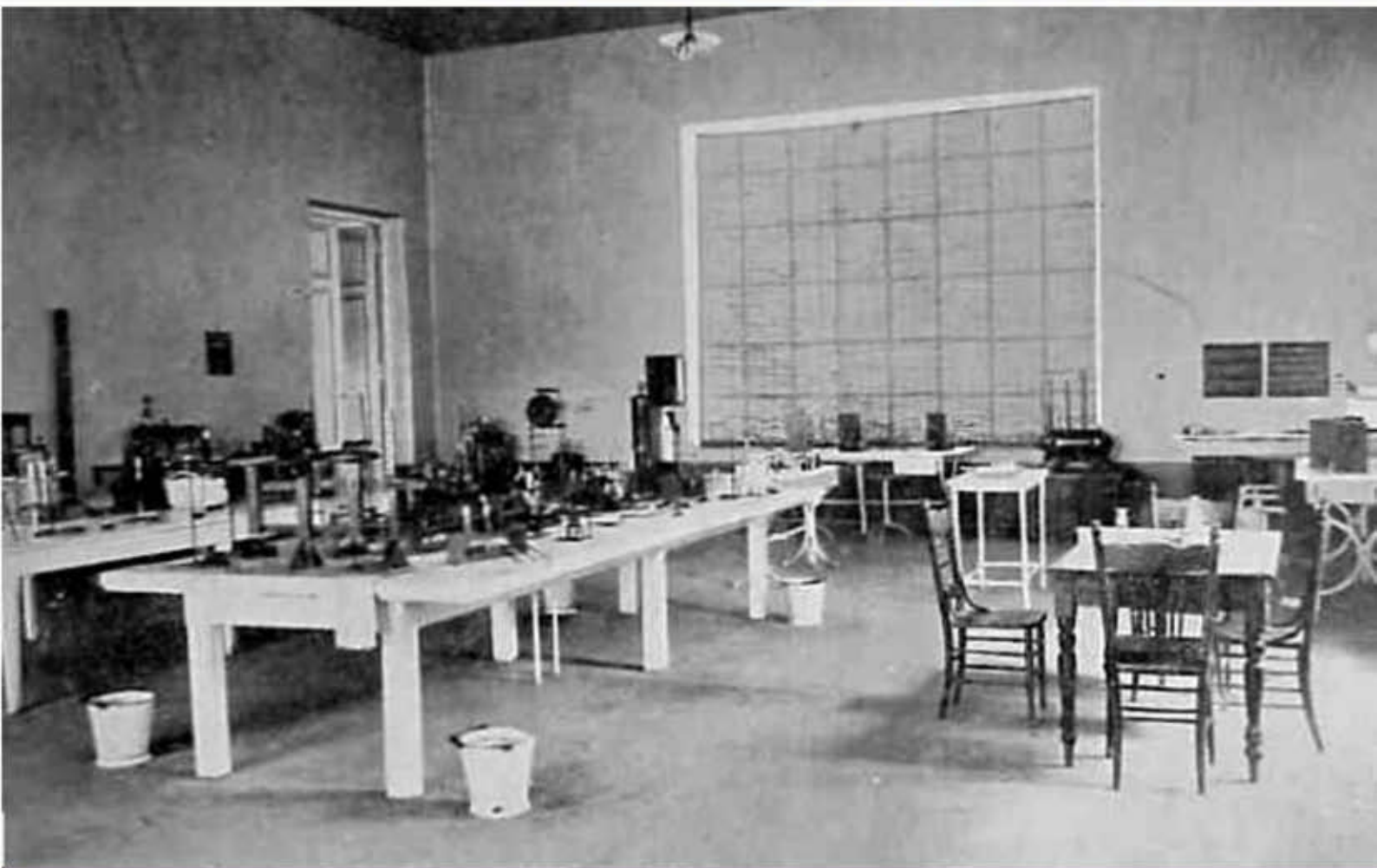


Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias

ISSN 0365514-8 Versión Impresa
ISSN 1514-2590 Versión Electrónica
ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

ANALECTA VETERINARIA



Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Volumen 29 n° 1 año 2009



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 29 n° 1, 2009

Publicación de la
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

Autoridades

Decano

Dr. Edgardo Nosetto

Vicedecano

Bac. Reinaldo Fonrouge

Secretario Académico

Dra. Sara Williams

Secretario de Postgrado

Dr. Eduardo Mórtola

Secretario de Extensión Universitaria

Méd.Vet. Eduardo R. Pons

Secretario de Ciencia y Técnica

Dra. Cecilia Galosi

Secretario de Asuntos Estudiantiles

Méd.Vet. Fernando Marino

Secretaria de Gestión de Calidad

Dra. María Gabriela Echeverría

ANALECTA VETERINARIA

Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

Secretaría de Redacción

Dra. Yanina Corrada
Méd. Vet. Daniel O. Arias

Comité Editorial

(Facultad de Ciencias Veterinarias)

Dra. Liliana Lagrecca
Dr. Eduardo Gimeno
Bact. Carlos Gómez
Dr. Florestán Maliandi
Méd.Vet. Enrique Pennimpede
Dra. Pilar Peral García
Dr. Carlos Perfumo

Clasificada nivel 1 (superior de excelencia) por
CAICYT-CONICET

Evaluadores de trabajos de Analecta Veterinaria:

G. Antúnez Sánchez (Cuba), L Basso (Argentina), HA Brusco (Argentina), F Capano (Uruguay), A Conigliaro (Argentina), L Estol (Argentina), J Idiart (Argentina), RA Fernández (Argentina), J Lasta (Argentina), A Fernández Alosa (Brasil), H Tersolo (Argentina), J Zorzópulos (Argentina), E Gimeno (Argentina), C Schenk (Argentina), E Coppos (Argentina), LM Friche Passos (Brasil), JM Gutiérrez (Costa Rica), R Cacchione (Argentina), F Cortés Benavides (España), M Carballo (España), RM Dauder (España), R de Torres (Argentina), P Ostrosky-wegman (España), J Surralles Calonge (España), N Auza (Argentina), M Barrandeguy (Argentina), M Carballo (Argentina), JA Coppo (Argentina), C Corbellini (Argentina), F Costa (Argentina), C Eddi (Argentina), A Fosatti (Argentina), E Gentilini (Argentina), N Gómez (Argentina), S Gómez Cabrera (Argentina), C Gómez Dumm (Argentina), J González Tomé (Argentina), G. González (Argentina), A Guglielmone (Argentina), I von Landzewitsch (Argentina), N Leardini (Argentina), L León Vizcaino (España), C Lerena (Argentina), JC Lorente (Argentina), M Mariano (Argentina), H Molinuevo (Argentina), M Monina (Argentina), E Moras (Argentina), SJ de Oliveira (Brasil), A Parma (Argentina), J Pereira (Argentina), J Pistani (Argentina), B Ruksan (Argentina), B Rutter (Argentina), E Smitsaart (Argentina), J Troiano (Argentina), C Carfagnini (Argentina), J de Filippo (Argentina), C Machado (Argentina), I Sommerfelt (Argentina), P Soto (Argentina), E.Romero (Argentina), R Alberio (Argentina), A Soraci (Argentina).

La revista ANALECTA VETERINARIA es una publicación semestral de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Está destinada a la difusión de trabajos científicos en el campo de las Ciencias Veterinarias, generados en esta Unidad Académica y en otras instituciones. Asimismo, reflejará las actividades académicas de postgrado y de extensión que se desarrollan en esta Casa de Estudio.

The Journal ANALECTA VETERINARIA is a biannual publication of the College of Veterinary Sciences of the National University of La Plata, Argentina. It is dedicated to the diffusion of scientific reports in the field of the Veterinary Sciences, generated in this and in other institutions. Also, it will reflect the academic activities of graduate school and of extension that they are developed in this College.

ISSN 0365514-8 Versión Impresa

ISSN 1514-2590 Versión Electrónica

<http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html>

ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

Registro Propiedad Intelectual 77383

Dirección postal: CC 296 (B1900AVW)

La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

Las opiniones expresadas por los autores que contribuyen a esta revista no reflejan necesariamente las opiniones de este medio, ni de las entidades que la auspician o de las instituciones a que pertenecen los autores.

Queda prohibida la reproducción total o parcial por cualquier metodología del material impreso en esta revista sin el consentimiento expreso del Editor. Está autorizada la reproducción con fines académicos o docentes mencionando la fuente. El uso de nombres comerciales está destinado únicamente para la identificación y no implica el respaldo directo o indirecto de los Ministerios de la Nación Argentina ni de los países respectivos de donde provengan los trabajos. Tampoco se garantizan ni respaldan los productos promocionados en los avisos de publicidad.

Acceso Electrónico a ANALECTA VETERINARIA

Si tiene acceso a INTERNET, puede recuperar la revista electrónicamente y en forma gratuita accediendo a la página en la Web

www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html

Los números de la revista a partir del Volumen 18 están disponibles en formato de archivo: pdf (Portable Document File-Adobe Acrobat Reader®) y pueden imprimirse en cualquier impresora que permita diferenciar escala de grises o colores. Se recomienda que la misma posea un resolución mínima de 600 x 600 dpi.

Para más información sobre cómo recibir ANALECTA VETERINARIA electrónicamente, enviar un e-mail a la dirección: analecta@fcv.unlp.edu.ar

Revisión de estilo: Per. Eleonora Rolleri

Diseño

Prof.Dr. Nestor Oscar Stanchi

Diseño de Tapa

Andrea López Osornio (DCV)

ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas LATINDEX

(www.latindex.unam.mx),

Ulrich's International Periodicals Directory

(www.ulrichsweb.com)

Zoological Records

(www.biosis.org.uk/products_services/zrss.html)

BIOSIS (<http://www.biosis.org>)

Infocyt <http://www.redhucyt.oas.org/infocyt/>

Se solicita canje - On demande l'échange - We ask for exchange - Si prega lo scambio
Man bitter um austausch - Pedese permuta - Oni petas intersangon

Citación de la versión electrónica: La citación de los artículos aparecidos en la versión electrónica de ANALECTA VETERINARIA (VE) debería seguirse según el siguiente ejemplo:

Costa E.F. y col. Alteraciones en la diferenciación y proliferación celular cutánea en bovinos, inducidas por Hipervitaminosis D de origen vegetal. *Analecta vet* (VE) 1998; 18,1/2: 7-13 (7 pantallas). Recuperable de www.fcv.unlp.edu.ar

Citación de la versión CD-ROM: La citación de los artículos aparecidos en la versión en CD-ROM de ANALECTA VETERINARIA (CD-ROM) debería seguirse según el siguiente ejemplo:

Tittarelli C.M. y col. Efecto de las lluvias sobre la composición mineral de gramíneas y *Lotus glaber mill* del partido de Magdalena. *Analecta vet* (CD-ROM) 2001; 21, 1: 54-57 (4 pantallas).

Impresión

ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l-'ek-t&

Etimología: LatinModerno *analecta*, del Griego *analekta*, plural neutro de *analektos*, verbo de *analegein* recolectar, de *ana-* + *legein* reunir: selección miscellanea de pasajes escritos, cartas.



Foto de tapa: Facultad de Veterinaria (Bacteriología). Mediados del siglo XX.

Todos los trabajos publicados en ANALECTA VETERINARIA son sometidos a revisores externos.

El Editor se reserva el derecho de editar los artículos para clarificarlos y modificarles el formato para adecuarlos al estilo de ANALECTA VETERINARIA.

All articles published in ANALECTA VETERINARIA are submitted to external scientific reviewers.

