectos del género *Culicoides*. La enfermedad se presenta en países de clima subtropical y templado en las estaciones en que proliferan los insectos vectores.

El agente causal pertenece a la familia *Reoviridae*, del género *Orbivirus*. La enfermedad se caracteriza por producir procesos febriles, mostrando inflamación y hemorragias en las mucosas oral, nasal y de todo el tracto digestivo, inflamación en las bandas coronarias y láminas sensibles de las pezuñas.

El virus se transmite entre los animales por medio de vectores, artrópodos de género *Culicoides*, lo que hace que su prevalencia sea mayor en las zonas geográficas donde el clima favorece el desarrollo de los mismos (Escandón, 2011).

La Leishmaniosis visceral es una enfermedad zoonótica, parasitaria, producida por un protozooario intracelular, *Leishmania infantum*, y transmitida en América por un flebótomo (mosquito) del género *Lutzomyia* (Satragno, y col, 2015). El

principal reservorio de dicha parasitosis es el perro doméstico. Se han observado casos tegumentarios esporádicos en equinos y ganado vacuno (OIE, 2014).

Es importante mencionar esta enfermedad ya que en nuestro país recientemente se han encontrado casos de perros infectados, junto con la identificación del agente vector de la enfermedad.

Los signos externos característicos registrados en perros susceptibles son un aumento de tamaño de los ganglios linfáticos, pérdida de peso y uñas, dermatitis exfoliativa, alopecia, úlceras y alteraciones oculares. Se han observado casos tegumentarios esporádicos en equinos y ganado vacuno (OIE, 2014).

Enfermedades transmitidas por moscas:

La mosca, es un artrópodo que además de presentar efectos primarios adversos sobre sus hospedadores tales como lesiones de piel, reducción de ganancia de peso, pérdidas de producción de leche y carne, estrés, pérdidas de sangre etc., tienen como efecto indirecto sobre el ganado, ser vectores de transmisión mecánica de patógenos tales como virus, bacterias, protozoarios y helmintos. El proceso ocurre cuando una mosca se alimenta de un animal infectado. La sangre contaminada queda en el aparato bucal de la mosca vector la cual luego, se dirige hacia otro animal susceptible a enfermarse del cual vuelve a alimentarse contaminando la sangre de este transmitiendo así la enfermedad (Butler y col, 1977).

Numerosos virus pueden ser transmitidos mecánicamente por *Stomoxys calcitrans* tales como Virus de Anemia Infecciosa Equina (EIAV), Fiebre Porcina Africana (ASFV), Herpes Virus Bovino-2 (BHV), Virus de la Leucosis Bovina (BLV), Virus Estomatitis Vesicular (VSV), virus Lengua Azul (BTV).

En el caso de las bacterias, se ha descubierto experimentalmente mediante el uso de ratones y cuises, que la bacteria *Bacillus anthracis*, es transmitida mecánicamente por la *Stomoxys calcitrans*. También otras así como *Pasteurella multocida*, *erisipela rhusiopathiae*, *Brucella abortus*, *Brucella suis*, *Clostridium perfringens*, *Listeria monocytogenes*, *Leptospira* spp, pueden ser

transmitida por *Stomoxys calcitrans* siendo este el vector mecánico (Krinsky, 1976).

En cuanto a las Rickettsias, la *Anaplasma marginale* causante de la enfermedad anaplasmosis bovina, puede también ser transmitida mecánicamente por vectores hematófagos entre los cuales están implicados mosquitos, *Stomoxys calcitrans*, *Haematobia irritans* y tábano spp. Ellos representan una importante vía de transmisión debido a la constante interacción entre dichos vectores y los bovinos infectados portadores y los animales sanos (Estrada y col, 2014).

Debido a los hábitos alimenticios de la *Stomoxys calcitrans*, esta mosca es considerada un alto potencial de riesgo como vector mecánico para transmisión de patógenos de varios tipos de microorganismos (Baldacchino y col, 2013).

A pesar de que la transmisión horizontal por iatrogenias del VLB es considerada la más importante en cuanto al contagio, estudios realizados en laboratorios han demostrado que los tábanos, son capaces de lograr la transmisión del virus de leucosis bovina mecánicamente al alimentarse de sangre de un animal infectado y luego alimentarse de uno susceptible (Hasselschwert y col, 1993).

Manet y col (1989), también realizaron estudios sobre el rol del tábano en la transmisión de VLB en condiciones naturales, y obtuvieron como resultados que el tábano juega un importante rol en la transmisión. Se observó que tiene variaciones estacionales, siendo en las estaciones calurosas donde se encontraron mayores incidencias e infecciones en el ganado con VLB junto con aumento de densidad y población de tábanos, indicando la importancia de este artrópodo en la transmisión.

Históricamente, la mosca del cuerno, ha sido considerada como una de las parasitosis más importantes del ganado causando grandes daños económicos. Es un parásito de tipo hematófago, que causa pérdidas en el ganado debido a provocar reducción de ganancia de peso, disminuir consumo de alimento y reducir producción láctea en el ganado (Byford y col, 1992).

4.4. PATOGENIA

La infección comienza por la llegada de células infectadas con el virus, las cuales están presentes en la sangre, semen y leche cruda. Una vez que ingresa el virus al organismo del huésped busca los linfocitos B los cuales expresan IgM. El proceso de fusión está mediado por la inserción oblicua del péptido aminoterminal TM en la bicapa lipídica de la membrana de la célula (Gillet y col., 2007). Una vez el virus dentro del citoplasma de la célula, sintetiza una copia de ADN complementario a partir del ARN viral utilizando la enzima transcriptasa inversa. La nueva molécula de ADN penetra al núcleo celular, se duplica y se integra al azar de manera permanente al genoma celular en forma de provirus (Luciw y Leung, 1992). La infección estimula una fuerte reacción inmune humoral en contra de las principales proteínas virales gp51 y p24 que constituyen la base para la detección mediante pruebas serológicas (Portetelle y col., 1989). Los anticuerpos anti gp51 se detectan generalmente con títulos más altos que aquellos dirigidos contra la proteína p24 (Gonzales y col., 2001).

En los bovinos infectados con el virus de leucosis bovina (VLB) pueden distinguirse tres presentaciones:

a) Forma inaparente, caracterizada por la integración del ADN proviral al genoma de los linfocitos infectados y por la producción de anticuerpos específicos contra antígenos virales, principalmente contra la glicoproteína (gp) 51 de la envoltura viral (Portetelle y col., 1989).

b) Linfocitosis Persistente (LP), desarrollada por un 30 al 70 % de los animales infectados con edades entre 3 y 6 años, que desde el punto de vista clínico demuestran estar sanos (Beier, 2008).

c) Enfermedad tumoral propiamente dicha (leucemia/ linfoma/ linfosarcoma), presente en un 0,1 al 10 % de los animales infectados y que es la forma irremediablemente mortal (Ferrer, 1980; Burny y col., 1988).

4.5. SIGNOS CLÍNICOS

El VLB que puede llegar a infectar en forma inaparente a un elevado porcentaje de los animales del establecimiento (60%) o puede evolucionar a una linfocitosis persistente (30–35%) y finalmente al desarrollo tumoral (linfosarcomas) (Fenner y col., 1992) que suele manifestarse entre los 5 y los 8 años, en un bajo porcentaje de la población (5–10 %) (Chamizo, 2005).

Los animales que presentan linfocitosis persistente, no manifiestan la sintomatología clínica, tumores, ni linfocitos neoplásicos, ni pérdida de producción de leche o carne; pero hay que tener en cuenta que estos animales sufren un desorden inmunológico, con una marcada disminución en la síntesis y actividad de las inmunoglobulinas (De la Sota, 2005). Una proporción variable de animales infectados estimada en el 30% desarrolla linfocitosis persistente (Ferrer y col., 1978; Hamilton y col., 2003).

El proceso de neoplasia por lo general involucra a los ganglios linfáticos, pero también se pueden ver afectados el abomaso, corazón, útero y otros órganos. Por lo tanto, las manifestaciones clínicas van a depender del órgano involucrado, del grado de crecimiento de ese tumor y de la diseminación del proceso neoplásico (Ferrer y col, 1980). Consecuentemente estos animales van a presentar astenia, emaciación, apetito disminuido, desnutrición, fatiga rápida, una baja en la producción de leche y anemia. El signo más específico y frecuente que nos permite sospechar la enfermedad es la adenomegalia bilateral más o menos simétrica de los ganglios linfáticos explorables (Chamizo, 2005). Los ganglios linfáticos externos principalmente pre-cruales y pre-escapulares generalmente están afectados y la infiltración en los tejidos retro oculares de la cavidad orbital pueden causar exoftalmos. Se pueden observar signos circulatorios, digestivos, respiratorios, reproductivos, urinarios y neurológicos cuando se ven involucrados sus respectivos sistemas (Ferrer, 1980).

4.6. DIAGNÓSTICO

Para establecer el diagnóstico de la enfermedad, cuando se trata del linfosarcoma es necesario observar la presencia de tumor linfoide o linfocitos neoplásicos en el animal (Ferrer, 1980), y aquellos infectados asintomáticos y/o con linfocitosis persistente requieren de pruebas de laboratorio para detectar la infección por el virus de LBE (González y col., 2001).

El diagnóstico se puede realizar mediante métodos directos, detectando la presencia del virus en los linfocitos afectados; o a través de pruebas indirectas, detectando anticuerpos específicos circulantes en sangre (OIE, 2012).

En los estudios de infección con VLB se han empleado numerosos métodos diagnósticos tales como: Seroneutralización (SN), Radioinmunoensayo (RIA), Inmunodifusión en del agar (IDGA), inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA), Western Blot (WB) y Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) (González y col., 2001).

Dentro de estas pruebas, IDGA y ELISA son las actualmente prescritas por el Código Terrestre de la OIE (2015) y PCR como prueba de sustitución, aceptadas por la mayoría de las autoridades gubernamentales, incluido nuestro país, como pruebas oficiales para el diagnóstico de VLB.

La detección serológica de anticuerpos, principalmente contra la gp51 de la envoltura viral, mediante las técnicas de IDGA o ELISA constituyen los métodos más comúnmente usados para la identificación de animales infectados (Martin y col., 2001; González y col., 2001). Estos métodos indirectos tienen la ventaja de ser fáciles de realizar, económicos, viables y capaces de utilizar con grandes números de animales (Evermann y col., 1997).

Por otra parte, se ha descrito el uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) como método diagnóstico directo, que detecta secuencias del gen *env* codificante de la gp51 del VLB (Ballagai-Pordany y col., 1992; Felmer y col., 2006).

