

Intoxicación por *Baccharis ulicina* en bovinos para leche: reporte de caso

Poisoning by *Baccharis ulicina* in dairy cattle: case study

Delfina Balbuena¹, Juan Agustín García¹, Verónica Ispizua², Alejandro Soteras³, Germán José Cantón^{1*}. *canton.german@inta.gob.ar ¹ Instituto de Innovación para la Producción Agropecuaria y el Desarrollo Sostenible (IPADS), INTA Balcarce-CONICET, Balcarce (7620) Argentina. ² Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP), Balcarce (7620) Argentina. ³Private Veterinary.

Baccharis species are commonly known to cause severe gastrointestinal disease in ruminants. *B. coridifolia*, *B. artemisioides*, *B. vulneraria* and *B. megapotamica* poisoning have been reported in livestock from South America. Intoxication occurs mainly in animals unfamiliar with the plant (naïve animals). This work describes an outbreak of *B. ulicina* intoxication affecting dairy adult cows in Adolfo Alsina district, Buenos Aires province during the winter of 2024. Four adult Holstein cows were found dead 24h after entering a native grassland paddock with scarce forage, mainly *Stipa frígida*, and abundant presence of *B. ulicina*. Postmortem examination was carried in one of the animals and tissue samples were collected and fixed in 10% buffered formalin for histological study. Grossly, diffuse hemorrhage was evident in the rumen mucosa and submucosa and less evident in reticulum. Microscopically, severe diffuse necrotizing ruminitis was observed, with full mucosa necrosis admixed with fibrin, hemorrhage and neutrophils, and intraepithelial pustules. Reticulum showed less severe lesions. Plant samples from the paddock were identified as *B. ulicina* by the Botany Laboratory of INTA–UNMDP. The gastrointestinal toxicity caused by plants of the *Baccharis* genus are associated with the presence of macrocyclic trichothecenes produced by the fungi *Myrothecium roridum*, *M. verrucaria*, and the endophytic fungus *Ceratopichnium baccharidicola*. Particularly in Argentina, *B. coridifolia* is the only species reported as toxic, being this study the first report by *B. ulicina* in Argentina. To the best of our knowledge this is the first report of *B. ulicina* poisoning worldwide. Herein, the scarce forage availability and the presence of naïve animals could have led to its consumption and consequent gastrointestinal toxicity. Further studies are being carried out to identify the fungal species and mycotoxins involved in *B. ulicina* poisoning. It is known that some *Baccharis* species cause gastrointestinal disease but no macrocyclic trichothecenes have been identified.

Keywords: *Baccharis ulicina*; gastrointestinal poisoning, ruminants.

Detección del virus de la Leucosis bovina por Nested PCR en tanque de leche

Detection of bovine Leukemia virus by Nested PCR in bulk tank milk

Marina Maurente Berón, Natalia Olivero-Deibe, Martín Fraga, Alejo Menchaca, Caroline da Silva Silveira. mmaurente@inia.org.uy - Plataforma de Investigación en Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), Estación Experimental La Estanzuela, Colonia, Uruguay.

La leucosis enzoótica bovina es una enfermedad crónica, infecciosa y altamente contagiosa causada por el virus de la leucosis bovina (VLB). Esta enfermedad afecta negativamente a la salud, producción y reproducción principalmente de bovinos lecheros y es detectada frecuentemente en animales adultos. Debido a que la eliminación de patógenos, como el VLB, puede ocurrir a través la leche, el análisis de muestras de tanque de leche está siendo incorporada en programas de vigilancia de