The Editor reserves the right to edit articles for clarity and to modify the format to fit the publication style of ANALECTA VETERINARIA

Impreso en papel libre de ácido

Printed in acid-free paper

Impreso en Argentina

Printed in Argentina



Artículos de Investigación

Research articles

Eficacia antifúngica *in vitro* del lufenuron. *In vitro* antifungic efficacy of Lufenuron
Aicardi L, Reinoso EH **5-10**

Primer aislamiento de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de hamburguesas en Paraguay. First Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from hamburgers in Paraguay
Copes J, Pellicer K, del Hoyo G, Lopez Cabrera M, Estigarribia M, Pineda Olmedo G,
Loup V, Florentin C, Alonso M, Cardozo L **11-14**

Inhibición de *Escherichia coli* O157:H7 por cepas *Lactobacillus* aisladas de queso ovino. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 by *Lactobacillus* strains isolated from ovine cheese.
Vallejo M, Etchechoury V, Horiszny C, Marguet E **15-19**

Estudio comparativo de la eficacia de Oxitetraciclina a la dosis de 40 mg/kg y tilmicosina, combinadas con meloxicam, en el tratamiento de la enfermedad respiratoria bovina en animales de feed lot. Comparative Study on the Efficacy of Oxitetracycline At 40 mg/kg Dose and Tilmicosin Both Combined to Meloxicam in the Treatment of Respiratory Bovine Disease in Feed Lot Animals.
Fazzio LE, Landoni MF **20-24**

Botulismo por *Clostridium botulinum* tipo C en patos en Uruguay. Botulism *Clostridium botulinum* type C in ducks in Uruguay.
Cattáneo M, Bermúdez J, Duran E, Baison M, Meriño I, Carvalho Filho MB, Nascimento RAP, Lobato FCF, Uzal FA, Assis RA **25-27**

Efecto de distintos niveles de suplementación dietética con zinc en la fracción prostática del eyaculado canino. Effect of different levels of zinc supplementation on the prostatic fraction of canine ejaculate.
García Romero G, Valiente C, Ranea G, Rosa D, Mattioli G, Gobello C, Corrada Y **28-31**

Comunicaciones breves

Short communications

Brote de dermatofiosis en terneros. Outbreak of dermatofiosis in calves.
Cattáneo M, Bermúdez J, Apolo A, Bermúdez I, Heras G, Velazques C, Juambeltz R, Assis R **32-34**

Enfermedades esofágicas en caninos. Hallazgos endoscópicos en 80 casos. Canine esophageal diseases. Endoscopic findings in 80 cases.
Aprea AN, Giordano AL, Bonzo E **38-48**

Revisiones

Review

Funciones del gen relacionado a la latencia (gen LR) del herpes virus bovino tipo 1 (BoHV-1) y otras proteínas expresadas durante la latencia. Functions of the latency-related gene (LR gene) of bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) and other proteins expressed during latency.
Pérez SE. **49-50**

EFICACIA ANTIFÚNGICA IN VITRO DEL LUFENURON

Aicardi L^{1,2}, Reinoso EH¹

¹ Cátedra de Micología Médica e Industrial “Prof. Dr. Pablo Negroni” – Carrera de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias – Universidad Nacional de La Plata.

² Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICBA).

Resumen: Una de las patologías dérmicas con mayor prevalencia en la cunicultura de nuestra región es la dermatofitosis o tiñas del conejo. Esta enfermedad que involucra piel y pelos de ciertas regiones del cuerpo animal, es causada por eumycetos queratinofílicos, siendo *Trichophyton mentagrophytes* var *mentagrophytes* el más frecuentemente aislado en estos animales. Para determinar la eficacia antifúngica del Lufenuron -Benzoilfenilurea, inhibidor de la síntesis de quitina-, se evaluaron treinta cepas diferentes de *Trichophyton mentagrophytes* var *mentagrophytes*, aislados de conejos con lesiones clínicas, provenientes de establecimientos de La Plata y su zona de influencia. A partir de estos aislamientos se prepararon inóculos para realizar los estudios de sensibilidad a través del método de microdilución en medio líquido [RPMI 1640 y caldo glucosado-extracto de levadura] y el método de difusión en agar [Mueller Hinton modificado (MHm) y agar glucosado de Sabouraud (AGS)]. Las placas fueron incubadas a 28° C durante diez días. La inhibición del crecimiento fúngico frente a diferentes concentraciones de Lufenuron no fue observada en ninguna de las cepas ensayadas. Estos resultados demuestran que el Lufenuron no posee actividad antifúngica in vitro frente a estas especies de dermatofitos, pese a su actividad inhibidora de la síntesis de quitina en artrópodos.

Palabras clave: *Trichophyton mentagrophytes* - Dermatofitosis – Lufenuron – Sensibilidad in vitro.

IN VITRO ANTIFUNGIC EFFICACY OF LUFENURON

Abstract: Dermatophytosis or rabbit's ringworms is one of the dermatological pathologies with a high prevalence at the rabbits breeding farms in our city. The skin and hair of specific areas of rabbit's body are involvement in this disease caused by keratinophilic dermatophytes, and the most frequent isolated in these animals is *Trichophyton mentagrophytes* var *mentagrophytes*. Thirty different *Trichophyton mentagrophytes* var *mentagrophytes* were isolated from rabbits with suspected lesions of superficial mycosis arising from breeding farms of La Plata city and surroundings areas, to determine the in vitro antifungal efficacy of Lufenuron [Benzoilphenilurea], a chitin synthase inhibitor. The spores suspensions were prepared from these isolates and used for the in vitro susceptibility testing by the broth microdilution method [RPMI 1640 medium and glucose-yeast extract broth] and agar diffusion method [modified Mueller-Hinton (MHm) and Sabouraud Glucose Agar (SGA)]. The plates were incubated at 28°C for ten days. No fungal growth inhibition to a different concentrations of Lufenuron was observed in any of the tested strains. In spite of the activity as a chitin synthase inhibitor in arthropods, the results showed that Lufenuron do not possess in vitro antifungal activity against these dermatophytes species.

Key Words.: *Trichophyton mentagrophytes* - Dermatophytosis – Lufenuron – In vitro susceptibility

Fecha de recepción: 28/02/07

Fecha de aprobación: 28/10/09

Dirección para correspondencia: Leandro Aicardi, Cátedra de Micología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

E-mail: micologia@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los animales de peletería representan un nuevo objeto de producción animal (1). En la actualidad existe una creciente demanda a nivel mundial de pieles ecológicas, procedentes de animales como nutria, chinchilla, zorro o visón, intentando sustituir las de origen salvaje. También son ecológicas las pieles de conejo, que a pesar de ser un animal productor de carne, su piel es un subproducto alternativo, con un bajo costo de producción comparado con otras especies y de buena rentabilidad si es de calidad de exportación (2).

Las estadísticas de los últimos años, destacan a la Argentina como un país exportador de pieles de conejo. Esta situación internacional, impulsa a que este animal pueda producir pieles de valor peletero, con un destino final hacia países asiáticos y Europa (2, 3).

Claro que, este tipo de actividades, también trae aparejado algunos problemas, como las enfermedades infecto-contagiosas, entre las que se pueden citar a las micosis superficiales, que van en detrimento de la calidad de las pieles y de la propia producción.

Con el nombre de micosis, se agrupan una serie de enfermedades causadas por eumycetos - hongos - (4). Las micosis superficiales, las más importantes en animales, incluyen a las dermatofitosis o "tiñas", cuyos agentes etiológicos son eumycetos queratinofílicos, que tienen la capacidad de invadir tejidos queratinizados como las uñas, los pelos y el estrato córneo (5). Los dermatofitos se agrupan dentro de tres géneros: *Epidermophyton*, *Microsporium* y *Trichophyton*. Y acorde a su principal hospedador o hábitat, son considerados antropófilos (hombre), zoófilos (animales) y geófilos (suelo). Los animales actúan como reservorio (animales enfermos o portadores sanos) de *Trichophyton mentagrophytes var mentagrophytes*, *T. verrucosum*, *Microsporium canis*, entre otros; con un importante potencial zoonótico. *Trichophyton mentagrophytes*, es el principal agente causal de tiñas en conejos; y también *Microsporium canis*, ha sido informado por otros autores [Fig.1] (6, 7).

Las zoonosis son enfermedades que afectan al hombre y a uno o más vertebrados animales, y revelan que un animal infectado puede ser indicador de la situación epidemiológica del plantel o de la aparición de la infección humana. Por lo tanto, la exposición a estos animales afectados de dermatofitosis, constituyen un riesgo para la Salud Pública, tanto de los operarios como de los profesionales relacionados (1, 8). Esto demanda la realización de un diagnóstico preciso, y así poder establecer un tratamiento adecuado. Para lo cual, existe un número reducido de antimicóticos de uso veterinario; que tienen por objeto eliminar el hongo, disminuyendo al mínimo los efectos en el paciente. Las propiedades fungistáticas

o fungicidas de algunas drogas se basan en su capacidad de alterar, debilitar o destruir la pared celular constituida por varios polisacáridos como quitina, celulosa y mananos (4).

La síntesis de quitina es el sitio primario de ataque de los antibióticos nucleopéptidos [nicomicinas] y las benzoilfenilureas [lufenuron] (9).

El Lufenuron inhibiría la síntesis y depósito de quitina, interfiriendo con la formación de la pared de la célula micótica (10). Teniendo en cuenta este mecanismo de acción y la particular composición química de la pared de los hongos, el objetivo del presente trabajo es realizar estudios de sensibilidad *in vitro* de *Trichophyton mentagrophytes var mentagrophytes* aislados de conejos, con la finalidad de determinar la eficacia antifúngica del Lufenuron.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 - DROGAS ENSAYADAS

Para la realización de este trabajo se empleó Lufenuron [PROGRAM®]-Suspensión inyectable para gatos - NOVARTIS S.A., Basilea, (Suiza).

De acuerdo a los niveles mínimos eficaces requeridos en sangre para el control de pulgas [50 ng a 100 ng/ml] (11), se realizaron sucesivas diluciones en tres disolventes: Agua Destilada Estéril [ADE], DMSO [Dimetilsulfóxido] y PEG [Polietilenglicol]; hasta lograr concentraciones finales de 500 ng, 250 ng, 125 ng y 62,5 ng. Por lo que se evaluó una concentración inferior de 62,5 ng que abarca ese nivel de actividad eficaz, hasta un punto superior de 500ng.

Como control positivo de inhibición, se utilizó Anfotericina B en solución de Desoxicolato de sodio [Concentración final 0,05 mg/ml].

2 - CEPAS

Los aislamientos de *Trichophyton mentagrophytes var mentagrophytes*, se llevaron a cabo en el laboratorio de la Cátedra de Micología Médica, a partir de las muestras de pelos y escamas de conejos, provenientes de establecimientos criadores de la región de la ciudad de La Plata y alrededores; con lesiones dérmicas compatibles con dermatofitosis o "tiñas".

El ensayo de Lufenuron se realizó sobre 30 cepas diferentes de *Trichophyton mentagrophytes var mentagrophytes*.

Se creó una micoteca con los hongos aislados, que fueron conservados en tubos en pico de flauta con Agar Glucosado de Sabouraud (AGS) hasta el momento de realizar los estudios.

Con el fin de lograr una óptima formación de conidios, las cepas de dermatofitos se repicaron en Agar papa glucosado (APG) [Glucosa 2% - extracto de levadura], con una incubación a 25 - 28 °C durante 10 días, para la posterior preparación de inóculos.

3a - Preparación del inóculo

Cada cepa se cubrió con 1 a 2 ml de agua destilada estéril, raspando suavemente la superficie de las colonias para extraer las formas conidiales. Se dejó decantar unos minutos para la precipitación de las partículas más groseras, y el sobrenadante se extravesó a otro tubo para obtener las diluciones correspondientes, a las que se ajustó su concentración final mediante espectrofotometría a 530nm [Espectrofotómetro UV Visible Wayers 7000], con alrededor de 68-70% de transmitancia. Este inóculo es equivalente a $0,5 - 4 \times 10^6$ UFC/ml (12); y para su homogenización se agitó en un Vortex durante 3-5 segundos.