Por otro lado, las pruebas serológicas no discriminan los anticuerpos maternos de los del propio animal generados por la infección (Ballagai-Pordany 1992) y tampoco detecta la infección en estadios tempranos (Martin y col, 2001). Los

anticuerpos derivados de la madre pueden tardar 6 a 7 meses en desaparecer. No hay modo de distinguir entre los anticuerpos adquiridos por transferencia pasiva y los que se generan como consecuencia de una infección activa. Sin embargo, la infección activa se puede confirmar mediante la detección del provirus del VLB mediante la PCR. Durante el periodo periparto, las vacas pueden tener anticuerpos séricos que son indetectables mediante la IDGA, debido al paso de los anticuerpos desde el sistema circulatorio de la vaca al calostro. Por lo tanto, cuando se utiliza la prueba de IDGA, un resultado negativo de la prueba con suero tomado en ese momento no es concluyente y debe repetirse la prueba. La prueba IDGA es específica, pero no muy sensible, para detectar anticuerpos en muestras de suero individuales. Sin embargo, no es adecuada para muestras de leche (excepto el primer calostro) debido a su escasa sensibilidad para detectar bajas concentraciones de anticuerpos. En cuanto al método ELISA se puede utilizar un método indirecto y otro de bloqueo. La ELISA de bloqueo es adecuado para la detección de anticuerpos en muestras individuales o combinadas de suero, mientras que ELISA indirecto se adecua para la detección de anticuerpos en muestras mezcladas de leche (OIE, 2012). Recientemente se han desarrollado distintos kits comerciales de ELISA para ser utilizados en muestras de suero y/o leche (Gonzales y col., 2001).

PCR es una prueba conveniente para detectar ADN proviral en muestras de sangre, suspensiones de órganos y material tumoral, siendo un método sensible que permite un diagnóstico rápido y temprano (Gonzales y col., 2001). Los antígenos virales y el ADN del provirus se pueden identificar en semen, leche y calostro de animales infectados (Dus Santos y col., 2007; Romero y col., 1983). En ensayos experimentales, se ha demostrado que los animales son detectados como positivos 7 días post infección, 1-3 semanas antes que usando otros test de rutina (Brandon y col, 1991; Klintevall y col., 1991, 1994). Esta técnica permitiría detectar animales infectados antes de que estos desarrollen una respuesta inmunológica, animales cursando un periodo prolongado de latencia o animales con una baja carga de exposición del virus, así como la detección del virus en terneros infectados que recibieron calostro de madres seropositivas (Kaaden y col., 1982). Dada su alta sensibilidad

(Evermann y col, 1997), el PCR se puede usar en casos específicos, como serían el comercio de animales, centros de reproducción o en animales de alto valor genético (Reichert y col, 1999). Asimismo, la aplicación de la PCR requiere de un laboratorio que cuente con la infraestructura necesaria para el manejo de técnicas de virología molecular, donde se deben tener las precauciones adecuadas, y a través de los procedimientos de control, validar la calidad de los resultados (Beier, 2008). Por otro lado, la alta sensibilidad de esta prueba puede causar problemas de falsos positivos debido a la contaminación entre las muestras (Belak y col, 1993). Para reducir este problema, se adoptan durante el protocolo varios procedimientos especiales, como la utilización de cabinas de flujo laminar, empleo de locales separados para las distintas fases del proceso, guantes nuevos en cada caso y utilización de tubos con apertura especial para cada prueba (OIE, 2012). A su vez, la presencia de sustancias inhibidoras en algunas muestras puede originar falsos negativos.

En un trabajo realizado por Murtaugh y col. (1991), detectaron que en animales seronegativos no se encontró genoma viral mediante PCR, y en 13 de 18 animales seropositivos si se encontró infección por el virus. Esto indica que la técnica de PCR es un método válido para la detección de VLB. En un ensayo publicado por Eeaves y col. (1994), muestran asimismo que esta técnica es de aplicación práctica para identificar terneros infectados, independientemente de la presencia de los anticuerpos calostrales, y también nos permitiría sacar animales con este tipo de infección de los rodeos. Klintevall y col. (1994), expresan que el PCR es el método más rápido para la detección temprana de infección con VLB y una herramienta muy valorable para estudiar el tropismo del virus, lo cual era uno de los objetivos de ese trabajo. También se destacó que esta técnica era más sensible usando doble par de cebadores (PCR anidado) que usando un solo par de cebadores. Fechner y col. (1996) probaron pares de cebadores de las secuencias del gen *env* y *tax*, y concluyen que la amplificación de las secuencias del gen *env* es más eficiente para el diagnóstico del virus de LBE. Según Portetelle y col. (1989), esto podría deberse a que el gen *env* tiene menores variaciones genómicas en comparación con el gen *tax* (Sagata y col., 1985). Fechner y col. (1996)

evalúan las aplicaciones prácticas del PCR para el diagnóstico de Leucosis en bovinos en países de baja prevalencia de la enfermedad. Estos autores expresan que esta técnica es particularmente adecuada también para confirmar resultados dudosos obtenidos por pruebas serológicas, para diagnosticar en animales importados y para descartar terneros infectados recién nacidos.

Como ya se mencionó anteriormente, la prueba IDGA en suero o el ELISA en suero o leche han sido reconocidos por la OIE para el diagnóstico del VLB (OIE, 2015). Debido a su simplicidad y sus ventajas prácticas y económicas, la prueba IDGA ha tenido una rápida incorporación como método de diagnóstico oficial en muchos países. Según Felmer y col. (2006), la técnica IDGA tiene baja sensibilidad, por lo cual deberían hacer reconsiderar la utilización de esta prueba como método de diagnóstico oficial. Asimismo, otro trabajo realizado por Rama y col, (2010) realizado en nuestro país, donde comparan las técnicas de ELISA, PCR e IDGA, plantean que el método diagnóstico más sensible fue la PCR, siendo IDGA la que detectó menor número de animales positivos.

Por otro lado, en un estudio realizado en Madrid por Martin y col, (2001) donde comparan la técnica directa de PCR con la técnica indirecta ELISA, plantean que en rodeos de alta prevalencia de VLB se deben usar técnicas de alta especificidad como sería la IDGA, para asegurarse que los positivos realmente sean positivos, teniendo en cuenta que se pueden obtener falsos negativos. Por otro lado, en rodeos de baja prevalencia del virus, se debería usar técnicas de alta sensibilidad como sería PCR, de esta manera asegurarse de que animales negativos sean realmente negativos, corriendo el riesgo de que aparezcan falsos positivos.

4.7. CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA ENFERMEDAD

Considerando que no existen vacunas que puedan prevenir la infección del ganado, el control y prevención están basados, principalmente, en medidas de manejo y bioseguridad (Hopkins y col., 1988; Lassauzet y col., 1990)

Hay tres maneras de prevención: identificar y eliminar positivos, identificar y separar animales positivos del resto del rodeo y corregir las prácticas de manejo.

La primera medida se basa en identificar los animales positivos mediante la correspondiente prueba diagnóstica, inmediatamente separar los animales positivos y sacrificarlos (Ferrer 1978; DiGiacomo, 1992). Una limitante de esto es que solo se podría emplear en lugares con baja prevalencia por el impacto económico que significaría el descarte de animales, así como la pérdida del potencial reproductivo y genético del establecimiento (Rodríguez, 2011).

La otra medida, donde se podrían reducir las pérdidas económicas, consiste en separar en vez de sacrificar animales. Se deben detectar los casos positivos y separarlos de los no infectados (Johnson y col 1985; Shettigara y col 1989; Brenner y col 1988). Según Shettigara y col., (1989), el área mínima de separación debe ser de 200 metros de distancia para evitar la transmisión.

La tercera medida de control, monitorear e implementar medidas de manejo y de bioseguridad correctivas, se enfoca en limitar la transferencia de células infectadas presentes en sangre, leche, secreciones, excreciones, jeringas e instrumentos quirúrgicos. Las prácticas que se incluyen en esta medida serían usar jeringas individuales y descartables; usar instrumentos para examen ginecológico descartables o lavarlo luego de usarlo con un animal; utilizar elemento estéril, limpio o desinfectado en procedimientos como descorné, tatuaje, implantes, cauterización, castración o caravaneo; alimentar terneros con calostro o leche de vacas no infectadas, o calostro pasteurizado de vacas infectadas o sustituto lácteo; eliminación de insectos para minimizar la transmisión horizontal entre animales; y monta natural, inseminación artificial o transferencia de embriones de animales libres de Leucosis (Rodríguez , 2011).

También, podría haber una cuarta medida estratégica la cual sería seleccionar razas resistentes o menos susceptibles a la infección. La respuesta

inmunológica y la resistencia o susceptibilidad está influenciada por el complejo mayor de histocompatibilidad del huésped (MHC) que en bovinos se refiere al gen Antígeno Linfocitario Bovino (BoLA) fenotipo (Rodríguez y col. 2011). El inconveniente de este tipo de selección, es la limitación de la selección de los animales por otras características genéticas o fenotípicas con interés productivos distintos.

4.8. ANTECEDENTES DE LA MOSCA DEL CUERNO

La mosca de los cuernos *Haematobia irritans*, proviene de países europeos, donde fue reportada por primera vez en España y Francia en 1885, y luego en 1887, se confirma su presencia en Estados Unidos (Bruce, 1938). La mosca se expandió con gran velocidad por todo el territorio estadounidense desde su punto de entrada, aparentemente Philadelphia, logrando a principios de 1900, invadir a casi todo el país y también ingresar a Puerto Rico y Canadá (Hargett y Goulding, 1962).

En la década del 30, la mosca logra ingresar a América del Sur por medio de Venezuela y Colombia, donde se expande por el continente y se desplaza hacia el sur diagnosticándose en Argentina y Uruguay en 1991 (Tarelli, 2004).

En la actualidad la mosca de los cuernos se encuentra en América, Europa, Asia y en regiones del norte de África (Radostits y col, 2002).

4.8.1. IMPACTO ECONÓMICO:

La mosca de los cuernos, es de las ectoparasitosis que genera mayores daños en cuanto a la producción de bovinos en condiciones de pastoreo (Byford y col, 1992). Estas pérdidas están principalmente asociadas a disminución en la ganancia de peso, en la producción lechera y en la calidad de los cueros obtenidos (Guglielmone y col, 1999). Campbell (1976), tras un trabajo experimental, demostró que terneros al destete con madres libres de *Haematobia irritans*, obtuvieron una ganancia de peso de 5.8kg mayor que aquellos terneros cuyas madres estaban parasitadas por moscas del cuerno. Luego, Haufe (1982), pudo demostrar que aquellos bovinos tratados con caravanas con fenvalerato tuvieron mayor ganancia de peso en comparación con aquellos bovinos sin tratamiento de caravanas.

Animales expuestos a poblaciones de moscas del cuerno mayores a 700 por animal, sufrieron pérdidas de peso entre 40 a 90gr por día (Kunzy col, 1984).

Carballo (1993), a través de estudios realizados en Brasil, menciona que se presentan ganancias de hasta un 12% en un período anual de lactancia cuando los dípteros son controlados, y pérdidas de hasta 1kg de leche por vaca por día en animales a los que no se les aplicó control de la mosca.

Sumado a las pérdidas de producción ocasionadas por la mosca, no debe olvidarse agregar los costos de su control (Guglielmone y col., 1999).

Las picaduras de las moscas resultan en grandes molestias para el animal generando fatigas, irritación, cambios comportamentales y pérdidas en la producción por la falta de ingesta que provocan (McCluskey, B.J. 2002).

