

• Eaglesome MD, Garcia MM, 1997. Disease risks to animal health from artificial insemination with bovine semen. Rev. sci. tech. Off. int. Epiz., 16 (1), 215-225. Madigan MT, Martinko MT, Parker J, 2003. Brock Biología de los Microorganismos. 10ª edición, Prentice-Hall, Madrid. Cap 6: Crecimiento Bacteriano, pp 137-166.

• Prescott JF, 2000. Antimicrobial therapy in veterinary medicine. 3th Edition, Iowa State University Press, USA. Editors: Prescott JF, Baggot JD, Walker RD. Cap 6, pp 105-133.
• Quinn PJ, Carter ME, Markey B, Carter GR, 2004. Clinical Veterinary Microbiology. 6th Edition, Elsevier Mosby, UK. Cap 18: Enterobacteriaceae, pp 209-236.

DETECCIÓN DEL VIRUS DE LEUCOSIS BOVINA ENZOOÓTICA EN LA MOSCA *Haematobia irritans* (MOSCA DE LOS CUERNOS) POR LA TÉCNICA DE PCR

Ana García¹, Valentina Herrera¹, Helena Guarino², Carlos Morón³.

¹Ejercicio Liberal. ²Virología. Facultad de Veterinaria Udelar. ³Clinica de Rumiantes.

RESUMEN

La Leucosis Bovina Enzoótica (LBE) es una enfermedad infecciosa producida por un virus (VLB) perteneciente a la familia Retroviridae. Es una enfermedad de difusión nacional en el rodeo lechero. 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, el linfosarcoma. 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 a un animal sano, estando implicadas prácticas de manejo y algunas prácticas veterinarias así como la acción de insectos hematófagos. El objetivo de este trabajo fue detectar la presencia del virus de LBE en *Haematobia irritans* a través de la técnica de PCR. Se analizó un total de 19 vacas (n=19) seropositivas a ELISA indirecto, se tomó una muestra de sangre de cada una y las moscas que tenían. 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. Se detectó por primera vez la presencia del VLB en la mosca *Haematobia irritans*.

SUMMARY

Enzootic Bovine Leukosis (EBL) is an infectious disease caused by a virus (VLB) belonging to the family Retroviridae. It is a disease spread nationally in the dairy herd. Most of the infected animals appear to be healthy, showing only seroconversion to the virus, with only a low percentage of them developing the lethal tumor form, lymphosarcoma. Transmission occurs horizontally and to a lesser extent (15%) vertically. In horizontal transmission it is important to transmit blood from an infected animal to a healthy animal, involving management practices and some veterinary practices as well as the action of hematophagous insects. The objective of this work was to detect the presence of the LBE virus in *Haematobia irritans* through the PCR technique. A total of 19 cows (n = 19) seropositive to indirect ELISA were analyzed, a blood sample was taken from each and the flies they had. Of the blood samples analyzed 13 were positive to VLB by PCR; And of the flies samples, two of them tested positive. Positive samples of flies coincided with cows also positive for PCR. The use of two pairs of env gene primers (nested PCR) was determined

to increase the sensitivity of the test. The presence of VLB in *Haematobia irritans* was detected for the first time.

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; Digiaco, 1992).

La LBE tiene un impacto en la salud animal por la merma en la producción, la inmunodepresión y la mortalidad así como por las restricciones a la exportación de ganado en pie.

El objetivo general 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, son insectos hematófagos, generalmente al ser interrumpidos durante su ingesta sobre un animal, vuelven al mismo pero un porcentaje se mueven a otro; y por ser una parasitosis altamente prevalente en el ganado lechero (Buxton, 1982). Los objetivos específicos fueron implementar una metodología de recolección de muestras de moscas, poner a punto la extracción de ADN viral a partir de insectos hematófagos y adecuar la técnica de PCR convencional para la detección del virus de LBE a partir del ADN extraído. La misma técnica de laboratorio se utilizó para confirmar si los animales positivos a detección de anticuerpos por ELISA lo eran también a detección viral por PCR.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se seleccionaron 19 vacas Holando seropositivas a LBE de un total de 200, provenientes de un establecimiento lechero ubicado en el departamento de San José, que se encuentra realizando, desde el año 2006, un estricto plan de control de la infección. La condición de seropositivas se estableció por pruebas anuales por la técnica de Elisa indirecto (Idexx). La sangre obtenida por venopunción coccígea, se colocó en tubos con anticoagulante (EDTA) y se guardó en freezer a -80°C hasta su procesamiento para la extracción de ADN. Las moscas se recolectaron del lomo de los animales con un calderín y depositadas en bolsas herméticas, refrigerándolas hasta su traslado al laboratorio donde se congelaron a -80°C hasta su procesamiento. Para extraer el ADN a partir de sangre entera se utilizó un kit comercial (Quick-Gdna Bloodmini Prep) mientras que a partir de las muestras de moscas se utilizó un kit comercial específico para insectos (ZR Tissue & Insect DNA MiniPrep) siguiendo las indicaciones del fabricante. Para la amplificación de las muestras de ADN pro viral se siguió el protocolo de la técnica de PCR, utilizando dos pares de cebadores de la región env del virus de LBE (cuadro 1). 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. Como control positivo se utilizó ADN extraído de la línea FLK persistentemente infectada con el VLB y como control negativo sangre de un animal negativo a repetidas pruebas de ELISA indirecto.