3b - Cuantificación del inóculo

Se realizó en placas de AGS para verificar el número de viables (UFC/ml). La suspensión ajustada por espectrofotómetro se diluyó 1:100 con agua destilada estéril (aprox. 10^4 UFC/ml). Se tomó una alícuota de 10 μ l y se sembró por diseminación en forma uniforme en toda la superficie de la placa con medio de cultivo. Éstas, se incubaron a 28-30° C. Se revisaron a diario hasta su óptimo crecimiento (colonias visibles), para comprobar el tamaño real del inóculo. Las UFC/ml se obtuvieron multiplicando el número de colonias contadas por el factor de dilución (13).

4 - MEDIOS DE CULTIVO PARA PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

Se emplearon los medios de cultivo estándares recomendados por el CLSI (12, 14): Mueller-Hinton modificado (MHm), medio sólido suplementado con 2% de glucosa y 0,5 μ g/ml de azul de metileno para mejor lectura de los halos; y RPMI 1640 Buffer MOPS [0,165M], como medio líquido. Los medios complementarios fueron: Sabouraud Dextrosa Agar-extracto de levadura (sólido) y caldo glucosado- extracto de levadura (líquido).

5 - PROCEDIMIENTO

5a - Método de difusión en agar:

Luego de homogenizar los inóculos de cada cepa, se humedecieron una serie de hisopos con cada suspensión, y se estrió por agotamiento hasta distribución homogénea en toda la superficie de las placas de Petri, conteniendo los medios de cultivo con un espesor de 4mm. Luego con un sacabocados se procedió a realizar hoyuelos, en el cual se depositaron 100 μ l de cada una de las concentraciones a evaluar de Lufenuron, además del control positivo de inhibición Anfotericina B [Fig.2].

5b - Método de dilución en caldo:

Caldo RPMI 1640: a partir de la solución madre o stock de Lufenuron diluido en DMSO, se

prepararon en cuatro tubos las concentraciones a evaluar (100x), y se diluyeron 1:50 en RPMI 1640, como así también la droga control. Luego, se distribuyó 100 μ l de cada una de las concentraciones de Lufenuron por duplicado en una serie de tubos, más un tubo control de crecimiento de cada cepa con RPMI 1640 sin antifúngico. Del inóculo estandarizado, se realizó una dilución 1:50 y se inoculó 100 μ l a cada tubo. Por lo tanto, con los 100 μ l que se añadieron a los 100 μ l existentes ya en el tubo, se produjo una dilución 1:2 de todos los componentes, obteniendo la concentración adecuada a evaluar.

Caldo Glucosado: de igual modo, con la solución stock y la droga control, se realizaron una serie de diluciones en caldo obteniendo el rango de concentraciones a evaluar (10X), más un testigo de crecimiento positivo. Todos los tubos se inocularon con 10 μ l de la suspensión estandarizada de conidios.

6 - LECTURA DE RESULTADOS

Se realizó por observación simple de las placas y tubos, utilizando solo en casos dudosos una lupa estereoscópica para mejor resolución [Iroscope YZ-6].

RESULTADOS

Todos los ensayos se realizaron por duplicado, repitiendo algunas pruebas también por duplicado, cuando resultaron dudosas.

Las diluciones de la droga se realizaron en diferentes solventes desde una concentración de 500 ng hasta 62,5 ng, considerando el nivel mínimo eficaz en sangre para el control de artrópodos [50 a 100 ng]. Los resultados demuestran que las cepas ensayadas resistieron las cuatro concentraciones de Lufenuron comparado con la Anfotericina B (0,05 mg), a la que todas fueron sensibles desde las primeras horas de contacto.

DISCUSIÓN

Las primeras propuestas acerca del posible uso de Lufenuron en el tratamiento de la dermatofitosis, fueron realizadas por *Ben-Ziony Yy Arzi B* (15) en Israel, a través de un estudio clínico en perros y gatos, donde sus resultados indican que los animales que son tratados con Lufenuron remiten los signos clínicos más rápidamente, mientras que sin tratamiento la enfermedad persiste de dos a tres meses, concluyendo que la administración oral de Lufenuron parece ser efectiva para el tratamiento de ciertas infecciones fúngicas cutáneas en caninos y felinos.

Algunos estudios clínicos llevados a cabo en pequeños animales y realizados por diferentes autores, señalaron obtener una mejoría clínica en la evolución de la dermatofitosis en los animales que recibieron Lufenuron (16, 17). Sin embargo, estos mismos autores, negaron la eficacia de este

Tabla 1. Estudio de sensibilidad in vitro.

Table 1. In vitro susceptibility test.

LUFENURON	CONCENTRACION INHIBITORIA											
	62,5ng			125ng			250ng			500ng		
Solvente	ADE	DMSO	PEG	ADE	DMSO	PEG	ADE	DMSO	PEG	ADE	DMSO	PEG
Resultados	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

Referencias: ng: nanogramos. ADE: Agua destilada estéril. DMSO: Dimetilsulfóxido. PEG: Polietilenglicol. R: Resistente. En todos los casos se utilizó Anfotericina B como droga control de inhibición positiva.

Tabla 2: Curvas de muerte.

Table 2. Death curves.

DROGA	TIEMPO DE CONTACTO CULTIVO			
	48 h	96 h	192 h	5 Días
LUFENURON 62,5 ng	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
125 ng	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
250 ng	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
500 ng	Positivo	Positivo	Positivo	Positivo
ANFOTERICINA B 0,05 mg	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Referencias: ng: nanogramos. En todos los casos se utilizó una cepa de *Trichophyton mentagrophytes* como control de crecimiento positivo.

fármaco en el tratamiento de la dermatofitosis en trabajos posteriores (18, 19).

Destacamos la sugerencia del uso de Lufenuron para el tratamiento de la Coccidioidomycosis Pulmonar Primaria en caninos con buenos resultados en un periodo de cuatro meses, Bartsch y Greene (9); pero al no incluir estos autores un grupo control de animales sin tratamiento, y teniendo en cuenta que es una entidad autolimitante, dudamos de su efectividad. Duda esta, que confirma Johnson *et al.* (20), evaluando la sensibilidad in vitro de *Coccidioides immitis* a Lufenuron, con resultados negativos sobre este agente etiológico.

Zur G y Elad D (21), realizaron estudios de sensibilidad in vitro de dermatofitos de origen animal frente a Lufenuron, desarrollando métodos alternativos como la aplicación directa de la droga sobre el medio de cultivo, sangre y tejido celular subcutáneo de animales tratados, pero

sin resultados satisfactorios.

Por otro lado, los estudios de sensibilidad in vitro multicéntricos sirvieron para establecer los métodos de referencia, dentro de los cuales se destacan los recomendados por el CLSI y también los del EUCAST (22).

Entre las principales características que incluyen las técnicas de referencia se preconiza el uso de RPMI 1640 como medio de cultivo estándar, aunque al ser considerado un medio pobre para el crecimiento óptimo de algunos hongos, también se han evaluado técnicas que incluyen medios de cultivos como YNB, Medio Casitone (23), AM3 y Sabouraud (24); y hasta el propio CLSI propone en el documento M44-A para estudios de sensibilidad de *Cándida spp*, el uso de Mueller-Hinton modificado (MHm) como medio de cultivo (14).

De todas maneras estos estándares no son una herramienta práctica para la rutina del

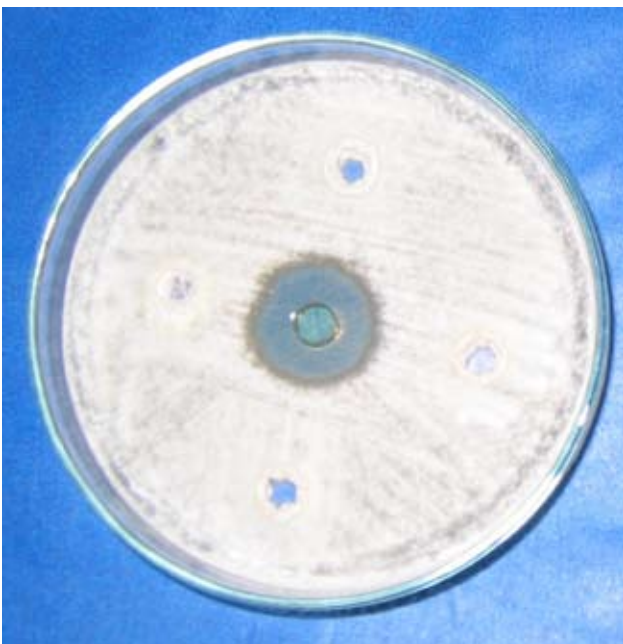
Fig. 1. Dermatofitosis. Lesión típica de “tiña” con alopecia y costras sobre el miembro anterior de un conejo.

Fig. 1. Dermatophytosis. Typical lesion of ringworm with alopecia and scabs on the rabbit's anterior leg.



Fig. 2. Método de Difusión en agar. Ensayo de las cuatro concentraciones de Lufenuron en comparación con la Anfotericina B como control positivo de inhibición.

Agar Diffusion Method. Four concentrations of Lufenuron test in comparison with Amphotericin B as inhibition positive control.



laboratorio de Microbiología clínica, por lo que sólo algunos centros especializados hacen uso de ellos (22).

Por lo expuesto podemos afirmar que la actividad antifúngica del Lufenuron sobre *Trichophyton mentagrophytes* de origen animal no es eficaz.

Esta afirmación estaría apoyada por los estudios de Zur G y Elad D (21), que confirma la falta de actividad antifúngica de esta droga en

sangre y tejido celular subcutáneo de animales tratados.

Por otra parte, la versión de posible acción inmunoreguladora (21), no nos parece coherente, toda vez que el Lufenuron actúa sobre la síntesis de quitina del exoesqueleto de las pulgas (25), para los que la acción inmunológica del huésped tendría escasa o nula implicancia en la recuperación del paciente.

Si se puede aceptar como lógica la propuesta de Johnson SM, et al (20), donde menciona la diferencia que existe en relación a la estructura química del Lufenuron, comparado con Nicomicina Z, otro inhibidor de la síntesis de quitina con actividad antifúngica. Asociando esta diferencia bioquímica a la posibilidad que el Lufenuron no sea activo en la inhibición de la síntesis de quitina fúngica, en contraste a esta función demostrada en artrópodos.

BIBLIOGRAFÍA.

- Martino PE, Stanchi N, Arias D, Gatti E. Riesgo de la Salud Pública por exposición a animales de peletería. *Analecta Veterinaria* 2000; 20(1): 14-19.
- Losada A. Piel de conejo de criadero controlado. Defendiendo a la ecología. *Rev. Cabaña Lagunita* 2006; (17): 23-26.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos (SAGPyA). Conejos: Estadísticas de Exportaciones Enero - Agosto de 2007.
- Reinoso HE, et al. Hongos o Eumycetes. En: Stanchi NO. *Microbiología Veterinaria*. 1° Ed. Ed. Sur. La Plata (Argentina), 2005; p. 627-634.
- Scott, Miller, Griffin. Muller & Kirk's. *Dermatología en pequeños animales*. 6° Ed. Ed. Inter-médica. Buenos Aires (Argentina), 2002; p.353 -441.
- Cabañes FJ. Dermatophytes in domestic animals. *Rev. Iberoam Micol.* 2000; (17): S8-S12.
- Scialfa E, Ruiz G. Tiña de conejos. Una zoonosis a tener en cuenta. *Rev. Colegio de Veterinarios de la Pcia de Buenos Aires* 2004; 9(30): 53-55.
- Vázquez JR. Algunos aspectos sobre zoonosis y salud pública. *Revisión. Med Vet.* 2001; 18 (3): 316-326.
- Bartsch RC, Greene RT. New treatment of coccidiodomycosis. *Vet Forum* 1997; 4: 50-52.
- Respaldiza E. En: Botana López LM. y cols. *Farmacología y Terapéutica Veterinaria*. 1° Ed. Ed. McGraw-Hill/Interamericana. Madrid (España), 2002; p.573-585.
- Franc M, et al. Pharmacokinetics of a new long-acting formulation of lufenuron and dose-activity relationship using experimental infestation by *Ctenocephalides felis*. *J.vet Pharmacol.Therap.* 1997; 20(1): 21-86.
- Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Ex- NCCLS) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of conidium forming filamentous fungi, Approved standard M38-A. (2002). Wayne, PA.