En el año 1986, (Schwinghammer y col., 1986.), se estudió el efecto fisiológico que ocasionaba la infestación por la mosca del cuerno, en bovinos expuestos entre 100 y 500 moscas por animal. Pudieron detectar cambios asociados al estrés fisiológico tales como mayor frecuencia cardíaca, respiratoria y aumento en la temperatura rectal.

4.8.2. CICLO BIOLÓGICO Y HÁBITOS DE LA MOSCA DEL CUERNO:

La mosca de los cuernos es un díptero hematófago pequeño, de 3 a 5 mm de largo, de color cenizo y con una morfología general característica de punta de flecha, la cual permite reconocerlas fácilmente al estar posadas sobre el animal, formando un ángulo hacia arriba con el cuerpo. Tienen un importante aparato bucal de tipo picador/chupador (Radostits y col., 2002; Carballo, 1993). El hospedador principal de la mosca en su estadio adulto es el bovino, aunque puede alimentarse de otras especies animales, como equinos, ovinos y caninos. Su preferencia a los bovinos está ligada a sus requerimientos reproductivos, ya que el lugar de postura de huevos es la materia fecal bovina recién eliminada, la cual manteniéndose luego intacta asegura el posterior desarrollo larvario y pupal (Torres y Prieto, 1993).

Las moscas adultas tienen una vida media de 3 a 7 semanas. Están casi todo el tiempo sobre su hospedador, al que no abandonan más que cuando defecan, para poner sus huevos debajo de las deposiciones recientes del ganado (Radostits y col, 2002).

Al alimentarse, la mosca succiona sangre por períodos que van de 4 a 10 minutos, donde este procedimiento se repite hasta 30 veces por día.

Esta mosca es una plaga estacional, ya que su presencia en el campo se registra a la entrada de la primavera hasta fines de otoño. Este período depende exclusivamente de las condiciones climáticas predominantes (Tarelli, 2004).

Los huevos y las larvas necesitan un medio ambiente muy preciso para poder sobrevivir, ya que precisan una humedad del 75-85% al aire libre, siendo sensibles a la sequedad, siendo la materia fecal un medio ambiente adecuado (Torres y Prieto, 1993). La temperatura óptima para su desarrollo es de 26-35°C, y temperaturas inferiores o superiores a estas detienen su desarrollo. Por ello estas moscas solo pueden persistir en climas húmedos y cálidos, con una pluviosidad anual de 50cm por lo menos y una temperatura media superior a los 22°C (Radostits y col, 2002).

El ciclo vital se completa en 8 días a 3 semanas, aunque un período entre 5 a 7 días en que la temperatura esté por debajo de 15 °C, provoca el reposo invernal a esta plaga. Los estadios inmaduros entran en diapausa hasta su eclosión en la primavera siguiente (Tarelli, 2004).

Los adultos de esta mosca poseen una longevidad que va de 4 a 8 semanas (Bruce, 1964 citado por Tarelli) y dependiendo de condiciones ambientales la cantidad total de huevos producidos por cada hembra, que varía de 200 a 400 huevos (Radostits y col, 2002; Tarelli, 2004).

4.9. CONTROL Y PREVENCIÓN DE LA MOSCA

La época de control de la mosca puede extenderse desde los comienzos de la primavera hasta fines del otoño, dependiendo de la zona y de las condiciones climáticas (Demarco, 2004).

Los métodos que se utilizan para el control de este vector se agrupan en: control químico; control mecánico y control biológico (Tarelli, 2004).

Dentro del control químico, existen principios activos de amplio espectro que se presentan en diferentes formas de aplicación, tales como: pour-on, aspersión, caravanas, baños de inmersión e inyectables (Demarco, 2004). Las formulaciones para uso pour-on pueden contener organofosforados tales como ethion, diazinon, chlorpyrifos, fenithrion, etc.; también pueden contener combinaciones de estos con piretroides sintéticos como la cipermetrina. Las caravanas insecticidas pueden venir formuladas con estos organofosforados o combinaciones de ellos mismos (Anziani, 2011), y los inyectables son en base a Ivermectina (Oyarzun, 2008).

El control de *H. irritans* se ha realizado principalmente mediante el uso de compuestos químicos en forma irracional, lo que ha generado resistencia a estos compuestos, en consecuencia, fallas en el control y, por lo tanto, incremento en la población de la plaga (García y col, 2001). Es por esto que nuevas estrategias de control deben ser creadas (Steelman y col., 2003). Estas estrategias comprenden la selección de ganado resistente a la mosca (Kunz y Kemp, 1994), ya que el número de moscas en cada animal parecería ser heredable según ciertos autores (Parra y col, 2013; Guglielmo, 2000). Otra estrategia de control sería el uso de semioquímicos que están involucrados en conferir tal resistencia del huésped (Pickett, 2010).

También existen estrategias complementarias, como los métodos de control biológicos, posibles debido a la presencia de enemigos naturales de la mosca, entre los cuales encontramos a los escarabajos estercoleros, avispa y nematodos (Demarco, 2004).

Por último, están los métodos mecánicos de control que serían aquellos elementos que en su funcionamiento utilizan procesos físicos para provocar una reducción en el número de insectos de una población dada. El modelo

comercial más conocido es el llamado “Túnel trampa”. Esta trampa se coloca en la salida de un corral o manga donde los animales se vean obligados a salir por ella. En el túnel hay unas cortinas que obligan a las moscas a volar fuera de los animales, se acumulan en las paredes y mueren por deshidratación. Las ventajas de este método es que se evita el uso de insecticida, reduciendo los costos y se evita peligro de contaminación; es sumamente efectivo cuando los animales están acostumbrados, y su bajo mantenimiento y gran vida útil reducen los costos a un mínimo porcentaje de inversión anual. Por otro lado, la gran desventaja es que es un método fácil de aplicar en tambos, pero no en ganadería dado por la complicación que generaría movilizar habitualmente a los animales del rodeo.

Otra forma de control mecánico serían aquellas prácticas que procuren eliminar la materia fecal del campo para evitar el desarrollo de las larvas. Se utilizan palas mecánicas o rolos que rompen la torta de la bosta. Esto permite controlar en parte la mosca y favorece la fertilidad del suelo. También existe otro método donde se coloca una bolsa estercolera en el cuarto trasero de los bovinos y van recolectando la materia fecal a medida que el animal defeca (Tarelli, 2004).

5. HIPÓTESIS

La mosca del cuerno (*Haematobia irritans*), al tratarse de un insecto de tipo hematófago, será positiva al virus de Leucosis bovina enzoótica mediante la técnica de PCR.

6. OBJETIVOS

6.1. OBJETIVO GENERAL:

Detectar el virus de Leucosis Bovina Enzoótica en la mosca del cuerno (*Haematobia irritans*) como posible factor de riesgo en la transmisión de la infección, contribuyendo al conocimiento de la propagación del virus en el rodeo y la implementación de medidas de control y/o erradicación eficientes.

6.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

Implementar una metodología de recolección de moscas del cuerno sobre el ganado.

Poner a punto la extracción de ADN viral a partir de muestras de insectos hematófagos.

Adecuar la técnica de PCR convencional para la detección del virus de LBE a partir del ADN extraído.

7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. ANIMALES:

Se seleccionaron 19 vacas Holando de un lote de vacas seropositivas a LBE (n=200), las que, al pasar por el tubo, presentaban una alta carga parasitaria. Las mismas estaban ubicadas en un establecimiento lechero del Departamento de San José, que se encuentra implementando desde el año 2006 un estricto plan de control de la infección. La condición de seropositivas al virus fue establecida por varias pruebas serológicas a la técnica de ELISA indirecto realizadas con anterioridad a la toma de muestras.

7.2. MUESTRAS DE SANGRE:

Cada animal seleccionado fue sangrado en el momento de la recolección de moscas, por venopunción coccígea, colocando la sangre en tubos con anticoagulante K3 EDTA, identificados previamente con números correlativos correspondientes a la identificación de cada animal por su caravana. A tales efectos se confeccionó una planilla de recolección de datos.

Para la extracción de sangre se utilizaron jeringas descartables de 5 cc, una por animal y guantes estériles. La sangre entera se guardó en freezer a -80 °C hasta su procesamiento para la extracción de ADN.

7.3. MUESTRAS DE MOSCAS:

La recolección de moscas se realizó sobre el lomo de cada una de las vacas seleccionadas, utilizando un calderín de malla fina, un embudo para su colocación en cada bolsa, guantes estériles y bolsas herméticas individuales. Cada bolsa con aproximadamente 20 moscas se identificó con el número de caravana de la vaca correspondiente sobre la cual se encontraban, manteniéndose refrigeradas hasta su traslado al laboratorio. Una vez en el laboratorio fueron congeladas a -80 °C hasta su procesamiento para la extracción de ADN.

7.4. EXTRACCIÓN DE ADN:

7.4.1. A PARTIR DE SANGRE ENTERA

Para la extracción de ADN a partir de sangre se utilizó un kit comercial (Quick-Gdna Blood miniPrep (a) siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, a 100 µl de sangre entera se le agregó 400 µl buffer de lisis con β-mercaptoethanol, colocándose la muestra en las columnas provistas. Luego de dos lavados con buffers específicos, el ADN absorbido a la columna fue eluído con 50 µl de buffer de elución.

7.4.2. A PARTIR DE LAS MOSCAS

Para la extracción de ADN a partir de las muestras de moscas se utilizó un kit comercial específico para insectos (ZR Tissue & Insect DNA MiniPrep) (b) siguiendo las indicaciones del fabricante. El mismo se basa en la utilización de minicuentas o perlas para la rápida y eficiente disrupción del material y un filtrado previo a la incorporación de la muestra a la columna donde el ADN quedará absorbido. Luego de dos lavados consecutivos el ADN fue eluído en 50 µl de buffer de elución.

Las muestras se procesaron en pool de aproximadamente 50 mg por cada bolsa. Estas fueron maceradas en cajas de Petri estériles y homogenizadas utilizando la solución de lisis con el agregado de β-mercaptoethanol previo a la aplicación del protocolo.

7.5. PCR - ANIDADO:

Para la amplificación de las muestras de ADN proviral obtenidas tanto de sangre entera como de moscas se siguió el protocolo de la técnica de PCR de acuerdo a Klintevall K. y col (1994), utilizando dos pares de cebadores de la región *env* del virus de LBE (Cuadro 1.)

La primer reacción se llevó acabo en un volumen final de 25 µl: 12,5 µl PCR Master mix 2X (c), conteniendo 0.05U/µL Taq ADN polimerasa, 4mM MgCl₂, 0,4 mM de cada dNTP y buffer de reacción; cebadores: PR y PF 10µM, agua libre de nucleasas csp.20 µl, y 5 µl de ADN extraído.

Luego cada muestra fue procesada en un termociclador (d) con las siguientes condiciones: Cinco ciclos de: desnaturalización del ADN a 94 °C por 45 seg, anillado a 48 °C por 1 min, y extensión a 72°C por 1 min,seguido de 15 ciclos de: desnaturalización a 94 °C por 45 seg, anillado a 43 °C por 1min y extensión a 72 °C por 1 min, y extensión final a 72 °C por 7 min.