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

Cuadro 1. Secuencias, ubicación y tamaño de los amplificadores según los cebadores utilizados en el PCR anidado (*).

RESULTADOS

De las 19 muestras de sangre procesadas, en 13 se observaron bandas del tamaño esperado por lo que se consideraron muestras positivas a Leucosis Bovina Enzoótica. Las 13 muestras fueron positivas a 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 fuertemente positivas. De las muestras de moscas analizadas, el 10,5% (2 en 19) fue considerado positivo 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 evidenció una banda del tamaño esperado en la segunda amplificación, no observándose ninguna reacción en el control negativo en ninguna etapa.

DISCUSIÓN

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 (Buxton, 1985; Foil y col, 2000; Bech-Nielsen, 1978). En cambio en este trabajo el objetivo fue demostrar la presencia del pro virus de VLB en forma directa a partir de la mosca *Haematobia irritans*.

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).

CONCLUSIONES

Se comprobó por primera vez el virus de LBE en *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 trasmisión del virus de LBE así como al implementar planes sanitarios para LBE

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 pro virus 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%.

BIBLIOGRAFÍA

- DiGiacomo, R.F. (1992). Horizontal transmission of the Bovine Leukemia virus. *Vet. Med.* 87(3):263-271.
- Ferrer, J.F. (1980). Bovine lymphosarcoma. *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.* 24:1-68.
- 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.
- Hopkins SG, Evermann JF, Digiacomo RF, Parish,

Ferrer, Smith, Bangert (1988). Experimental transmission of bovine leukosis virus by simulated rectal palpation. *Vet Rec* 122:389-391.

- 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. 13. 7.
- 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.
- 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.
- 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.

USO DE PROTOCOLOS DE MANEJO DEL DOLOR DURANTE EL DESBOTONAMIENTO Y DESCORNE DE LAS TERNERAS DE TAMBO: ¿QUÉ TAN COMÚN ES EN URUGUAY Y ARGENTINA?

Caffarena, RD.^{1*}, Riet-Correa, F.¹, Giannitti, F.¹.

¹Plataforma de Investigación en Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), La Estanzuela, Ruta 50 km 11, Colonia (70000), Uruguay. *Correspondencia: dcaffarena@inia.org.uy.

RESUMEN

El desbotonamiento/descorne es una práctica muy difundida que facilita el manejo en los bovinos lecheros, aunque provoca estrés y dolor. Para estimar qué tan difundida es la aplicación de protocolos de manejo del dolor (analgesia/anestesia) durante esta maniobra entre veterinarios de Uruguay y Argentina, se realizó un cuestionario online distribuido por correo electrónico a ~120 veterinarios. Se obtuvieron respuestas de 33 veterinarios, 94% de los cuales realizaba o indicaba la realización de desbotonamiento/descorne en los tambos que asesoraba. El 72.7% realizaba esta práctica en las primeras 8 semanas de vida de las terneras. En el 45% de los casos la práctica era realizada por el guachero. El 51.5% de los veterinarios encuestados manifestó una baja necesidad de administrar

fármacos para mitigar el dolor durante procedimientos quirúrgicos menores. El 79% no utilizaba ningún tipo de fármaco para mitigar el dolor durante la maniobra, principalmente por el tiempo que demanda (42%) y los costos excesivos (21%). El 21% restante aplicaba antiinflamatorio no esteroideo (57%), anestésico local (29%), o la combinación de ambos (14%), principalmente con motivo de respetar el bienestar de los animales (21%) y lograr un manejo más dócil y seguro (15%). Crecientemente el mercado mundial y los consumidores exigen que se tomen medidas con respecto al bienestar animal. Países de la Unión Europea y Norteamérica han adoptado estas medidas, por lo que las demandas no tardarán en difundirse globalmente a otros países exportadores de productos animales.