13. Cermeño Vivas JR., Torres Rodríguez JM. Método espectrofotométrico en la preparación del inóculo de hongos dematiáceos. Rev. Iberoam Micol. 1998; (15): 155-157.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (Ex- NCCLS) Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, Approved standard M27-A. (1997). Villanova, Pennsylvania.
15. Ben-Ziony Y., Arzi B. Use of Lufenuron for treating fungal infections of dogs and cats: 297 cases (1997-1999). JAVMA. 2000; 217(10):1510-1513.
16. Schenker R., Bucci V., Strehlau G. Use Of Lufenuron for the Treatment of Dermatophytosis in Italy. WSAVA 2002.
17. Guillot J., et al. Evaluation of the efficacy of oral lufenuron combined with topical enilconazole for the management of dermatophytosis in catteries. Vet Rec 2002; 150(23): 714-718.
18. Moriello KA., DeBoer DJ., Schenker R., et al. Efficacy of pre-treatment with lufenuron for the prevention of *Microsporum canis* infection in a feline direct topical challenge model. Vet Dermatol 2004; 15(6): 357-362.
19. DeBoer DJ., et al. Effects of lufenuron treatment in cats on the establishment and course of *Microsporum canis* infection following exposure to infected cats. JAVMA 2003; (222):1216-1220.
20. Johnson SM., et al. Evaluation of the susceptibility of *Coccidioides immitis* to lufenuron, a chitin synthase inhibitor. Medical mycology 1999; (37): 441 - 444.
21. Zur G., Elad D. In vitro and in vivo effects of Lufenuron on dermatophytes isolated from cases of canine and feline dermatophytoses. J Vet Med B. 2006; 53(3):122-125.
22. Cuenca-Estrella M., Rodríguez-Tudela JL. ¿Pueden basarse las indicaciones de los antifúngicos en los estudios de sensibilidad? Rev. Iberoam Micol 2002; (19): 133-138.
23. Pfaller MA., et al. In vitro susceptibility testing of filamentous fungi: Comparison of Etest and Reference Micodilution Methods for determining Itraconazole MICs. J Clin Microbiology 2000; 38(9): 3359-3361.
24. Meletiadis J., et al. Analysis of growth characteristics of filamentous fungi in different nutrient media. J Clin Microbiology 2001; 39(2): 478-484.
25. Byron L., et al. Dose titration of an injectable formulation of lufenuron in cats experimentally infested with fleas. AJVR 1999; 60(12):1513-1515.

PRIMER AISLAMIENTO DE *Escherichia coli* O157:H7 A PARTIR DE HAMBURGUESAS EN PARAGUAY

Copes J¹, Pellicer K¹, del Hoyo G¹, Lopez Cabrera M², Estigarribia M²,
Pineda Olmedo G², Loup V², Florentin C², Alonso M², Cardozo L³

¹Consultor JICA, Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos,
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

²Laboratorio de Microbiología de los Alimentos SENACSA, Paraguay,

³Cátedra de Microbiología, Facultad de Veterinarias Asunción, Paraguay.

Resumen: En los últimos veinte años las infecciones por *Escherichia coli* Enterohemorrágico (EHEC) representan una gran preocupación para la Salud Pública mundial. *E. coli* O157:H7/NM es el prototipo de un grupo de más de 150 serotipos que comparten el mismo potencial patogénico. El objetivo del trabajo fue aislar *E. coli* O157:H7 de alimentos obtenidos en mercados habilitados para la venta en la ciudad de Asunción, Paraguay. Se analizaron 50 muestras, para el aislamiento se realizó un enriquecimiento en caldo *Escherichia coli* adicionado con novobiocina y luego se sembró en medios sólidos PRS-Mug y Fluorocult. Las colonias características fueron confirmadas por pruebas bioquímicas y serológicas. A partir de hamburguesas de carne bovina cruda se obtuvieron dos cepas de *E. coli* O157:H7, ambas portadoras del gen *eae*, y negativas para los genes *ehxA*, *stx*₁ y *stx*₂. Este es el primer reporte sobre el aislamiento de *E. coli* O157:H7 a partir de alimentos en Paraguay.

Palabras Clave: *Escherichia coli* O157:H7, STEC, hamburguesas crudas.

FIRST ISOLATION OF *Escherichia coli* O157:H7 FROM HAMBURGERS IN PARAGUAY

Abstract: In the last twenty years the infections caused by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) represented a great concern for the world public health. *E. coli* O157:H7/NM is the prototype into a group of more than 150 serotypes that share the same pathogenical potential. The purpose of this work was to isolate *E. coli* O157:H7 from food obtained in markets qualified for sale in Asunción city, Paraguay. Fifty samples were analyzed, for the isolation and enrichment in *Escherichia coli* broth added with novobiocin was carried out, and then it was streaked into solid media PRS-Mug and Fluorocult. Typical colonies were confirmed by biochemical and serological tests. From hamburgers of raw bovine meat two *E. coli* O157:H7 strains were obtained, both carriers of *eae* gene and negatives for *ehxA*, *stx*₁ and *stx*₂ genes. This is the first report about the isolation of *E. coli* O157:H7 from foods in Paraguay.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, STEC, raw hamburger.

Fecha de recepción: 23/05/08

Fecha de aprobación: 02/0908

Dirección para correspondencia: Julio A. Copes, Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

E-mail: jcopes@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli Enterohemorrágico (EHEC) es un patógeno emergente asociado a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA). Fue reconocido por primera vez como patógeno humano en 1982 durante dos brotes de colitis hemorrágica (CH) ocurridos en Oregon y Michigan, EE.UU., atribuidos al consumo de hamburguesas en restaurantes de una cadena de comidas rápidas. La infección por EHEC puede causar casos esporádicos o brotes de diarrea, colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH) (6, 10). *Escherichia coli* O157:H7 es el prototipo de más de 150 serotipos que comparten el mismo potencial patogénico, cuyo principal factor de virulencia son las toxinas Shiga (7, 9, 28). A este grupo se lo denomina *Escherichia coli* productor de toxina Shiga (STEC). Según la OMS (1997), las cepas de EHEC deben presentar los siguientes factores de virulencia: a) toxinas Shiga, b) intimina, y c) enterohemolisina (27). Debido a que no todas las cepas STEC presentan estos factores de virulencia, y solo son productoras de toxina Shiga, se considera que las cepas EHEC son un subgrupo entre las STEC.

La habilidad de las cepas EHEC O157:H7 para causar enfermedad está relacionada con su capacidad para producir Stx1, Stx2, y sus variantes, responsables del daño del endotelio vascular (29). El segundo factor de virulencia es una proteína de membrana externa de 94-kDa, llamada intimina codificada por el gen *eae* localizado en la isla de patogenicidad LEE (del inglés, locus of enterocyte effacement). Este locus está asociado con la adherencia íntima de la bacteria a la célula epitelial, la iniciación de las señales de transducción, y la desorganización de las microvellosidades con la formación de la lesión AE (del inglés, attaching-and-effacing) (14). La presencia de LEE le confiere a las cepas EHEC una mayor virulencia, pues los serotipos LEE-positivos aparecen con mayor frecuencia asociados a brotes y casos de SUH que los serotipos LEE-negativos. El tercer factor de virulencia que caracteriza a las cepas EHEC es la producción de una enterohemolisina (EHEC-Hly), codificada en el gen *ehxA* del megaplásmido de 90-kb, la cual estaría involucrada en la patogénesis (23).

Numerosos estudios realizados en diferentes países, incluyendo a la Argentina permitieron confirmar el rol del ganado vacuno como principal reservorio de *E. coli* O157:H7 (2, 14, 20), aunque las ovejas y las cabras también fueron descritas como reservorios (2, 3, 13).

La principal vía de transmisión de *E. coli* O157 son los alimentos contaminados, como por ejemplo, carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga,

brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados, y agua, entre otros (21). La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto con las heces del ganado bovino. En la Argentina, se detectó STEC O157:H7 en el 3,9 % de productos cárnicos a nivel de boca de expendio (5). Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los animales, la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos, y la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral. Es importante destacar que la dosis infectiva capaz de ocasionar enfermedad por parte de este grupo bacteriano es de 10 a 100 bacterias por gramo de alimento.

En Argentina, donde el SUH es endémico, se producen aproximadamente 400 casos nuevos por año. La enfermedad constituye la primera causa de insuficiencia renal aguda en la edad pediátrica y la segunda de insuficiencia renal crónica. El SUH es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes (8, 21).

En Paraguay son escasos los estudios realizados sobre la detección de *E. coli* O157:H7 en alimentos, por lo cual la detección, identificación y caracterización de este patógeno emergente en alimentos y en los procesos de producción de los mismos, podría ser una herramienta fundamental para prevenir la posible infección en los consumidores (16).

El objetivo del trabajo fue aislar *E. coli* O157:H7 en muestras de alimentos obtenidas en supermercados de la ciudad de Asunción, Paraguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

Durante los meses de noviembre y diciembre de 2006, el personal del SENACSA (Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Agroalimentaria, del Paraguay) recolectó 50 muestras de alimentos en 15 mercados habilitados para la venta en la ciudad de Asunción, Paraguay. Se recolectaron 35 muestras de quesos denominados "Paraguay", 10 muestras de carne picada y 5 muestras de hamburguesas crudas.

Para la detección y aislamiento de *E. coli* O157:H7, se inocularon 65 g de cada muestra en caldo *Escherichia coli* (Bio Pro Lab., EE.UU.) con novobiocina (Biokar Diagnostics, Beauvais Cedex, France), incubándose a 35°C por 18 h y sin agitación. Posteriormente, una alícuota de cada caldo enriquecido fue sembrada en Phenol Red Sorbitol-mug (PRS-Mug, Oxoid) y Fluorocult (Merck, Darmstadt Alemania), e incubada a 35°C por 24 h. Las colonias presuntivas se repicaron en medio sólido eosina azul de metileno (Britania Lab, Argentina) y en agar tripticasa soya (Britania Lab, Argentina) para su posterior tipificación bioquímica (24). Para el seroagrupamiento se utilizó el test aglutinación de Látex O157 (OXOID, U.K.).

Las cepas aisladas fueron enviadas al Servicio Fisiopatogenia del INEI - ANLIS "Dr. Carlos G. Malbrán", para confirmar la presencia de los antígenos O157 y H7, la capacidad de producir citotoxicidad en células Vero, y la portación de los genes *rfb*_{O157}, *fliC*_{H7}, *eae*, *ehxA*, *stx*₁ y *stx*₂ (12).