Para la segunda reacción (Anidado) se mantuvieron las mismas condiciones de concentración y volumen anteriores utilizando los cebadores NR y NF 1µM y 5 µl del producto amplificado en la primera reacción. Para la amplificación

anidada se utilizaron las siguientes condiciones: 5 ciclos de desnaturalización a 94 °C 45 seg, anillado a 58 °C por 1 min, y extensión a 72 °C 1 min, seguido de 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C 45 seg, anillado a 53 °C por 1 min, y extensión a 72 °C 1 min, y extensión final a 72 °C por 7 min.

Como control positivo se utilizó ADN extraído de la línea celular de riñón fetal de cordero (Fetal Lamb Kidney) persistentemente infectado con el LBE virus, y como control negativo se utilizó la mezcla de PCR sin ADN.

Para evitar la contaminación entre muestras se utilizaron punteros con filtro y guantes durante todo el proceso. La preparación de ambas reacciones se realizó en cabina de flujo laminar B2.

7.6. ANÁLISIS DE LOS PRODUCTOS AMPLIFICADOS

Los productos amplificados en el segundo PCR fueron visualizados por electroforesis en geles de agarosa al 1,5% en buffer TAE (40 mM Tris- 20 mM ácido acético y 1 mM EDTA), también usado como buffer de corrida, a 100 V 500 mA durante 40 min.

Diez micro litros de cada muestra fueron sembrados 1:6 con colorante de corrida (10mM Tris-HCl (Ph 7,6), 0,03% azul de bromofenol, 0,03% xilenecyanol FF, 60% glicerol y 60mM EDTA). Como marcador molecular se utilizó GeneRuler TM100 pb ADN (e) que muestra 10 fragmentos de ADN de 1000 a 100 pares de bases, con una banda referencia de 500 pb.

Luego de la corrida electroforética, el gel fue teñido con colorante SYBR Safe DNA gel stain (f) en dilución 1:10.000 en buffer TAE por 15 min. Esta tinción evita el uso de bromuro de etidio resultado más segura su manipulación y descarte de los materiales usados. Los productos amplificados se visualizaron a través de transiluminador UV (g).

Cuadro 2. Secuencias, ubicación y tamaño de los amplificadores según los cebadores utilizados en el PCR anidado. (*)

Cebador	Secuencia 5' -3'	Localización (**)	Longitud del fragmento (pb)
PR	GTGCCAAGTCTCCCAGATACA	5035-5055	427 pb
PF	TATAGCACAGTCTGGGAAGGC	5462-5442	
PNR	CTGTAAATGGCTATCCTAAGATCTACTGGC	5065-5094	340 pb
PNF	GAGAGAGGGAACCCAGTCACTGTTCAACTG	5405-5376	

(*) Ballagy-Pordany y col, 1992.

(**)Sagata y col, 1985

8. RESULTADOS

8.1. PCR EN MUESTRAS DE SANGRE DE VACAS

De las 19 muestras de sangre obtenidas de las vacas, en 13 se observaron bandas del tamaño esperado por lo que se consideraron muestras positivas a Leucosis Bovina Enzoótica. Las muestras positivas a PCR lo fueron en la segunda amplificación, mientras que tres de ellas también se amplificaron en la primera (n= 6, 7 y 18). El uso de la PCR anidada aumentó la sensibilidad de la prueba detectando un 53% más de muestras positivas comparando con el uso de un solo par de cebadores. La muestra control positiva evidenció una banda del tamaño esperado en la segunda amplificación, no observándose ninguna reacción en ninguna etapa en el control negativo. De esas 13 muestras positivas hubo 6 que mostraron ser muy fuertemente positivas.

Cuadro 3. Resultados obtenidos por la técnica PCR en las muestras sanguíneas analizadas según identificación del animal.

Identificación animal (n° caravana)	ELISA	PCR	PCR anidado
25160271	+	-	+
123673182	+	-	+
70398258	+	-	+
17668434	+	-	-
23436475	+	-	+
5804	+	+	+
15324178	+	+	+
23436482	+	-	+
18269191	+	-	-
14897964	+	-	-
25160295	+	-	-
22569737	+	-	-
14897949	+	-	+
87799774	+	-	+
23673155	+	-	+
23673160	+	-	+
25160277	+	-	-
23673172	+	+	+
10637189	+	-	+

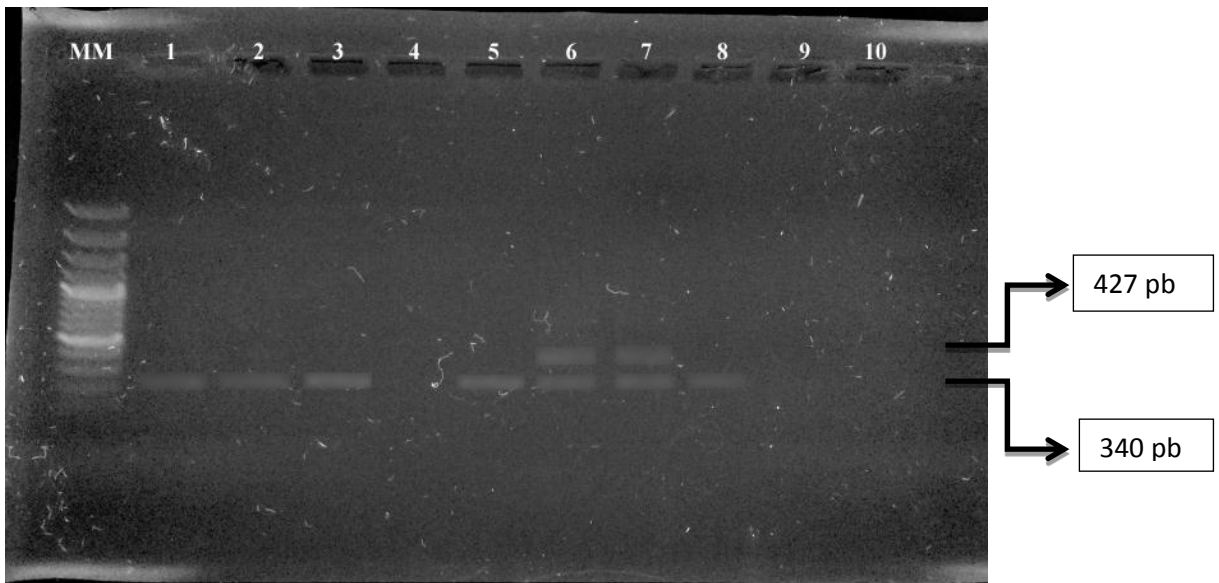


Figura 1. Resultados de PCR de sangre de vacas (muestras n°1 a n°10)

Electroforesis en Gel de agarosa al 1.5% de 10µl del ADN amplificado del virus de leucosis bovina con 2 pares de cebadores. En la mayoría de las calles se visualizan la segunda amplificación, (340 pb). En las calles 6 y 7, se observan ambas amplificaciones (427 y 340 pb). En las calles 4, 9 y 10 no se observa amplificación del ADN del virus

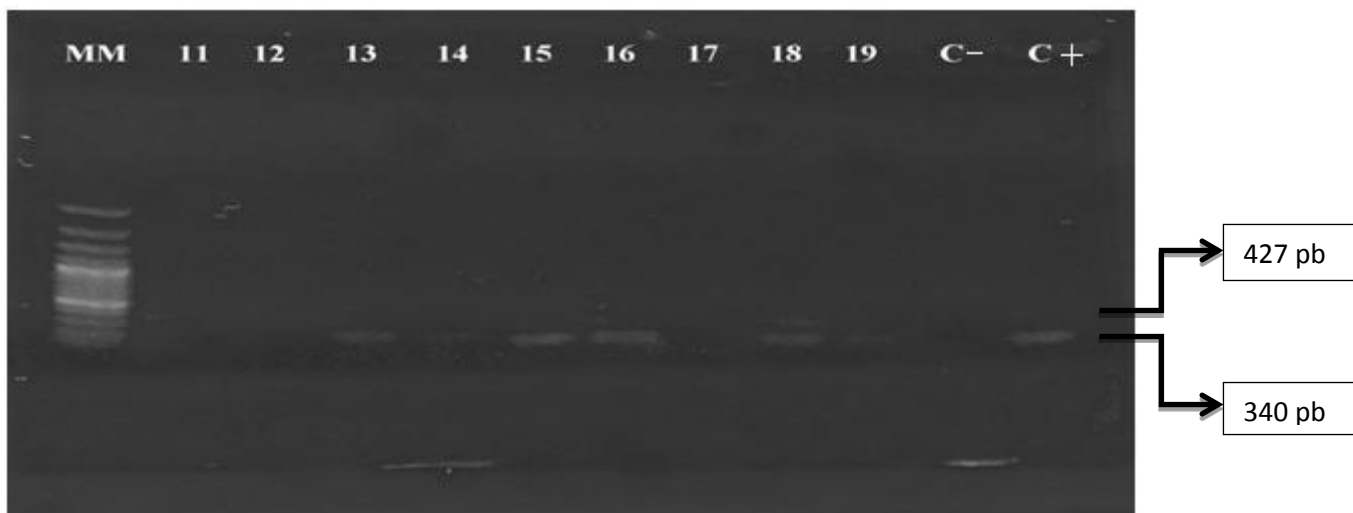


Figura 2. Resultados de PCR de sangre de vacas (muestras n°11 a n°19, control positivo y negativo).

Electroforesis en Gel de agarosa al 1.5% de 10µl del ADN amplificado del virus de leucosis bovina con 2 pares de cebadores. En la mayoría de las calles se visualizan la segunda amplificación, (340 pb). En la calle 18, se observan ambas amplificaciones (427 y 340 pb). En las calles 11, 12 y 17 no se observa amplificación del ADN del virus. En la calle 20 se encuentra el control negativo, y en la calle 21 se ve el control positivo.

8.2. PCR EN MUESTRAS DE MOSCAS

De las muestras analizadas el 10,5% (2 en 19) de ellas fueron consideradas positivas al observar bandas del tamaño esperado en la segunda amplificación (n° 1 y 15). Las dos muestras corresponden a insectos extraídos de dos vacas que resultaron positivas a PCR. La muestra control positiva evidencio una banda del tamaño esperado en la segunda amplificación, no observándose ninguna reacción en ninguna etapa en el control negativo.



Figura 3. Resultados de PCR de muestras de moscas (muestras n° 1 a n° 11)

Electroforesis en Gel de agarosa al 1.5% de 10µl del ADN amplificado del virus de leucosis bovina con 2 pares de cebadores. Se visualizan dos bandas representando la amplificación del provirus de LBE presente en la *Haematobia irritans* en las calle 1.