enfermedades de importancia para bovinos lecheros en todo el mundo. El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de detección por *nested* PCR de células infectadas por VLB en muestras de tanques de leche de tambos con altas tasas de seroprevalencia en vacas en ordeño. El estudio se realizó en tres tambos del departamento de Colonia, Uruguay, donde se colectaron 45 mL de muestras de leche del tanque de frío. Los muestreos se realizaron mensualmente por un periodo de 20 meses. Los tanques de leche fueron identificados como A, B y C, y el promedio en todo el período de tasas de seroprevalencia de VLB en sangre de vacas en ordeño fue 79,3%, 67,4% y 75,4%, respectivamente. Las muestras de leche fueron centrifugadas a $3500 \times g$ durante 15 min en tubos estériles de 50 mL, y el *pellet* obtenido fue resuspendido en 400 μ L de PBS y almacenado a -20°C . Para la extracción de ADN se utilizó el kit comercial (PureLink® Genomic DNA Mini Kit), seguido de una qPCR del control interno de extracción, basado en la amplificación del gen *β -actina*. La detección proviral de VLB fue por *nested* PCR, direccionada al gen *env*. El porcentaje de positividad fue de 20% (4/20) para el tanque A, 5% (1/20) para el B y 20% (4/20) para el C. La detección de VLB por *nested* PCR fue baja, variable e intermitente en este estudio. Esto puede atribuirse a la complejidad de detectar células infectadas con VLB en leche debido a: 1) composición de la leche (proteasas, polisacáridos, lípidos y iones de calcio) y 2) bajo conteo de linfocitos B en leche (célula blanco del VLB). Estos factores pueden interferir en los análisis de PCR, disminuyendo la sensibilidad de detección en tanque de leche en comparación con otras matrices, como la sangre. En conclusión, el diagnóstico de la presencia de VLB de un rodeo a partir del tanque de leche no muestra la sensibilidad necesaria para la detección de ADN proviral por *nested* PCR. Se requiere nuevos estudios para explorar el uso de otras tecnologías y protocolos con mayor sensibilidad analítica para identificar el patógeno en muestras de tanque de leche, lo que permitiría mejorar el control y la vigilancia a nivel predial o nacional.

Palabras clave: leucosis enzoótica bovina, vigilancia, tanque de leche.

Enzootic bovine leukemia is a chronic, infectious, and highly contagious disease caused by the bovine leukemia virus (BLV). This disease negatively affects health, production, and reproduction mainly in dairy cattle, and is frequently detected in adult animals. Because shedding of pathogens, such as BLV, can occur through milk, analysis of bulk tank milk samples is being incorporated into disease monitoring programs of importance to dairy cattle. The objective of this study was to determine the frequency of detection by nested PCR of BLV-infected cells in bulk tank milk samples from dairy farms with high seroprevalence rates in milking cows. The study was carried out in three dairy farms in the department of Colonia, Uruguay, where 45 mL of milk samples were collected from the cold tank. Sampling was conducted monthly for a period of 20 months. Bulk tank milk was identified as A, B, and C, and the average over the entire period of BLV seroprevalence rates in the blood of milking cows were 79.3%, 67.4%, and 75.4%, respectively. Milk samples were centrifuged at $3500 \times g$ for 15 min in sterile 50 mL tubes, and the pellet obtained was resuspended in 400 μ L of PBS and stored at -20°C . The commercial kit (PureLink® Genomic DNA Mini Kit) was used for DNA extraction, followed by qPCR of the internal extraction control, based on the amplification of the *β -actin* gene. Proviral detection of BLV was by nested PCR, targeting the *env* gene. The percentage of positivity was 20% (4/20) for bulk tank A, 5% (1/20) for bulk tank B, and 20% (4/20) for bulk tank C. The detection of BLV by nested PCR was low, variable, and intermittent in this study. This may be attributed to the complexity of detecting BLV-infected cells in milk due to: 1) milk composition (proteases, polysaccharides, lipids, and calcium ions) and 2) low B lymphocyte count in milk (BLV target cell). These factors can interfere with PCR analysis, decreasing detection sensitivity in bulk

tank milk compared to other matrices, such as blood. In conclusion, the diagnosis of the presence of BLV in a herd from the bulk tank milk does not show the necessary sensitivity for detecting proviral DNA by nested PCR. Further studies are needed to explore the use of other technologies and protocols with greater analytical sensitivity to identify the pathogen in bulk tank milk samples, which would allow for improved control and monitoring at the farm or national level.