RESULTADOS

Sobre 50 muestras analizadas, dos (4%) fueron positivas para *E. coli* O157:H7. Los dos aislamientos fueron recuperados de hamburguesas crudas y presentaron colonias sorbitol negativas en los medios de cultivo PRS-Mug, y Fluorocult. Las dos cepas aisladas presentaron movilidad y las pruebas bioquímicas arrojaron los siguientes resultados: oxidasa negativa, catalasa positiva, indol positivo, Voges Proskauer negativo, rojo de metilo positivo, citrato negativo, lisina y ornitina decarboxilasa positivas, hidrogeno sulfurado negativo, y fermentación de glucosa y lactosa. Ambos aislamientos fueron portadores del gen *eae* y no portaron los genes *stx*₁, *stx*₂ y *ehxA*.

DISCUSIÓN

Considerando que en la última década las enfermedades causadas por *E. coli* O157:H7 ocasionaron una gran preocupación en la salud pública mundial (1, 19), el control de los alimentos para la detección de este microorganismo constituye una herramienta fundamental para prevenir las enfermedades transmitidas por alimentos.

Cabe destacar que las cepas de *E. coli* O157:H7 aisladas no portaron dos de los factores de virulencia de EHEC (toxinas Shiga y enterohemolisina). Sin embargo, estos aislamientos son portadores del gen *eae* que codifica para la intimina y podrían ser potencialmente patógenos al adquirir los genes *stx* mediante fagos. Cabe destacar que según Karmali y col. (10), el serotipo O157:H7 pertenece al seropatótipo A según su potencial patogénico y epidémico, su asociación a enfermedades severas en el hombre y su capacidad para producir brotes (10, 18). Las cepas aisladas en el presente trabajo podrían ser consideradas un parámetro de contaminación por *E. coli* O157:H7 toxigénico ya que Wetzel Y LeJeune (26) reportaron la pérdida de los genes que codifican las toxinas Shiga.

El aislamiento de *E. coli* O157:H7 fue de gran importancia ya que se utilizó una metodología convencional menos exigente que la recomendada por United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS) (24, 25). De lo anteriormente expuesto puede deducirse que una búsqueda más exhaustiva en este tipo de alimentos, podría arrojar mayor número de cepas.

Con respecto a la presencia de *E. coli* O157:H7 en Paraguay, los únicos datos en-

contrados se refieren a Ortiz (16), quien realizó estudios en media res bovina para exportación, los cuales arrojaron resultados negativos para el aislamiento. El presente es el primer reporte sobre el aislamiento de *E. coli* O157:H7 a partir de alimentos en Paraguay. Es necesario realizar mayores estudios para evaluar la presencia de *E. coli* O157:H7 a los fines de determinar si existen serotipos patógenos en alimentos en Paraguay, y posteriormente implementar un plan de control sanitario.

Este trabajo fue realizado a los efectos de comenzar una vigilancia epidemiológica sobre *E. coli* O157:H7 en alimentos para lo cual se organizó este primer muestreo coordinado por el Laboratorio de Alimentos dependiente del SENACSA. Sin embargo, destacamos que sería muy importante realizar una búsqueda más exhaustiva con metodologías apropiadas para el aislamiento de las cepas de *E. coli* productoras de toxinas Shiga no-O157, cuya incidencia en casos clínicos se ha venido incrementando a nivel mundial (11, 17, 22) y por lo tanto, podrían estar presentes en Paraguay.

A partir de los aislamientos obtenidos, el laboratorio Oficial decidió implementar la metodología recomendada y validada por la USDA/FSIS, que incluye la separación inmunomagnética (4, 24, 25).

AGRADECIMIENTO

Nuestro agradecido reconocimiento al Dr. Gerardo Leotta por su experta asistencia técnica y sus valiosas discusiones.

BIBLIOGRAFIA

1. Banatvala N, Griffin P M, Greene K D, Barret T J, Bibb W F, Green J H, Wells J G and the Hemolytic Huremic Syndrome Study Collaborators. The United States national prospective hemolytic uremic syndrome study: microbiologic, serologic, clinical, and epidemiologic findings. *J Infect Dis* 2001; 183: 1063-70.
2. Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res* 2005; 36:289-311.
3. Carney E, O'Brien S B, Sheridan J J, McDowell D A, Blair I S, Duffy G. Prevalence and level of *Escherichia coli* on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter plant. *Food Microbiol* 2006, 23:52-59.
4. CFSan/Bam, Bacteriological Analytical Manual Online. Diarrheagenic *Escherichia coli*. U.S. Food & Drug Administration. Center for Food Safety & Applied Nutrition. 2002 <http://www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-4a.html>
5. Chinen I, Tanaro J D, Miliwebsky E, Lound L H, Chillemi G, Ledri S, Baschkier A, Scarpin M, Manfredi E, Rivas M. Isolation and characterization of *Escherichia coli* O157:H7 from retail meats in Argentina. *J Food Protect* 2001, 64: 1346-51.

- 6.El Síndrome Urémico Hemolítico. Consejo Profesional de Médicos Veterinarios 2006. <http://www.med-vet.com.ar/SUH-Informe.pdf>
- 7.El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) y la *Escherichia coli* enterohemorrágica (ECEH). Pan American Health Organization 2001. <http://www.paho.org/spanish/AD/DPC/CD/paraguay-red-junio-2001-5-suh.pdf>.
8. Exeni R. Síndrome Urémico Hemolítico. Archivos Latinoamericanos de Nefrología Pediátrica 2001, 1:35-56.
- 9.Griffin PM, Tauxe RV. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. Epidemiol Rev 1991, 13: 60-98.
- 10.Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, and Kaper JB. Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. J Clin Microbiol 2003, 41: 4930-40.
- 11.Krüger A, Padola N L, Parma A E and Lucchesi Paula M A. Intraserotype diversity among Argentinian verocytotoxinogenic *Escherichia coli* detected by random amplified polymorphic DNA analysis. J of Medical Microbiol 2006, 55: 545-549.
- 12.Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M, Ferrer M, Marey E, Rivas M. Validación de una técnica de PCR múltiple para la detección de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Rev. Argent. Microbiol. 2005, 37(1): 1-10.
- 13.Marguet ER, Ledesma P. Aislamiento de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 en un tambo ovino. Vet. Arg. 1999, 16:170-174.
- 14.McDaniel TK, Kaper JB. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *E. coli* K12. Mol Microbiol 1997, 2: 399-407.
- 15.Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffré A, Chinnen I, Baschkier A, Chillemi G, Guth B E C, Masana M, Cataldi A, Rodríguez H R and Rivas M. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. Int J Food Microbiol 2004, 96:189-98.
- 16.Ortiz N. FAO/IAEA First research coordination meeting of the coordinated research programme on "determination of profiles of human bacterial pathogens in foods for export by introduction of quality-assured microbiological assays". Occurrence of Bacterial Pathogens in Paraguayan Meat and Meat Products for Export, research contract N° 10277, pág 12. Viena, Austria, 1998 2-6 November. http://www.iaea.org/trc/micro-d61019_rcm1.pdf
- 17.Padola N L, Sanz M E, Blanco J E, Blanco M, Blanco J, Etcheverría A I, Arroyo G H, Usera M A and Parma A E. Serotypes and virulence genes of bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. Vet Microbiol. 2004, 100(1-2):3-9.
- 18.Parma A E, Sanz M E, Blanco J E, Blanco J, Viñas M R, Blanco M, Padola N L & Etcheverría A I. Virulence genotypes and serotypes of verotoxinogenic *Escherichia coli* from cattle and foods in Argentina. Eur J Epidemiol 2000; 16:757-62.
- 19.Pradel N, Livrelli V, De Champs C, Palcoux JB, Reynaud A, Scheutz F, Sirot J, Joly B, and Forestier C. Prevalence and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle, food, and children during a one-year prospective study in France. J Clin Microbiol. 2000, 38 (3):1023-31.
- 20.Renwick SA, Wilson JB, Clark RC Evidence of direct transmission of *Escherichia coli* O157:H7 infection between calves and human. J. Infect. Dis. 1993, 168: 792-793.
- 21.Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta G. Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. Medicina (Buenos Aires) 2006, 66 (Supl.III): 27-32.
- 22.Sanz M E, Viñas M R & Parma A E. Prevalence of bovine verotoxin-producing *Escherichia coli* in Argentina. European Journal of Epidemiology 1998, 14:339-403.
- 23.Schmidt H, Beutin L, Karch H. Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of *Escherichia coli* O157:H7 strain EDL 933. Infect Immun 1995, 63:1055-61.
- 24.United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service, Office of Public Health and Science. Detection, Isolation, and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM (Nonmotile) from Meat Products. USA, 2002. p: 1-13. <http://www.fsis.usda.gov/ophs/Microlab/Mlg5.03.pdf>
- 25.United States Food Safety Office of Laboratory QA/QC Division. Laboratory Guidebook. FSIS Procedure for the Use of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM (Nonmotile) Screening Tests. 2005 http://www.fsis.usda.gov/PDF/Mlg_5A_01.pdf
- 26.Wetzel A N, LeJeune J T. Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 strains that do not produce Shiga toxin from bovine, avian and environmental sources. Letters in Appl Microbiol 2007, 45:504-507
- 27.World Health Organization. Consultation on prevention and control of enterohemorrhagic (EHEC) infections. In: World Health Organization. Proceedings of the Report of a WHO. Consultation, Geneva, Switzerland. 1997.
- 28.World Health Organization 1998. Zoonotic Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC), World Health Organization, Department of Communicable Disease Surveillance and Response WHO/CSR/APH/98.8. Berlin, Germany.
- 29.Zhang W, Bielaszewska M, Thorsten K, Karch H. Identification, characterization, and distribution of a Shiga toxin 1 gene variant (*stx1c*) in *Escherichia coli* strains isolated from humans. J. Clin. Microbiol. 2002, 40: 1441-1446.

INHIBICIÓN DE *Escherichia coli* O157:H7 POR CEPAS *Lactobacillus* AISLADAS DE QUESO OVINO

Vallejo M, Etchechoury V, Horiszny C, Marguet E

Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew),
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco.

Resumen: En el presente trabajo se estudió la actividad inhibitoria sobre *Escherichia coli* O157:H7 de 6 cepas seleccionadas de *Lactobacillus* aisladas de queso ovino. El efecto antimicrobiano de los sobrenadantes de los cultivos de las cepas ensayadas no se inhibió por la actividad enzimática de la catalasa o la tripsina. En consecuencia, la producción de H₂O₂ o de un agente de naturaleza proteica, no se consideró como responsable del efecto inhibitorio. Por el contrario, la alcalinización neutralizó el efecto antibacteriano de los sobrenadantes, resultado que demostró que las cepas seleccionadas ejercieron la inhibición del crecimiento de *E. coli* O157:H7 debido a la producción de ácidos orgánicos, especialmente ácido láctico. La aplicación directa de cepas de bacterias ácido lácticas y/o sus metabolitos antimicrobianos para inhibir bacterias patógenas en alimentos se introdujo en el concepto de biopreservación. Estos resultados sugieren que las cepas de *Lactobacillus* estudiadas podrían ser utilizadas como cultivos iniciadores o adjuntos para mejorar la calidad microbiológica en la elaboración de queso ovino.

Palabras claves: *Escherichia coli* O157:H7, *Lactobacillus*, queso ovino

INHIBITION OF *Escherichia coli* O157:H7 BY *Lactobacillus* STRAINS ISOLATED FROM OVINE CHEESE

Abstract: In the present work the inhibitory activity on *Escherichia coli* O157:H7 of 6 selected *Lactobacillus* strains isolated from ovine cheese was studied. The antimicrobial effect of culture supernatants of assayed strains was not inhibited by enzymatic activity of catalase or trypsin. Therefore, the production of H₂O₂ or proteinase nature agent was not considered responsible for the inhibitory effect. On the other hand, the alcalinization abolished the antibacterial effect of the supernatants, result that demonstrated that the selected strains exert growth inhibition of *E. coli* O157:H7 due to production of organic acids, mainly lactic acid. The direct application of lactic acid bacteria strains and/or their antimicrobial metabolites to inhibit pathogenic bacteria in food was introduced in the concept of biopreservation. These results suggest that *Lactobacillus* strains studied could be used as starter or adjunct cultures to improve the microbiology safety in the manufacture of ovine cheese.