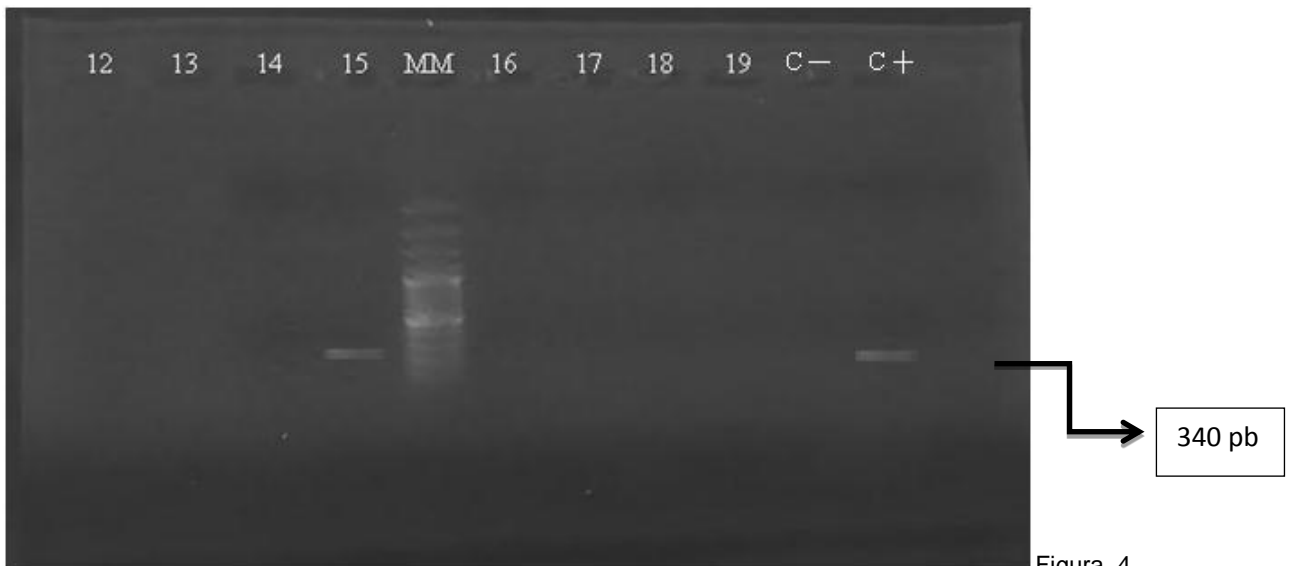


Figura 4. Resultados de PCR de moscas (muestras n° 12 a n° 19, control positivo y negativo).

Electroforesis en Gel de agarosa al 1.5% de 10µl del ADN amplificado del virus de Leucosis Bovina con 2 pares de cebadores. Se visualizan dos bandas representando la amplificación del provirus de LBE presente en la *Haematobia irritans* en las calle 15, control negativo en la calle 20 y control positivo en la calle 21.

9. DISCUSIÓN

En este trabajo de las muestras de sangre analizadas correspondientes a vacas seropositivas, el 68,4% resultó positivo también por PCR. Varias causas pueden directa o indirectamente influenciar en la detección del provirus de LBE tales como el estado de infección, interacciones entre el huésped y el virus incluyendo el número de células infectadas o el número de copias de ADN proviral por célula, la regulación de la expresión de anticuerpos del virus, y la respuesta inmune (Cockerell y col 1988).

Murtaugh et al. (1991), realizó un estudio en donde no logró encontrar el VLB en los linfocitos circulantes mediante PCR de vacas seropositivas, y concluyó que el virus podría estar secuestrado en los tejidos linfoides y no ser detectado en la circulación

Por otra parte, Klintevall y col (1994), en un trabajo experimental detectaron la presencia de ADN proviral en 9 de 11 muestras positivas. La explicación más lógica según el autor, fue que el virus pudo haber quedado atrapado en el tejido del órgano del animal del cual se filtra la sangre infectada. En el mismo trabajo se demostró también que la técnica PCR dio resultado negativo cuando se realizó en sangre, siendo que al hacerlo sobre células directas del bazo del animal, el provirus de LBE fue detectado. Este fenómeno indicaría que en un animal, a pesar de estar infectado, podría no ser detectado el virus en sangre. Otra explicación de porqué muestras de sangre positivas a ELISA nos dieron como negativas a la técnica de PCR puede ser explicada mediante un trabajo de Camargos y col (2007), en el cual algunas muestras de PCR le dieron negativas, habiendo sido positivas a las técnicas serológicas de ELISA y AIGD. En él, explican que este fenómeno se puede deber a un bajo nivel de linfocitos infectados, baja concentración de ADN proviral de LBE en linfocitos infectados, infección restringida a órganos linfoides, y a la posible presencia de inhibidores de la ADN Taq polimerasa.

Felmer y col (2006), realizaron un estudio comparativo entre PCR anidado como método directo, y ELISA y AGID como método indirecto para la detección de la infección de LBE, en el cual se dieron tres muestras negativas a PCR que

habían sido positivas a las otras dos técnicas. La ausencia del provirus de LBE en linfocitos sanguíneos, fue a causa de una infección restringida a órganos linfoides. Otros trabajos concluyen que las variaciones de la secuencia nucleotídica de algunos aislados del virus podrían inducir errores en la hibridación de los oligonucleótidos utilizados como cebadores, disminuyendo consecuentemente la sensibilidad del PCR (Marsolais y col 1994; Fechner y col 1996; Klintevall y col, 1994).

Otro factor que podría haber influido en nuestro resultado serían fluctuaciones en el número de linfocitos infectados, por la ubicación de los mismos en el huésped o porque existan variaciones genéticas en el virus que afecten el reconocimiento del ADN viral por los cebadores usados en la PCR (Camargos y col, 2007 Petruska y col., 1988).

Una consideración muy importante a tener en cuenta en los resultados al utilizar la técnica de PCR, son los pares de cebadores empleados en el experimento. Marsolais y col (1994) muestran la importancia y dependencia del diseño del set de cebadores utilizado en PCR para la identificación del ADN del provirus de LBE. Se demostró que se obtenían resultados divergentes utilizando distintos sets de cebadores, sugiriendo variación de las secuencias nucleótidas de los virus aislados. Las variaciones en las secuencias de nucleótidos podrían afectar la eficiencia de anillado durante la amplificación o de la identificación de los sitios de restricción por la alta tasa de mutación y variación que presentan los retrovirus (Murtaugh y col., 1991).

En nuestro trabajo se emplearon dos pares de cebadores dirigidos a la secuencia del gen *env.gp51*, por ser una región altamente conservada en los diferentes aislamientos de provirus de LBE (Fechner y col, 1997), sin embargo, de acuerdo con estos autores, la sensibilidad podría aumentarse al utilizar cebadores de otras regiones del genoma viral, aunque la sensibilidad de la técnica de PCR no es del 100% (Eaves y col., 1994; Jacobs y col., 1992).

Algunas investigaciones sugieren que los resultados negativos obtenidos por PCR serían atribuibles a bajas cantidades de provirus en los linfocitos de los animales infectados. Otros autores mencionaron la existencia de los llamados

provirus defectuosos, cuyos genomas presentan deleciones genómicas (Ogawa y col., 1987).

Se han realizado varias investigaciones con respecto a la transmisión de virus animales por parte de tábanos, mosca del cuerno y la mosca del establo, ya que son especies hematófagas (Bech-Nielsen, 1978., Buxton y col, 1982).

Con respecto a la posible transmisión del VLB por insectos hematófagos existen varios antecedentes de trabajos realizados con modelos experimentales tanto ovinos como bovinos detectando indirectamente la trasmisión del virus (Hasselschert y col 1993; Buxton, 1985; Foil y col, 2000; Bech-Nielsen, 1978). En cambio en este trabajo el objetivo fue demostrar la presencia del provirus de LBE en forma directa a partir de la mosca *Haematobia irritans*.

L.J. Perino (1990), en su trabajo experimental utilizó ovejas las cuales fueron inoculadas inmediatamente con parte de aparato bucal de moscas *Stomoxys calcitrans*, generando anticuerpos contra LBE, en cambio aquellas en las cuales se demoró más de una hora, no generaron anticuerpos contra el virus. Esto podría ser un motivo que explique los resultados negativos a PCR, al no poder comprobar el momento en que las mismas se alimentaron y el tiempo transcurrido sobre el animal. Es sabido que la mosca de los cuernos es constantemente interrumpida al alimentarse de sangre, y por lo general lo hacen en varias oportunidades de a pequeñas cantidades (Buxton y col., 1985).

Los animales con linfocitosis persistentemente se caracterizan por tener un recuento elevado de linfocitos circulando en sangre, entre los cuales al menos un 30% de ellos está contaminado con el provirus de LBE, y que al ingresar a un animal son la fuente de contagio. Mammerick (1987), utilizó en su trabajo de trasmisión del VLB dos vacas, ambas positivas: una persistentemente infectada con alto recuento de linfocitos y otra con un cuadro de sangre normal. La vaca persistentemente infectada con 1µl de sangre ya era suficiente para causar infección a otro animal, mientras que de la otra se necesitó 1ml para lograr infección. Esto nos hace pensar que en este estudio pudo haber sucedido que las muestras negativas, tanto de sangre como de moscas, hayan sido extraídas de vacas con bajo nivel de linfocitos infectados en circulación.

Algunos parásitos han desarrollado moléculas para impedir la formación de coágulos de fibrina generados por el animal. En el caso particular de la mosca de los cuernos, se ha aislado una proteína inhibidora de la formación de trombina, bloqueando así el clivaje del fibrinógeno. También se detectó una enzima en la saliva de las moscas necesaria para la digestión de la sangre. Estas enzimas y moléculas encontradas podrían ser inhibitorias para el virus y alterar los resultados (Zhang et al. 2002. Cupp y col 1998).

Si bien en este estudio se consideraron las muestras positivas por tamaño esperado y comparación con la muestra control positiva, posteriores estudios moleculares de secuenciación permitirán confirmar estos resultados y caracterizar genómicamente los provirus detectados.

10. CONCLUSIONES

En este trabajo se pudo comprobar por primera vez, la presencia del provirus de LBE directamente en la mosca *Haematobia irritans*. Teniendo en cuenta la alta carga parasitaria que tiene nuestro ganado, este resultado resulta fundamental al considerar el papel de la mosca del cuerno en la transmisión del virus de LBE.

En el momento de instrumentar medidas de control a nivel predial para LBE es importante también el control de esta parasitosis tan frecuente en el ganado lechero y que muchas veces no se tiene en cuenta al implementar planes sanitarios con respecto a Leucosis Bovina Enzoótica. Minimizando la carga parasitaria en animales, no solamente se pueden evitar las pérdidas ocasionadas directamente por la parasitosis, sino también disminuir la posible transmisión de enfermedades infectocontagiosas, con el consiguiente beneficio para el animal y para la producción del rodeo.

El método de extracción de ADN utilizado, diseñado específicamente para artrópodos, resultó ser rápido y eficaz permitiendo procesar un alto número de muestras al mismo tiempo en corto plazo.

La sensibilidad del PCR utilizando la región *env* del provirus demostró ser mayor utilizando dos pares de cebadores (PCR anidado) frente al uso de un solo par, aumentando el número de muestras positivas en un 53%.