Keywords: enzootic bovine leukemia, monitoring, bulk tank milk.

Evaluación de la formación de biofilm y factores de virulencia en *Staphylococcus aureus* asociados con mastitis subclínica en 11 tambos de Uruguay

Carla Stoletniy^{1,2}, Álvaro González-Revello^{1,2}, Ana Umpiérrez², Pablo Zunino², Rosario de los Santos¹ stoletniycarla@gmail.com ¹Unidad Académica de Ciencia y Tecnología de la Leche, Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Facultad de Veterinaria Udelar. Ruta 8, km 18. Montevideo, Uruguay. ²Departamento de Microbiología. Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable. Avenida Italia 3318. Montevideo, Uruguay.

La mastitis subclínica (MSC) es una enfermedad común en vacas lecheras que afecta la glándula mamaria sin causar signos evidentes de inflamación. Tiene un impacto significativo en la producción de leche, afectando la cantidad y calidad de la misma y se asocia a un incremento en el recuento de células somáticas (RCS). *Staphylococcus aureus* es uno de los principales patógenos causantes de mastitis contagiosa bovina, aislándose frecuentemente en casos de mastitis subclínica y clínica. Esta capacidad depende en parte de la expresión de varios factores de virulencia que le proporcionan resistencia al sistema inmunológico del huésped, permitiendo su adaptación y persistencia. Entre ellos, se encuentra el gen regulador accesorio (*agr*) involucrado en la expresión genética de los factores de virulencia de *S. aureus*. Se ha reportado que las variantes de este gen (*agrI-IV*) se asocian a distintos estadios del proceso de infección y a la formación de biofilm en el huésped. El tipo de variante de *agr*, los genes codificantes de la cápsula (*cap*) y otros como los de la síntesis de polisacárido de adhesión intercelular (*ica*), se usan para inferir la potencial persistencia del patógeno a largo plazo en la glándula mamaria. El objetivo de este trabajo fue caracterizar 23 cepas de *S. aureus* asociadas a MSC previamente aislados en 11 tambos de la cuenca lechera de Uruguay. Se determinó la capacidad de formar biofilm con la técnica semicuantitativa de cristal violeta a 35°C por 24 h y se realizó la búsqueda de 8 genes de virulencia (*agr I,II,III,IV*, *icaA*, *icaD*, *cap5* y *cap8*) mediante PCR. Como controles se utilizaron las cepas de referencias ATCC *S. aureus* 6538, 29213 y 25923. Todas las cepas presentaron capacidad de formar biofilm, el 65% se clasificaron como moderadas formadoras y el restante 35% como débiles. Ningún aislamiento fue clasificado como fuerte formador. Respecto a los genes de virulencia, 91% de las cepas resultaron positivas para algún tipo de *agr*. El 83% fue positivo para *agrI*, el 4% para *agrII* y el 4% para *agrIII*. No se detectó la variante *agrIV*. Los genes *icaA* e *icaD* se detectaron en el 100% de las cepas. En cuanto a las variantes de la cápsula, los genes *cap5* y *cap8* se detectaron en el 43% y 47% de las cepas respectivamente. La mayoría de las cepas de *S. aureus* presentaron *agrI*. Se ha reportado que esta variante es la más prevalente en casos de mastitis bovina, especialmente en infecciones subclínicas, ya que influye en la capacidad de colonizar y persistir en el tejido mamario sin inducir respuestas inflamatorias graves. Asimismo, la alta prevalencia de los genes *cap5* y *cap8* y las variantes *icaA* e *icaD* indicarían también que las cepas *S. aureus* presentan características asociadas a MSC y mastitis crónicas, como