Key words: *Escherichia coli* O157:H7, *Lactobacillus*, ovine cheese

Fecha de recepción: 20/06/08

Fecha de aprobación: 01/09/08

Dirección para correspondencia: Emilio Marguet. Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew), Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco. Roca 115. (9100) Trelew.
E-mail: emarguet @yahoo.com.ar

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli productor de toxina Shiga (ECTS) es una enterobacteria comúnmente hallada en el tracto gastrointestinal (GI) de rumiantes, particularmente ganado bovino. *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) es un subtipo de ECTS que tiene la particularidad de colonizar el epitelio GI y producir severas enfermedades en el hombre, donde se destacan el síndrome urémico hemolítico (SUH), colitis hemorrágica (CH) y púrpura trombocitopénica (PT). Las toxinas Shiga Stx1, Stx2 y sus variantes son las responsables principales de la capacidad virulenta de estos microorganismos (1, 2). Otros factores como la intimina, responsable de la unión a eritrocitos y microvellosidades y la enterolisina, una citolisina formadora de poros, también contribuyen a su patogenicidad (3).

Muchos serotipos de *E. coli* productores de toxina Shiga han sido vinculados con SUH o CH en distintas regiones del mundo, sin embargo *E. coli* O157:H7 constituye el serotipo más prevalente asociado a casos esporádicos o brotes (2). Estas enfermedades infecciosas afectan especialmente a niños y se pueden producir como consecuencia del consumo de productos cárnicos sin adecuada cocción, leche cruda o derivados lácteos elaborados con leche sin un apropiado tratamiento térmico (4).

El SUH constituye un serio problema sanitario que ha sido reportado en todo el mundo, principalmente en países desarrollados del hemisferio norte. Argentina presenta la más alta incidencia de SUH (300-400 casos por año) por lo que ha sido considerado una patología endémica por la Organización Panamericana de la Salud.

Muchos estudios realizados en Argentina han demostrado una alta prevalencia de *E. coli* O157:H7 en ganado bovino (2, 3) y, aunque se ha demostrado su presencia en ganado ovino (5), no existen estudios que permitan establecer el estado actual en esta especie.

En la región patagónica, como en otras regiones del mundo con difíciles condiciones climáticas, lluvias escasas e irregulares y suelos erosionados, el ganado ovino constituye la especie dominante para la producción de fibras y carne. En los últimos años, en el Valle Inferior del Río Chubut (VIRCh) se concretó la idea del desarrollo de una cuenca lechera ovina destinada principalmente a la elaboración de quesos, como una forma de diversificar la producción (6). Este tipo de explotación es llevado a cabo en pequeños establecimientos donde se elaboran los quesos en condiciones de higiene deficientes u omitiendo normas en puntos críticos del procesamiento, originando un producto de baja calidad sanitaria. En consecuencia existe la posibilidad de transmisión de enfermedades alimentarias, especialmente las producidas por *E. coli* O157:H7, mediante

el consumo de quesos de origen ovino (7).

La elaboración de quesos en el VIRCh se realiza de acuerdo a protocolos preestablecidos (6) y utilizando productos comerciales para el proceso de fermentación. Las bacterias ácido lácticas (BAL) del fermento se encuentran al comienzo de la maduración en un alto número que luego comienza a declinar a medida que el proceso avanza. En las últimas etapas de la maduración, la flora adjunta originaria del ambiente de las queserías o de la leche, resulta dominante en la masa casearia, destacándose por su elevada población las cepas del género *Lactobacillus* (8).

Las BAL son bien conocidas por su capacidad de producir inhibidores tales como ácidos orgánicos, bacteriocinas, peróxido de hidrógeno, diacetilo y una serie de compuestos no identificados (9, 10,11). La aplicación directa de BAL o de metabolitos con capacidad antimicrobiana para inhibir bacterias indeseadas en alimentos podemos incluirla dentro del concepto de biopreservación (12).

En este trabajo se reporta la capacidad inhibitoria de 6 cepas del género *Lactobacillus* aisladas de quesos ovinos sobre cepas de *E. coli* O157:H7. También se presentan los resultados de los ensayos complementarios que se realizaron con el propósito de determinar los principios activos de la propiedad antibiótica.

MATERIALES Y MÉTODOS

MICROORGANISMOS

Las cepas de *E. coli* O157:H7 (ETw4, ETw6 y ETw20) utilizadas en este estudio pertenecen al cepario de la Cátedra de Biología Celular y Molecular (Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco).

TOMA DE MUESTRAS

Se analizaron quesos elaborados con leche ovina de tipo semiduros provenientes de dos plantas queseras ubicadas en la zona del VIRCh. Las muestras de queso se obtuvieron con sacabocado estéril y se procesaron dentro de las 4 horas.

AISLAMIENTO

Las muestras se sembraron en caldo de Man Rogosa Sharpe (MRS, Biokar, Francia) acidificado a pH 4,6 y 5,4 con ácido clorhídrico 0,2 N. Luego de 24 h de incubación a 35 °C los cultivos se repicaron a agar MRS suplementado con ácido nalidixico (40 µg/ml) y cicloheximide (10 µg/ml). Las cepas se conservaron, hasta el momento de su utilización, a -30°C en viales con leche descremada (10 %) y glicerol (10 %).

IDENTIFICACIÓN FENOTÍPICA

Las colonias sospechosas se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas:

- Coloración de Gram.
- Prueba de la catalasa.
- Fermentación de azúcares (13).
- Producción de gas (CO₂) a partir de glucosa.

ACTIVIDAD ANTAGÓNICA

Para determinar la actividad antagonista de las cepas aisladas se utilizó el método descrito por Reid con modificaciones (14). Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron en caldo MRS a 30 °C durante 16 h, luego se inocularon 20 µl del cultivo en 500 µl de agar MRS y se sembraron 50 µl de la mezcla en pocillos practicados en placas con agar MRS. Se incubó durante 12-14 h a 30 °C y posteriormente se adicionó otra capa de 10 ml de agar cerebro-corazón (BHI, Biokar, Francia) conteniendo 50 µl de las cepas de *E. coli* O157:H7 y se dejó incubar durante 24 h a 35 °C. La actividad antagonista se detectó por la presencia de halos de inhibición alrededor de los pocillos.

ENSAYOS ANTICROBIANOS DE LOS SOBRENANDANTES

Las cepas de *Lactobacillus* se cultivaron en caldo MRS a 35 °C hasta alcanzar la fase logarítmica. Luego del período de incubación los medios se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min. El ensayo antimicrobiano se realizó por el método de difusión en placa colocando 50 µl de sobrenadante en pocillos practicados en placas de agar BHI sembrados previamente con 50 µl de un cultivo de 12 hs de las cepas *E. coli* O157:H7 (15). Antes de la incubación a 35 °C durante 18-24 h, las placas se mantuvieron a 4-8 °C durante 2 h.

INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA, PH Y TRATAMIENTOS ENZIMÁTICOS SOBRE LA ACTIVIDAD INHIBITORIA

Los sobrenadantes crudos se trataron con NaOH 0,5 N hasta alcanzar la neutralidad. Los sobrenadantes neutralizados se sometieron posteriormente a una temperatura de 100 °C durante 5 min. En ambos casos la actividad residual se determinó por el procedimiento previamente descrito. La sensibilidad a enzimas se llevó a cabo, determinando la actividad residual luego de tratar los sobrenadantes con tripsina y catalasa (1mg/ml).

RESULTADOS

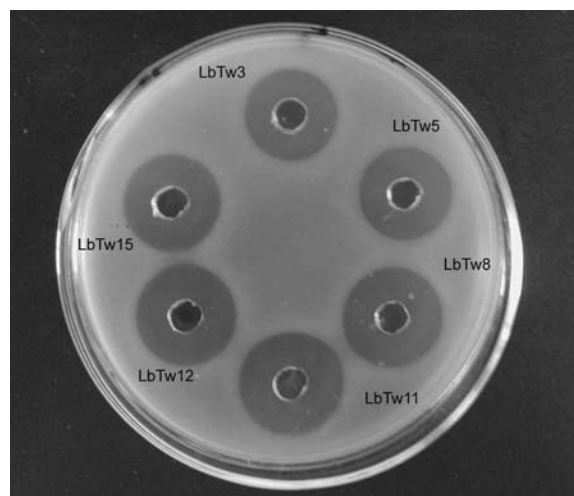
Se procesaron 47 muestras de queso ovino de las que se aislaron 22 cepas de *Lactobacillus*. Exceptuando 2 cepas, las restantes desarrollaron actividad antagonista contra las 3 cepas de *E. coli* O157:H7 estudiadas. Sobre la base de la más altas actividades determinadas, se seleccionaron las cepas *Lactobacillus* LbTw3, LbTw5, LbTw8,

LbTw11, LbTw12 y LbTw15 para realizar las pruebas complementarias. En la figura 1 se pueden observar los halos de inhibición de crecimiento de *E. coli* O157:H7 Tw4 debido a la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes crudos de las 6 cepas de *Lactobacillus* seleccionadas. Se incluye una sola figura debido a que las restantes cepas de *E. coli* O157:H7 exhibieron resultados similares. Este efecto se vio suprimido cuando los sobrenadantes se trataron con NaOH hasta alcanzar la neutralidad. Los mismos resultados se obtuvieron cuando los sobrenadantes neutralizados se sometieron al calentamiento de 100 °C durante 5 min.

El tratamiento con tripsina no modificó la actividad antagonista de los sobrenadantes crudos de las 6 cepas de *Lactobacillus*. El tratamiento enzimático llevado a cabo con catalasa tampoco alteró la inhibición ejercida por los sobrenadantes.

Fig. 1. Actividad inhibitoria de cepas de *Lactobacillus* sobre *E. coli* O157:H7 Tw4

Fig. 1. Inhibitory activity of *Lactobacillus* strains on *E. coli* O157:H7 Tw4



DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio permiten aseverar que existe una alta frecuencia de cepas de *Lactobacillus* aisladas de quesos ovinos que exhiben actividad antibacteriana contra *E. coli* O157:H7. La presencia de altas poblaciones de *Lactobacillus* durante las etapas más avanzadas de la maduración de este tipo de quesos (8, 16), sugiere que ejercerían un control natural contra el desarrollo de este microorganismo.

En el caso de las 6 cepas seleccionadas se observó que la actividad inhibitoria se neutralizó cuando los sobrenadantes se alcalinizaron, lo que demuestra que esta propiedad es llevada a cabo por la producción de ácidos orgánicos, especialmente ácido láctico. Este metabolito no sólo exhibe capacidad para interferir en la esta-

bilidad de la membrana externa de las bacterias Gram negativas sino que permite que otras moléculas lipofílicas o de alto peso molecular, puedan evitar esta barrera biológica y ejercer su efecto bactericida o bacteriostático aún en bajas concentraciones (17, 18).

La actividad antagonista de los sobrenadantes no se vio afectada luego del tratamiento con tripsina resultado que demuestra la ausencia de péptidos o proteínas involucrados en el fenómeno. La actividad enzimática de la catalasa tampoco hizo variar la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes por lo que es posible afirmar que no existe una relación entre el fenómeno y la presencia de peróxido de hidrógeno como principio activo.