Este trabajo servirá de base para nuevos estudios dentro de esta línea de investigación sobre Leucosis Bovina Enzoótica, sus vías de transmisión y la instrumentación de eficientes medidas de control y/o erradicación, de fundamental importancia para nuestro país.

11. LISTA DE PROVEEDORES

- a. Quick-gDNAMiniPrep- Zymo Research Corp. www.zymoresearch.com
- b. ZR Tissue & Insect DNA MiniPrep™. Zymo Research Corp. www.zymoresearch.com
- c. PCR Master Mix (2x). Thermo Scientific. www.thermoscientific.com/onebio
- d. PerkinElmer Gene Amp 2400 PCR System.
- e. Thermo Scientific GeneRuler 100 bpPlus DNA Ladder. www.thermoscientific.com/onebio
- f. SYBR Safe DNA gel stain. www.lifetech.com/support
- g. TFX-20M Life technologies™ Gibco BRL UV Transilluminator.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Anziani, O.S. (2011). Ficha 2: Mosca de los cuernos (Haematobia Irritans) (biología, importancia económica, aspectos epidemiológicos y tendencias estacionales en el área central de la Argentina, control). Disponible en: <http://inta.gob.ar/documentos/ficha-2-mosca-de-los-cuernos-haematobia-irritans-biologia-importancia-economica-aspectos-epidemiologicos-y-tendencias-estacionales-en-el-area-central-de-la-argentina-control>. Fecha de consulta: 1/6/2011.
2. Baldacchino, F., Muenworn, V., Desquesnes, M., Desoli, F. (2013) Transmission of pathogens by Stomoxys flies (Diptera, Muscidae): a review. Parasite Journal. p. 20-26. Disponible en www.parasite-journal.org fecha de consulta: 17/12/2015.
3. Ballagi-Pordany, A., Klintevall, K., Merza, M., Klingeborn, B., Belak, S. (1992). Direct detection of bovine leukaemia virus infection: practical applicability of a double polymerase chain reaction. J. Vet. Med. (B). 39: 69-77.
4. Bech-Nielsen, S., Piper, C.E., Ferrer, J.F., (1978). Natural mode of transmission of the bovine leukemia virus: Role of blood-sucking insects. Am. J. Vet. Res., 39: 1089- 1092.
5. Beier, D. (2008). Enzootic Bovine Leucosis. En: Vallat, B. Manual of diagnostic test and vaccines for terrestrial animals (mammals, birds and bees). 2a ed. Paris, Ed. OIE, p. 723-738.
6. Belak, S., Ballagi-Pordany, A., (1993). Experiences on the application of the polymerase chain reaction in diagnostic laboratory. Moll Cell. Probes, 7: 241-248.
7. Betancur, C., Rodas, J. (2008). Seroprevalencia del virus de la leucosis viral bovina en animales con trastornos reproductivos de Montería. Rev. MVZ Córdoba. 13(1):1197-1204.
8. Brandon, R., H. Naif, R. C. W. Daniel, M. F. Lavin, (1991). Early detection of bovine leukosis DNA in infected sheep using the polymerase chain reaction. Res. Vet. Sci. 50: 89-94.
9. Brenner, J., Meiron, R., Avraham, R., Savir, S., Trainin, Z. (1988). Trial of two methods for the eradication of bovine leucosis virus infection from two large dairy herds in Israel. Isr. J. Vet. Med, 44(3): 168-175.

10. Bruce WG. (1938). A practical trap for the control of horn flies on cattle. *J. Kansas Ent. Soc.* 11: 88–93.

11. Burny, A., Cleuter, Y., Kettmann, R., Mammerickx, M., Marbaix, G., Portetelle, D., Van den Broeke, A., Willems, L., Thomas, R. (1988). Bovine leukemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 32:149-70.

12. Butler JF, Kloft WJ, Dubose LA, Kloft ES. (1977). Recontamination of food after feeding a 32P food source to biting Muscidae. *J. Med. Entomol.* 13:567-571.

13. Buxton, B., Schultz, R., Collins, W. (1982). Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potential for transmission by mosquitoes. *Am. J. Vet. Res.*, 43: 1458-1459.

14. Buxton, B. A., Hinkle, N. C., Schultz, R. D. (1985). Role of insects in the transmission of bovine leukosis virus: potential for transmission by stable flies, horn flies, and tabanids. *Am. J. Vet Res.*, 46(1): 123-126.

15. Byford, R.L., Craig, M.E., Crosby, B.L. (1992) A Review of Ectoparasites and Their Effect on Cattle Production. *J. Anim. Sci.* 70: 597-602.

16. Camargos, M.F., Feliziani, F., De Giuseppe, A., Lessa, L.M., Jenner K. P. Reis, Rômulo C. Leite RPCV(2007). Evaluation of diagnostic tests to bovine leukemia virus. *Rev. Cienc. Vet.* 102(561-562):169-173.

17. Campbell, J.B. (1976) Effect of Horn Fly Control on Cows as Expressed by Increased Weaning Weight of Calves. *Entomology.* 69:711.

18. Carballo M. (1993). Dípteros picadores y perturbadores. Nari, A., Fiel, C En: *Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos, bases epidemiológicas para su prevención y control.* (ed) Montevideo: Hemisferio Sur., p. 441-457.

19. Chamizo Pestana, E.G. (1995). Leucosis Bovina Enzoótica. En: *Patología Especial y Diagnóstico de las Enfermedades de los Animales Domésticos.* Ciudad UABC, Mexicali. p.78-81.

20. Chamizo, E.G. (2005). Leucosis Bovina Enzoótica: Revisión. *REDVET.* 6(7):2-25. Disponible en:

<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n070705/070516.pdf>. Fecha de consulta: 45/05/15.

21. Chmelar, J., Calvo, E., Pedra, J. H. F., Francischetti, I. M. B., Kotsyfakis, M. (2012). Tick salivary secretion as a source of antihemostatics. *Journal of Proteomics*, 75(13): 3842–3854.
22. Cockerell, G.L., Rovnak, J. (1988). The correlation between the direct and indirect detection of bovine leukemia virus infection in cattle. *Leuk Res.* 12: 465-469.
23. Collazo, L., Sienna, R., Irabuena, O., Guarino, H., Navarro, M., Lavarello, L. (2002) Estudio Epidemiológico de la Leucosis Bovina Enzoótica en Ganado Lechero. XXX Jornadas Uruguayas de Buitaría. Paysandú, Uruguay. p. 322-325.
24. Cupp, E. W., Cupp, M. S., Ribeiro, J. M. C., Kunz, S. E. (1998). Blood-feeding strategy of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae). *J Med Entomol*, 35(4): 591-595.
25. Demarco, D.G., de la Orden, J.L. (2004). Efecto de la utilización de caravanas insecticidas en el control de la mosca de los cuernos y su impacto en la ganancia diaria de peso en novillos. Disponible en: www.produccion-animal.com.ar. Fecha de consulta: 6/7/2015.
26. De la Sota, M.D. (2005). Manual de procedimientos Leucosis Bovina Enzoótica, Dirección Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria, SENASA, Argentina. Disponible en: http://www.intranet.senasa.gov.ar/intranet/imagenes/archivos/dnsa/manuales_de_procedimiento/09%20Leucosis.pdf Fecha de consulta: 25/05/15.
27. Dequiedt, F.; Hanon, E.; Kerkhofs, P.; Pastoret, P.P.; Portelle, D.; Burny, A.; Kettmann, R.; Willems, L. (1997). Both Wild-Type and Strongly Attenuated Bovine Leukemia Viruses Protect Peripheral Blood Mononuclear Cells from Apoptosis. *J Virol.* 71(1):630-9.
28. DiGiacomo, R.F. (1992). Horizontal transmission of the Bovine Leukemia virus. *Vet. Med.* 87(3):263-271.

29. Dimmock CK, Chung YS, Mackenzie AR. (1991). Factors affecting the Natural transmission of bovine leukaemia virus infection in Queensland dairy Herd. *Austr.Vet.J.* 68(7):230-233.
30. Dus Santos, M.J., Trono, K., Lager, I., Wigdorovitz, A. (2007). Development of a PCR to diagnose BLV genome in frozen semen samples. *Vet. Microbiol.* 119(1): 10-18.
31. Eaves, F. W., Molloy, J.B., Dimmock, C.K., Eaves, L.E., (1994). A field evaluation of the polymerase chain reaction procedure for the detection of bovine leukaemia virus proviral DNA in cattle. *Vet. Microbiol.* 39: 313-321.
32. Escandón, A.M., (2011). Monografías de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Lengua Azul en Bovinos Hospederos y Transmisión Epidemiológica. Disponible en: <http://dspace.ucuenca.edu.ec/handle/123456789/3058>. Fecha de consulta 21/4/15.
33. Estrada, I., Ortiz, M.A., Preciado de la Torre, JF., Rojas, EE., Alpirez, F., Ortiz, R., Vega, CA., Rodriguez Camarillo, SD., (2014). Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Parasitología Veterinaria Jiutepec, Morelos, Octubre 2014 Folleto Técnico Núm. 8 Disponible en: http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/xmlui/bitstream/handle/123456789/4289/010208159700066362_PAVET.pdf?sequence=1. Fecha de consulta 24/12/15.
34. Evermann, J.F., DiGiacomo, R.F., Ferrer, J. F., Parish, S. M. (1986). Transmission of bovine leukosis virus by blood inoculation. *Am. J. Vet. Res.* 47: 1885-1887
35. Evermann, J.F., Jackson, MK. (1997). Laboratory diagnostic test for retroviral infections in dairy and beef cattle. *Vet .Clin. North Am Food Anim Pract.* 13(1):87-106.
36. Fechner, H., Kurg, A., Geue, L., Blankenstein, P., Mewes, G., Ebner, D., Beier, D., (1996). Evaluation of polymerase chain reaction (PCR) application in diagnosis of bovine leukaemia virus (BLV) infection in naturally infected cattle. *ZentralblVeterinarmed B.* 10: 621-30.
37. Fechner, H., Blankenstein, P., Looman, A. C., Elwert, J., Geue, L., Albrecht, C., Ebner, D. (1997). Provirus variants of the bovine leukemia

- virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle. *Virology*. 237(2): 261-269.
38. Felmer, R., Zúñiga, J., Recabal, M. (2006). Estudio comparativo de un PCR anidado, ELISA, IDGA en la detección del virus de la leucosis bovina en muestras de leche, sangre y leche. *Arch. Med. Vet.* 38(2):137-141.
 39. Fenner, F., Bachmann, P., Gibbs, E., Murphy, F., Studdert, M., White, D. (1992). Retroviridae. En: Fenner y col. *Virologia Veterinaria*. Zaragoza. Acribia. p. 571- 600.
 40. Ferrer, J.F., Piper, C.E. (1978). An Evaluation of the Role of Milk in the Natural Transmission of BLV. *Ann Rech Vet.* 9(4): 803-807.
 41. Ferrer, J.f.; Marshak, R.R.; Abt, D.A.; Kenyon, S.J. (1978). Persistent lymphocytosis in cattle: its cause, nature and relation to lymphosarcoma. *Ann Rech Vet.* 9(4):851-7.
 42. Ferrer, J.F. (1980). Bovine lymphosarcoma. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 24:1-68.
 43. Ferrer, J.F. Piper, C.E. (1981). Role of colostrum and milk in the natural transmission of the bovine leukemia virus. *Cancer. Res.* 41: 4906–4909.
 44. Ficha INTA. Disponible en : <http://inta.gob.ar/documentos/ficha-2-mosca-de-los-cuernos-haematobia-irritans-biologia-importancia-economica-aspectos-epidemiologicos-y-tendencias-estacionales-en-el-area-central-de-la-argentina-control/>. Fecha de consulta: 1-6-2015.
 45. Foil LD, Gorham JR. (2000). Mechanical transmission of disease agents by arthropods. *Medical Entomology: a textbook on public health and veterinary problems caused by arthropods*. Kluwer Academic. Springer Netherlands. p 461–514.
 46. Fulton, B.E., Portella, M., Radke K. (2006). Dissemination of Bovine Leukemia Virus-Infected Cells from a Newly Infected Sheep Lymph Node. *J. Virol.* 80(16):7873- 7884.