Los lactobacilos constituyen un género de BAL que se caracteriza por producir grandes concentraciones de ácido láctico, propiedad que es aprovechada para incluirlos en los fermentos utilizados en la fabricación de quesos. Las 6 cepas estudiadas se aislaron de la flora adjunta, la que se desarrolla durante las últimas etapas de la maduración. Estas cepas son heterofermentativas y producen cantidades variables de los isómeros D y L de ácido láctico (16). Se ha demostrado que la actividad del isómero L ejerce un mayor poder antimicrobiano sobre *E. coli* O157:H7 que el isómero D y que su modo de acción no se limita a disminuir el pH intracelular del patógeno, sino que actuaría interfiriendo su metabolismo en forma específica (19). En el caso de las cepas estudiadas los futuros ensayos deberían ser destinados a determinar las concentraciones relativas de ambos isómeros que se producen bajo distintas condiciones de crecimiento, especialmente las halladas en el período de maduración de quesos.

El uso de cultivos seleccionados en la elaboración de productos lácteos fermentados ha despertado gran interés en la industria alimentaria debido a que no sólo influyen en las características nutricionales del producto sino también en su calidad microbiológica (20). Este nuevo concepto denominado biopreservación (12), para diferenciarlo de la preservación química de alimentos, ha inducido a investigar características metabólicas de microorganismos que potencialmente se puedan utilizar en productos destinados al consumo humano o animal.

E. coli O157:H7 es un patógeno que exhibe una alta persistencia en el tracto GI de los ovinos (21) en consecuencia, es factible hallarlo en subproductos como el queso especialmente cuando estos se elaboran en forma artesanal en establecimientos con condiciones o infraestruc-

tura deficientes (5). Debería prestarse especial atención a este fenómeno debido que este microorganismo puede colonizar el tracto GI del huésped y expresar sus factores de virulencia aún en una baja población (22).

Se ha demostrado en este trabajo la alta actividad antagonista de las 6 cepas de *Lactobacillus* seleccionadas contra *E. coli* O157:H7. El método de aislamiento utilizado, también demuestra la alta tolerancia de estas BAL para desarrollarse a pH ácido, condición que se observa durante el proceso de maduración; ambas propiedades metabólicas resultan relevantes desde el punto de vista industrial. Las cepas estudiadas podrían ser utilizadas como fermentos o ser incluidas como bacterias adjuntas en la elaboración de quesos ovinos, con el propósito de ejercer un efecto bacteriostático, bactericida o inhibir la expresión de factores de virulencia (18, 20, 23), influyendo de esta manera en la calidad sanitaria del producto.

BIBLIOGRAFÍA

- Carey CM, Kostrzynska M, Ojha S, Thompson S. The effect of probiotics and organic acids on Shiga-toxin 2 gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J. Microbiol. Methods 2008, doi:10.1016/j.mimet.2008.01.014.
- Guth BEC, Chinen I, Miliwebsky E, Cerqueira AMF, Chillemi G, Andrade JRC, Baschkiev A, Rivas M. Serotypes and Shiga toxin genotypes among *Escherichia coli* isolated from animals and food in Argentina and Brazil. Vet. Microbiol. 2003; 92:335-349.
- Padola NL, Sanz ME, Blanco JE, Blanco M, Blanco AI, Etcheverria AI, Arroyo GH, Usera MA, Parma AE. Serotypes and virulence genes of bovine Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) isolated from a feedlot in Argentina. Vet. Microbiol. 2004; 100:3-9.
- Miliwebsky E, Deza N, Chinen I, Martínez Espinosa E, Gómez D, Pedroni E, Caprile L, Bashckier A, Manfredi E, Leotta G, Rivas M. Excreción prolongada de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga en niños que concurren a jardines maternos de Argentina. Rev. Argent. Microbiol. 2007; 39:90-92.
- Marguet ER, Ledesma P. Aislamiento de *Escherichia coli* serotipo O157:H7 en un tambo ovino. Vet. Arg. 1999; 16:170-174.
- Marguet ER. Tesis Doctoral. 2004. Actividad de proteinasas lácticas sobre caseínas ovinas. Universidad Nacional del Sur, Dpto. Biología, Bioquímica y Farmacia.
- Caro I, García-Armesto MR. Occurrence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in a Spanish raw ewe's milk cheese. J. Food Microbiol. 2007; 116:410-413
- Yvon M, Rijnen L. Cheese flavour formation by amino acid metabolism. Int. Dairy J. 2001; 11:185-201.
- Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas ML. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food pres-

- ervation. Int. J. Food Microbiol. 2001; 71:1-20.
10. Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. Int. J. Food Microbiol. 2006; 106:1-24.
 11. Timmerman H, Koning CJM, Mulder L, Rombouts FM, Beynen AC. Monostrain, multistain and multi-species probiotics. A comparison of functionality and efficacy. Int. J. Food Microbiol. 2004; 96:219-233.
 12. Stiles ME. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie Van Leeuwenhoek. 1996; 70:331-345.
 13. Hammes WP, Vogel RF. The genus *Lactobacillus*. The genera of lactic acid bacteria, vol. 2. Wood, B.J.B. and W.H. Holzapfel (Eds.). Blackie Academic, London (UK), 1995; p19-54.
 14. Reid, G. In vitro testing of *Lactobacillus acidophilus* NCFM™ as a possible probiotic for the urogenital tract. Inter. Dairy J. 2000; 10:415-419.
 15. Floriano B, Ruiz-Barba JL, Jiménez-Díaz R. Purification and genetic characterization of Enterocin I from *Enterococcus faecium* 6T1a, a novel antilisterial plasmid-encoded bacteriocin which does not belong to the pediocin family of bacteriocins. Appl. Environ. Microbiol. 1998; 64:4883-4890.
 16. Chamba JF, Irlinger F. Secondary and adjunct cultures. Cheese, Chemistry, Physics and Microbiology, General Aspects, vol. 1. Fox, PF, McSweeney, PLH, Cogan, TM, Guinee, TP (Eds.), Elsevier Academic Press, London (UK), 2004; p. 191-206.
 17. Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. Lactic acid permeabilizes Gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66: 2001-2005.
 18. Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Tanaka R, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda T, Takeda Y. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due to production of lactic acid. Inter. J. Food Microbiol. 2001; 68:135-140
 19. McWilliam Leitch EC, Stewart CS. *Escherichia coli* O157 and non-O157 isolates are more susceptible to l-lactate than to d-lactate. Appl. Environ. Microbiol. 2002; 68: 4676-4678.
 20. Sánchez Valenzuela A, Díaz Ruiz G, Omar NB, Abriouel H, Lucas López R, Martínez Cañamero M, Ortega E, Gálvez A. Inhibition of food poisoning and pathogenic bacteria by *Lactobacillus plantarum* strain 2.9 isolated from ben saalga, both in a culture medium and in food. Food Control 2007; doi:10.1016/j.foodcont. 2007.08.009.
 21. Cornick NA, Booher SL, Casey TA, Moon HW. Persistent colonization of sheep by *Escherichia coli* O157:H7 and other *E. coli* pathotypes. Appl. Environ. Microbiol. 2000; 66: 4926-4934.
 22. Roldan ML, Chinen I, Otero JL, Miliwebsky ES, Alfaro N, Burns P, Rivas M. Aislamiento, caracterización y subtipificación de cepas de *Escherichia coli* O157:H7 a partir de productos cárnicos y leche. Rev. Argent. Microbiol. 2007, 39(2):113-119.
 23. Medellín-Peña MJ, Wang H, Johnson R, Anand S, Griffiths MW. Probiotics affect virulence-related gene expression in *Escherichia coli* O157:H7. Appl. Environ. Microbiol. 2007; 73: 4259-4267.

ESTUDIO COMPARATIVO DE LA EFICACIA DE OXITETRACICLINA A LA DOSIS DE 40 MG/KG Y TILMICOSINA, COMBINADAS CON MELOXICAM, EN EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD RESPIRATORIA BOVINA EN ANIMALES DE FEED LOT

Fazzio LE¹, Landoni MF²

1. Cátedra de Clínica Médica y Quirúrgica de Grandes Animales.
 2. Cátedra de Farmacología, Farmacotecnia y Terapéutica.
- Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

Resumen: La eficacia de oxitetraciclina a la dosis de 40 mg/kg (OXIT) y tilmicosina (TILM), en combinación con un antiinflamatorio no esteroide (AINE) fue evaluado clínicamente en animales que padecían de enfermedad respiratoria bovina (ERB). El ensayo se realizó entre los meses de junio de 2007 a enero de 2008, en un feed lot comercial con capacidad para 13.000 animales. Al llegar al establecimiento los animales fueron alojados al azar en corrales a los que se les asignaba un tratamiento específico, OXIT o TILM. El tratamiento sólo sería aplicado cuando el animal presentara signos de ERB. Noventa y nueve animales fueron tratados con OXIT y 122 con TILM en combinación con un AINE. No se encontraron diferencias significativas entre los días necesarios para la resolución del cuadro clínico, porcentaje de recuperación, porcentaje de re-tratamientos y casos de muerte entre los grupos OXIT y TILM. El costo por tratamiento con OXIT fue de 1.25 U\$S mientras que el de TILM fue de 4.91 U\$S. Los presentes resultados indican que OXIT y TILM, combinados con un AINE, poseen similar eficacia para el control de la ERB, con un costo menor para el antibiótico OXIT.

Palabras claves: Enfermedad respiratoria bovina, oxitetraciclina, tilmicosina, eficacia terapéutica, feed lot.

COMPARATIVE STUDY ON THE EFFICACY OF OXITETRACICLINE AT 40 MG/KG DOSE AND TILMICOSIN BOTH COMBINED TO MELOXICAM IN THE TREATMENT OF RESPIRATORY BOVINE DISEASE IN FEED LOT ANIMALS

Abstract: The efficacy of oxytetracycline used at 40 mg/kg dose (OXIT) and tilmicosin (TILM) both combined to a non steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) was clinically evaluated in animals with bovine respiratory disease (BRD). The study was performed between June 2007 and January 2008 in a commercial feed lot with capacity for 13.000 animals. After arrival, animals were randomly allocated into yards to which a treatment was previously assigned, OXIT or TILM. The treatment would only be administered if animals shown clinical signs of BRD. Ninety nine animals were treated with OXIT and 122 with TILM, both combined to a NSAID. No statistically significant differences between treatments were observed on days needed for disease resolution, percentage of recovery, percentage of re-treatment and number of deaths. The cost for treatment with OXIT was 1.25 U\$S, while for TILM was 4.91 U\$S. The present results show that OXIT and TILM, combined to a NSAID have similar efficacy for ERB treatment, although cost for OXIT was lower.

Key Words: Bovine respiratory disease, oxytetracycline, tilmicosin, therapeutic efficacy, feed lot.

Fecha de recepción: 21/08/08

Fecha de aprobación: 17/09/08

Dirección para correspondencia: Luis E. Fazzio, Cátedra de Clínica Médica y Quirúrgica de Grandes Animales. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata, Argentina. **E-mail:** fazzio@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

La enfermedad respiratoria bovina (ERB) es la principal entidad que afecta a explotaciones intensivas a corral (1, 2, 3). La ERB provoca importantes pérdidas económicas debido a la disminución en la ganancia diaria de peso, incremento en días hasta llegar a peso de faena, disminución en la calidad de la carcasa y pérdidas por muerte (4).

La ERB es el resultado de una compleja interacción entre agentes infecciosos, presencia stress y susceptibilidad individual (5).

Es ampliamente aceptado que el stress es la condición *sine qua non* para la aparición de la ERB. En el engorde a corral confluyen, en el periodo de iniciación, numerosos factores que son considerados estresantes entre ellos, el transporte (6), la adaptación al cambio de dieta (7), el clima (8) y la reorganización social del grupo que comparte el corral (7).