47. Furtado, A., Rosadilla, D., Franco, G., Piaggio, J., Puentes, R. (2013). Leucosis Bovina Enzoótica en Cuencas Lecheras de Productores Familiares del Uruguay. *Veterinaria*. 49(191):23-29.
48. García, C. A., Salas, S. C., Osti, J. L., & Vázquez, Z. G. (2001). Dinámica poblacional de *Haematobia irritans* en un hato de bovinos de Soto la Marina, Tamaulipas, México. *Vet. Méx*, 32(2): 149-152.
49. Garifas, C.R.B; Rodriguez Camarillo, S. (2010). Control Integrado de Garrapatas y enfermedades que Transmiten en Ganado Bovino, Babesiosis y Anaplasmosis. Folleto N°10. Disponible en: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/3123/CONTROLINTEGRADODEGARRAPATA.pdf?sequence=1> . Fecha de consulta 12/4/15.
50. Gillet, N., Florins, A., Boxus, M., Burteau, C., Nigro, A., Vandermeers, F., Balon, H. Bouzar, A.B., Defoiche, J., Burny, A., Reichert, M., Kettmann, R., Willems, L. (2007). Mechanisms of Leukemogenesis Induced by Bovine Leukemia Virus: Prospects for Novel anti-retroviral Therapies in Human Retrovirology. 4:18.
51. González, E.T., Olivia, G.A., Varela, A., Bonzo, E., Licursi, M., Etcheverrigaray, M.E. (2001). Leucosis Enzoótica Bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Analecta Veterinaria*. 21(2):12-20.
52. Guarino H, Saizar J, Sienna R. (1989). Comparación de las técnicas de Inmunodifusión en Gel Agar (IDGA) e Inmunoenzimáticas (ELISA), en el diagnóstico serológico de la Leucosis Bovina Enzoótica. XVII Jornadas Uruguayas de. Buiatría, Paysandú, Uruguay. c.c.4:1-7.
53. Guarino, H. (2001). Plan Piloto de Monitoreo en Lechería. Principales Enfermedades Infecciosas en la Cuenca Lechera de Florida. *Rev. Plan Agrop.* (Montevideo). 96:46-48.
54. Guglielmone, A. A., Gimeno, E., Idiart, J., Fisher, W. F., Volpogni, M. M., Quaino, O., Warnke, O. (1999). Skin lesions and cattle hide damage from *Haematobia irritans* infestations. *Medical and Veterinary Entomology*, 13(3): 324–9.
55. Guglielmone, A.A.; Kunz, S.E.; Volpogni, M.M.; Kammlah, D.; Martins, J.R.; Mattos; C.; Aguirre, D.H.; Suárez, V.R.; Anziani, O.S.; Mangold, A.J. (2000). Susceptibilidad al diazinón de la *Haematobia irritans*

- (Diptera: Muscidae) de diferentes localidades argentinas y del sur de Brasil, Argentina. *Rev. Med. Vet. (Bs.As.)*, 81(3): 184-186.
56. Hamilton, V.T.; Stone D.M; Cantor, G.H. (2003). Translocation of the B cell receptor to lipid rafts is inhibited in B cells from BLV-infected, persistent lymphocytosis cattle. *Virology* 315(1):135-47.
57. Hargett, L., Goulding, R. L. (1962). Studies on The Behavior of the Horn Fly. Technical Bulletin 61 Eds. Agricultural Experiment Station, Oregon State University Corvallis, p. 3-26
58. Hasselschwert, D., French, D., Hribar, D., Luther, L., Leprince, D., Van der Maaten, M.J., Whetstone, C., Foil, L. (1993). Relative suseptibility of beef and dairy calves to infection by bovine leukemia virus via tabanid (Diptera: Tabanidae) feeding. *J Med Entomol* 30: 472-473.
59. Haufe, W. (1982). Growth of range cattle protected from horn flies *Haematobia irritans* by ear tags impregnated with fenvalerate. *Canadian J. Anim. Sci.* 62: 567–573.
60. Hopkins SG, Evermann JF, DiGiacomo RF, Parish, Ferrer, Smith, Bangert (1988). Experimental transmission of bovine leukosis virus by simulates rectal palpation. *Vet Rec* 122:389-391.
61. Hopkins, S.G., DiGiacomo R.F. (1997). Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *Vet. Clin. North Amer. Food Anim. Pract.* 13:107-128.
62. Jacobs, R. M., Heeney, J. L., Godkin, M. A., Leslie, K. E., Taylor, J. A., Davies, C., & Valli, V. E. O. (1991). Production and related variables in bovine leukaemia virus-infected cows. *Vet Res Comm*, 15(6): 463-474.
63. Jacobs, R., Song, Z., Poon, H. (1992). Proviral detection and serology in bovine leukemia virus-exposed normal cattle and cattle with lymphoma. *Can J Vet Res* 56:339–348.
64. Jacobs, M., Franklin, L., McNab, W.B., Jefferson, B. (1995). A Serological Survey of Bovine Syncytial Virus in Ontario: Associations With Bovine Leukemia and Immunodeficiency-Like Viruses, Production Records, and Management Practices. *Can. J. Vet. Res*; 59(4): 271-278.

65. Jensen, K., Jespersen, J. B., Birkett, M. A., Pickett, J. A., Thomas, G., Wadhams, L. J., & Woodcock, C. M. (2004). Variation in the load of the horn fly, *Haematobia irritans*, in cattle herds is determined by the presence or absence of individual heifers. *Medical and Veterinary Entomology*, 18(3): 275-280.
66. Johnson R, Gibson C, Kaneene J. (1985). Bovine leukaemia virus: a herd- based control strategy. *Prev Vet Med* 3: 339-342.
67. Johnson, R., Kaneene, J.B. (1992). Bovine leukaemia virus and enzootic bovine leukosis. *Vet. Bull.* 62:287-312.
68. Kaaden, O.R.; Lange, S.; Romanowski, W.; Marré, H.; Pfeilsticker, J.; Roselius, R. (1982). Transient viraemia with bovine leukaemia virus in bulls. *Zentralbl. Veterinarmed.* 29(4): 269-274.
69. Kaja, R. W., Olson, C. (1982). Non-infectivity of semen from bulls infected with bovine leukosis virus. *Theriogenology*, 18(1): 107-112.
70. Kale, M., Bulut, O., Yapkic, O., Gulay, M.S., Pehivanoglu, F., Ata, A., Yavru, S. (2007). Effects of subclinical bovine leukemia virus infections on some production parameters in a dairy farm in southern Turkey. *Tdyskr. J. South Afr Vet Assoc.* 78(3):130-132.
71. Kettmann; R.; Deschamps; J.; Cleuter; Y.; Couez; D.; Burny; A.; Marbaix; G. (1982). Leukemogenesis by bovine leukemia virus: Proviral DNA integration and lack of RNA expression of viral long terminal repeat and 3' proximate cellular sequences. *Proc. NatL. Acad. Sci. USA* 79:2465-2469.
72. Klintevall, K., Naeslund, G. Svedlund, L. Hajdu, N. Linde, and B. Klingeborn, (1991). Evaluation of and indirect ELISA for detection of antibodies to bovine leukaemia virus in milk and serum. *J. Virol. Meth.* 33: 319-333.
73. Klintevall, K., A. Ballagi-Pordany, K. Naslund, S. Black. (1994). Bovine leukaemia virus: Rapid detection of proviral DNA by nested PCR in blood and organs of experimentally infected cattle. *Vet. Microbiol.* 42: 191-204.
74. Krinsky, W.L. (1976). Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). *J Med Entomol*, 13: 225–275.

75. Kunz, S. E., Miller, J. A., Sims, P. L., Meyerhoeffer, D. C. (1984). Economics of controlling horn flies (Diptera Muscidae) in range cattle management. *J. Econ. Entomol.*, 77: 657- 660.
76. Kunz, S.E., Kemp, D.H.(1994). Insecticides and acaricides: resistance and environmental impact. *Rev. Sci. Tech.Off. Int. Epizoot.* 13: 1249–1286.
77. Lassauzet, Thurmond, Johnson, Stevens, Picanso. (1990). Effect of brucellosis vaccination and dehorning on transmission of bovine leukemia virus in heifers on a California dairy. *Can J Vet Res* 54:184-191.
78. Luciw, P., Leung, N. (1992). Mechanisms of Retrovirus Replication. En: Luciw, P., Leung, N. *The Retroviridae*. New York, Plenum, p.159-298.
79. Mammerrickx, M., Portetelle, D., de Clercq, K, Burny, A. (1987). Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leuk. Res.* 11:353-358.
80. Manet, G., Guilbert, X., Roux, A., Vuillaume, A., Parodi, A.L. (1989). Natural Mode of Horizontal Transmission of Bovine Leukemia Virus (BLV): the Potential Role of Tabanids (*Tabanus* spp.). *Vet Immunopathol* 22: 255-263.
81. Martin, D., Arjona, A., Soto, I., Barquero, N., Viana, M., & Gómez-Lucía, E. (2001). Comparative study of PCR as a direct assay and ELISA and AGID as indirect assays for the detection of bovine leukaemia virus. *J Vet Med, Series B*, 48(2): 97-106.
82. Marsolais, G., Dubuc, R., Bergeron, J., Morrey, J.D., Kelly, E.J., Jackson, M.K. (1994). Importance of Primer Selection in the Application of PCR Technology to the Diagnosis of Bovine Leukemia Virus. *J Vet Diagn Invest* 6:297-30.
83. McCluskey, B.J. (2002). Biosecurity for Arthropod-Borne Diseases. *Vet. Clin. North Amer Food Anim Pract.* 18: 99-114.
84. Mederos, A., Irigoyen, D. (1998). Relevamiento Epidemiológico de Diarrea Viral Bovina, Rinotraqueítis Infecciosa Bovina y Leucosis Bovina

en Predios Lecheros del Nordeste del Uruguay. XXVI Jornadas Uruguayas de Buiatría. Paysandú, Uruguay. P. 19-20.

85. MERCOSUR/GMC/RES N°9/96. Normas sanitarias para la importación y exportación de animales bovinos y bubalinos entre los estados parte del MERCOSUR. Buenos Aires, 13 p. Disponible en: http://www.mercosur.int/msweb/Normas/normas_web/Resoluciones/ES/Res_009_096_PDF Fecha de consulta: 18/03/15.
86. MGAP-DIEA (2014). Anuario Estadístico Agropecuario. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy> Fecha de consulta: 18/03/15.
87. MGAP, (2014). Actualización lista de enfermedades de notificación obligatoria 1° de julio 2014. Disponible en: <http://www.mgap.gub.uy/portal/afiledownload.aspx?2,6,686,O,S,0,12932%3BS%3B1%3B86>. Fecha de consulta: 20/1/2016.
88. Murtaugh, M.P., Lin, G.F., Haggard, D.L., Weber, A.F., Meiske, J.C., (1991). Detection of bovine leukemia virus in cattle by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Meth*, 33: 73-85.
89. Nari A., Fiel C., (1993). Enfermedades parasitarias de importancia económica en bovinos, bases epidemiológicas para su prevención y control. En: Torres P, Prieto O. La mosca de los cuernos. *Haematobia irritans*. Montevideo: Hemisferio Sur. p. 353-367.
90. Ogawa Y, Sagata N, Tsuzuko-Kawamura J. (1987). Structure of a defective provirus of bovine leukemia virus. *Microbiol Immunol*. 31:1009–1015.
91. OIE. Organización Mundial de Sanidad Animal (2012). Manual de las pruebas de Diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. 7a. ed. Paris, OIE, 1404 p.
92. OIE, (2014). Fichas de información general sobre enfermedades animales. Pagina disponible en: <http://www.oie.int/doc/ged/D13999.PDF>. Fecha de consulta: 14/4/15.
93. OIE (2015). Código sanitario para los Animales Terrestres. Disponible en:

http://www.oie.int/index.php?id=169&L=2&htmfile=chapitre_diagnostic_tests.htm. Fecha de consulta: 2/2/16.

94. Ohshima, K., Okada, K., Numakunai, S., Yoneyama, Y., Sato, S., Takahashi, K. (1981). Evidence on horizontal transmission of bovine leukemia virus due to blood-sucking tabanid flies. *Jpn. J. Vet. Sci.*, 43: 79-81.
95. Oyarzún, M.P., Quiroz, A., Birkett, M.A. (2008). Insecticide Resistance in the Horn Fly: Alternative control strategies. *Med. Vet. Entomol.* 22(3): 188-202.
96. Parra, L., Rojas, C., Catrileo, A., Galdames, R., Mutis, A., Birkett, M. A., Quiroz, A. (2013). Differences in the fly-load of *Haematobia irritans* (Diptera: Muscidae) on cattle is modified by endophyte infection of pastures. *Elect J Biotech.*, 16(5): 1-13.
97. Perino, L.J. DVM,; R.E. Wright,; K.L. Hoppe, MS; R.W.Fulton., (1990). Bovine Leukosis Virus Transmission With Mouthparts from *Tabanus Abactor* After Interrupted Feeding. *Am J. Vet Res*, 51(8): 1167-1169.
98. Petruska, J., Goodman, M., Boosalis, M. (1988). Comparison between DNA melting thermodynamics and DNA polymerase fidelity. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:6252–6256.
99. Pickett, J. A., Birkett, M. A., Dewhirst, S. Y., Logan, J. G., Omolo, M. O., Torto, B., & Leal, W. S. (2010). Chemical ecology of animal and human pathogen vectors in a changing global climate. *J Chem Ecol*, 36(1): 113-121.
100. Pollari FL, Waugsuphachart VL, DiGiacomo RF, Evemann JF. (1992). Effects of Bovine Leukemia virus infection on production and reproduction in dairy cattle. *Can.J.Vet.Res.* 56(4):289-295.
101. Portetelle, D., Dandoy, C., Burny, A., Zavada, J., Siakkou, H., Gras-Masse, H., Drobecq, H., Tartar, A. (1989). Synthetic peptides approach to identification of epitopes on bovine leukemia virus envelope glycoprotein gp51. *Virology.* 169:34-41.
102. Radostits, O.M., Gay, C.C., Blood, D.C., Hinchcliff, K.W., (2002), *Medicina Veterinaria, Tratado de las enfermedades del ganado bovino,*

ovino, porcino, caprino y equino., 9ª ed. Madrid, McGrawHill-Interamericana, V 2.

103. Rama, G.; Meikle A.; Puentes, R.; Moratorio G.; Nicolini, P.; Pessina P.; Furtado A.; Pritsch, O. (2010). Estudio comparativo de tres técnicas diagnósticas para la LeucosisEnzoótica Bovina y análisis del efecto de enfermedades concurrentes sobre la fórmula leucocitaria. *Veterinaria (Montevideo)*. 46: 15-22.
104. Reichert, M., Stec, J. (1999). Simultaneous use of two primer pairs increases the efficiency of polymerase chain reaction assay in the diagnosis of bovine leukemia virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.* 11: 543-547.
105. Rodríguez, S.M., Florins, A., Gillet, N., de Brogniez, A., Sánchez-Alcaraz, M.T., Boxus, M., Boulanger, F., Gutiérrez, G., Trono, K., Alvarez, I., Vagnoni, L., Willems, L. (2011). Preventive and therapeutic strategies for bovine leukemia virus: lessons for HTLV. *Viruses*. 3(7):1210-1248.
106. Romero, C. H., Cruz, G. B., Rowe, C. A. (1983). Transmission of bovine leukaemia virus in milk. *Trop Anim Health Prod*, 15(4): 215-218.
107. Sagata, N., Yasunaga, T., Tsuzuku-Kawamura, J., Ohishi, K., Ogawa, Y., & Ikawa, Y. (1985). Complete nucleotide sequence of the genome of bovine leukemia virus: its evolutionary relationship to other retroviruses. *Proc Nat. Acad Sci.* 82(3): 677-681.
108. Satragno, D. et al. (2015). Primer Brote de Leishmaniasis de Transmisión Autóctona Localidad: Arenitas Blancas, Salto. Proyecto CSIC: "Distribución y estacionalidad del vector *Lutzomyia longipalpis*". Facultad de Medicina y Facultad de Veterinaria, UdelaR. Disponible en: <http://www.vetcomunicaciones.com.ar/uploadsarchivos/informe-brote-leishmaniasis.pdf>. Fecha de consulta: 21/4/15.
109. Shettigara, P.T., Samagh, B.S., Lobinowich, E.M. (1989). Control of bovine leukemia virus infection in dairy herds by agar gel immunodiffusion test and segregation of reactors. *Can. J. Vet. Res.* 5:108-110.

110. Sienna R, Guarino H. (1991). Prevalencia de Leucosis Bovina Enzoótica en muestras de leche mezcla de tambos de Canelones, Colonia y San José, II Jornada Técnica Facultad de Veterinaria. p.41
111. Sienna R, Guarino H, Gil A, Nuñez A, Villamil J. (1996a) Leucosis Bovina Enzoótica: Efecto de la condición serológica de las vacas sobre las crías luego del nacimiento y a los 18 meses de edad. XV Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias (PANVET). Campo Grande, MS (BRASIL) p. 9-481.
112. Sienna R, Guarino H, Gil A, Nuñez A, Villamil J. (1996b) Duración de los anticuerpos calostrales contra el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica en Terneros de Campo. VI Congreso Nacional de Veterinaria. Montevideo, Uruguay.p: 11-15.
113. Sienna, R., Guarino, H., Gil, A. (2000). Influencia de la infección por el virus de la Leucosis Bovina Enzoótica sobre la Reproducción y Producción de Rodeos Lecheros. INIA. Avances de Investigación en Sanidad Animal. Serie FPTA.INIA. 1:21-38.
114. Schwinghammer, K. A. Knapp, F. W., Boling, J. A., Schillo, K. K. (1986). Physiological and nutritional response of beef steers to infestations of the horn fly (Diptera: Muscidae). J Econ Entomol, 79(4): 1010–1015.
115. Steelman, C. D., McNew, R. W., Simpson, R. B., Rorie, R. W., Phillips, J. M., & Rosenkrans, C. F. (2003). Evaluation of alternative tactics for management of insecticide-resistant horn flies (Diptera: Muscidae). J Econ Entomol, 96(3): 892-901.
116. Steelman, C. D., Gbur, E. E., Tolley, G., & Brown, A. H. (1993). Individual variation within breeds of beef cattle in resistance to horn fly (Diptera: Muscidae). Journal Medical Entomology, 30(2): 414-420.
117. Tarelli, G. (2004). Mosca de los cuernos. *Haematobia irritans* (L.). Biología, comportamiento y control. Buenos Aires, Hemisferio Sur, 57p.
118. Torres, P. R., Cicchino, A. C., Abramovich, A. H., Nuñez, J. J., & Prieto, O. H. (1993). Los enemigos naturales de *Haematobia irritans*

- (Diptera: Muscidae) en dos áreas ganaderas del Argentina. *Rev. Med. Vet, (Bs. As.)*, 75(1): 6-16.
119. Trainin, Z., Brenner, J. (2005). The direct and indirect economic impacts of bovine leukemia virus infection on dairy cattle. *Israel J. Vet. Med.* 60:94-105.
120. Trono, k. Leucosis Bovina; una amenaza silenciosa. (2011). *Producir XXI* 19(233):44-46
121. Van der Maaten, M.J., Miller, J.M. (1977). Susceptibility of cattle to bovine leukemia virus infection by various routes of exposure. *Adv. Comp. Leukemia Res.* p. 29-32.
122. Villonta G, Segovia P, Montes G, Durán Y. (1990). Duración y Títulosde anticuerpos calostrales antivírus Leucemia Bovina y Transmisión natural dela infección en terneros de un predio de la región Metropolitana, Chile.*Avan Cienc Vet.* 5(2):114-118.
123. Wentink, G.H, Oirschot, J.T., Pelgrim, W., Wensing, T., Gruys, W. (1993).Experimental transmission of Bovine Leukosis virus by rectal palpation. *Vet. Rec.* 132(6):135-136.
124. Zaffaroni, R., Piaggio, J., Núñez, A., de Freitas, J., Suanes, A., Cernicchiaro, N., Gil, A. (2007). Evolución Temporal de la Seroprevalencia de la Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) en la Cuenca Lechera Sur del Uruguay. V Jornadas Técnicas Veterinarias, Montevideo, Uruguay. p. 150-151
125. Zhang, D., Cupp, M. S., &Cupp, E. W. (2002). Thrombostasin: purification, molecular cloning and expression of a novel anti-thrombin protein from horn fly saliva. *Insect biochemistry and molecular biology*, 32(3): 321–30. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11804804>. Fecha de consulta: 11/1/2016