Los agentes infecciosos involucrados en los cuadros de ERB, incluyen virus y bacterias.

Entre los agentes virales más comúnmente reportados se destacan el virus sincitial, parainfluenza 3, herpes virus bovino tipo 1 y el virus de la Diarrea Viral Bovina. Los tres primeros afectan los mecanismos de defensa del sistema respiratorio (9,10), mientras que al restante se le atribuye un efecto inmunosupresor (disminución de la respuesta humoral, disminución quimiotáctica a monocitos y alteración del sistema mieloperoxidasa en polimorfonucleares) (11). Los estudios de Cusack et al., (2003) demostraron que solo el 10 % de los animales que seroconvirtieron para uno o más virus respiratorios mostraron signos clínicos. Estos resultados indican que los agentes virales no serían los agentes etiológicos primarios de los cuadros de ERB.

Entre los agentes bacterianos más comúnmente asociados a cuadros de ERB se incluyen *Pasteurella multocida*, *Mannheimia haemolytica*, *Arcanobacterium pyogenes*, *Haemophilus* spp. y *Mycoplasma* spp.; siendo *P. multocida* y *M. haemolytica* los microorganismos más frecuentemente aislados en hisopados nasofaríngeos y muestras de necropsia (7, 10, 12, 13). *M. haemolytica* jugaría un rol muy importante dentro de la ERB, debido a su alta capacidad para expresar factores de virulencia, entre ellos, adhesinas, polisacáridos capsulares, fimbrias y una leucotoxina específica para rumiantes la cual es esencial en la patogénesis de la enfermedad (14).

El tratamiento de la ERB se basa en el uso de antibióticos, los cuales se puede utilizar en combinación con un antiinflamatorio no esteroide (AINEs), que por su acción analgésica y antipirética ayudaría en la recuperación del animal (15). Numerosos antibióticos han sido utilizados con éxito en el tratamiento de ERB (9,16,17,18). En general estos antibióticos son seleccionados por

la sensibilidad *in vitro* de cultivos naso-faríngeos o por aislamientos realizados en pulmones de necropsia (19).

Entre los antibióticos más utilizados se encuentran aquellos que presentan amplio espectro y amplia distribución como lo son: tetraciclinas (oxitetraciclina), macrólidos (tilmicosina, tulatromicina, eritromicina, tilosina), fluoroquinolonas (enrofloxacina), fenicoles (florfenicol) y sulfas. Algunos antibióticos presentan ventajas comparativas como, única dosis, altas concentraciones tisulares y alta persistencia en el lugar de infección; tal es el caso de tilmicosina (TILM) (20). Esto brinda practicidad y tiempo de cobertura aceptable cuando se realiza el tratamiento de la ERB. Oxitetraciclina (OXIT) es otro de los antibióticos largamente probados aunque con menores atributos cuando se la compara con TILM (21). Sin embargo, resultados equiparables se obtuvieron cuando se la utiliza de manera profiláctica y en formulaciones más concentradas (30 mg/kg) (22). Cuando es impracticable dosificar reiteradas veces, es factible utilizar OXIT a dosis de 40 mg/kg, la cual ha sido efectiva aún en animales que no respondían al tratamiento de ERB a la dosis convencional (20 mg/kg) (23, 24).

Meloxicam es un AINE derivado enólico, perteneciente a la familia de los oxicames. Como el resto de los AINEs, es un potente inhibidor de la enzima ciclooxigenasa, en consecuencia provoca tres efectos terapéuticos: antiinflamatorio, analgésico, y antipirético. Se utiliza como terapia complementaria en la ERB, a dosis única administrado por vía subcutánea (0,5 mg/kg) (25).

El objetivo del presente estudio fue comparar la eficacia de OXIT de larga acción a la dosis de 40 mg/kg y de TILM a la dosis de 10 mg/kg administradas por vía subcutánea en combinación con meloxicam en cuadros clínicos de ERB en animales de *feed-lot*.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo se realizó entre los meses de junio de 2007 a enero de 2008, en un *feed-lot* comercial con capacidad para 13.000 animales ubicado en la localidad de Marcos Paz, Provincia de Buenos Aires, Argentina. Se utilizaron animales de diferentes razas (Hereford, Aberdeen Angus y sus cruza), recién destetados que fueron adquiridos en remates ferias o por compra directa en los establecimientos de origen. La edad al momento del ingreso fue de 4 a 8 meses con pesos que variaron de 80 a 210 kilogramos. Al ingreso al *feed lot* fueron identificados individualmente con caravanas y se les aplicó una dosis de vacuna polivalente clostridial (Policlostrigen® Biogénesis-Bagó) y antiparasitario (Ivergen® - ivermectina 1%- Bogénesis-Bagó). La alimentación fue a base de granos maíz, expeler de girasol, afrechillo de trigo y núcleo vitamínico mineral. El contenido de

fibra de la ración inicial (primeros 20 días) fue del 23 % la cual fue disminuyendo progresivamente hasta llegar al 8 % en la última etapa.

A su arribo al establecimiento los animales fueron alojados al azar en corrales de recepción numerados del 1 al 18. A cada corral se le asignó un tratamiento específico, el cual sería aplicado en el caso de que el animal perteneciente al corral mostrara signos de ERB.

Los animales alojados en corrales "impares" (n=3969) (1,3,5,7,9,11,13,15,17), grupo OXIT, recibiría oxitetraciclina base (Maxibiotic® 20% L.A-Biogénesis-Bagó) a la dosis de 40 mg/kg por vía subcutánea y los animales alojados en corrales "pares" (n=5033) (2,4,6,8,10,12,14,16,18) grupo TILM, recibiría tilmicosina (Micotil® 300 Elanco Animal Health), por la misma vía, a la dosis de 10 mg/kg. Ambos antibióticos serían administrados en combinación con meloxicam (Metacam® 20% Boehringer Ingelheim) a la dosis de 0.5 mg/kg.

Los animales permanecieron en los corrales asignados a lo largo de todo el periodo del ensayo (45 días). Los grupos eran observados dos veces al día (por la mañana y tarde) por veterinarios y personal entrenado en el diagnóstico de ERB. Los signos clínicos evaluados fueron divididos como se muestra a continuación:

Signos básicos:

- a- apariencia general del animal y actitud
- b- hiperpnea (> 35/min)
- c- presencia de secreción por ollares
- d- temperatura corporal rectal por encima

de 39,5 °C.

Signos complementarios:

- a- tos
- b- presencia de secreciones oculares
- c- indiferencia al medio
- d- renuencia al movimiento
- e- posición ortopneica
- f- decúbito permanente

El estado clínico de los animales fue clasificado en cuatro grados: Grado 0 (sin signos), grado 1 (leve, con presencia de los signos básicos), grado

2 (estado moderado, signos básicos acompañados de uno o dos signos complementarios) y grado 3 (estado grave, signos básicos acompañados por más de tres signos complementarios).

Los animales afectados (clasificados como leves, moderados o graves) fueron identificados por una caravana accesoria numerada y pintados sobre el lomo para una rápida identificación.

Todos los animales que murieron durante el estudio fueron sometidos a estudios anatomopatológicos, recolectándose muestras para estudios bacteriológicos.

El análisis estadístico de los resultados se realizó mediante la prueba de χ^2 . En todos los casos se consideró significativa una $p < 0.05$.

RESULTADOS

No se observaron diferencias significativas en la incidencia de ERB entre los diferentes corrales. Tampoco se observaron diferencias significativas en el peso de los animales tratados con TILM u OXIT (139 ± 31 y 139 ± 34 kg, respectivamente) (Tabla 1).

El tiempo transcurrido desde la llegada al establecimiento y la aparición de los primeros enfermos fue similar en ambos grupos (25 ± 14 y 17 ± 10 días, para los grupos TILM y OXIT, respectivamente) (Tabla 1).

De los 122 animales diagnosticados con ERB y tratados con TILM solo uno requirió una 2° dosificación.

De los 99 animales diagnosticados con ERB y tratados con OXIT, dos requirieron una 2° dosificación, cabe aclarar que en ambos casos el cuadro inicial había sido clasificado como leve.

La mortalidad fue numéricamente mayor para el grupo TILM (3,27 %) comparado en el grupo OXIT (2,02 %), sin embargo la diferencia no fue estadísticamente significativa.

El porcentaje de recuperación fue similar en ambos grupos cuando el cuadro era leve. Sin embargo, se observaron diferencias cuando los casos eran moderados o graves. Para los cuadros

Tabla 1. Eficacia al tratamiento y días que fueron necesarios hasta su recuperación o muerte en animales con estados leve, moderados y graves de enfermedad respiratoria bovina.

Table 1. Efficacy to the treatment and days those were necessary to recovery or death in animals with bovine respiratory disease slight, moderates and serious.

Grupo	N° de animales tratados una vez	N° de animales con dos trat.	N° de animales recuperados al 1° trat. (%)	N° de animales recuperados al 2° trat. (%)	N° de animales muertos (%)	Días hasta recuperación X (SD)
OXIT	99	2	95 (96)	97 (98)	2(2)	5,29 (1,82)
TIL	122	1	117 (96)	118 (97)	4 (3)	5,36 (1,79)
p =	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

trat. tratados

moderados OXIT mostró una muy alta eficacia (100 %). Para TILM la eficacia fue menor (92%), siendo en este cohorte donde se observó la máxima mortalidad (3 animales). Para los cuadros graves OXIT mostró una muy baja eficacia, de los 2 animales tratados ninguno sobrevivió. En el grupo TILM la recuperación fue del 66 %, reflejando una mejor eficacia (de los 3 animales tratados, 2 se recuperaron y el restante murió).

Los hallazgos anatomopatológicos y bacteriológicos confirmaron que todas las muertes fueron consecuencia de ERB.

DISCUSIÓN

Los presentes resultados indican que OXIT y TILM, combinados con un AINE, poseen similar eficacia para el control de la ERB. Asimismo, no se encontraron diferencias en el tiempo necesario para la resolución del cuadro clínico (5,29 y 5,36 días para OXIT y TILM respectivamente) (Ver Tabla 1).

Resultados similares han sido informados por otros autores (10, 21, 26). Sin embargo, estos autores informan ciertas ventajas terapéuticas para TILM, como disminución de la severidad del curso de la enfermedad (26), rápida resolución de los signos clínicos (10) y la reducción del número de re-tratamientos (21). Cabe aclarar que en el presente estudio la dosis de OXIT utilizada fue más alta que la informada por los autores anteriormente mencionados, lo que puede explicar la ausencia de las ventajas enumeradas para TILM.

Schunicht (2002) comparó el uso profiláctico de TILM y OXIT (en solución al 30 % a la dosis de 30 mg/kg). En este estudio se reporta un mayor número de re-tratamientos en el grupo OXIT ($p < 0.05$) por aparición de fiebre indiferenciada, no obstante esto, no se encontraron diferencias entre primera, segunda y tercera recaída, ni en los parámetros productivos (peso final, ganancia diaria de peso y consumo de materia seca). Estos datos coinciden con los informados en el presente estudio, con excepción del número de tratamientos requeridos, que fue similar para los dos antibióticos ensayados. Es importante remarcar la diferencia en la dosis de OXIT utilizada en ambos estudios, lo que podría indicar la mayor eficacia a la dosis de 40 mg/kg comparada con la de 30 mg/kg utilizada por Schunicht (2002).

Desde el punto de vista económico, el costo por tratamiento con OXIT fue sustancialmente menor que el de TILM (1,25 vs 4,91 U\$S respectivamente), aún cuando la dosis utilizada, 40 mg/kg, es el doble de la dosis clásicamente utilizada para el tratamiento de BRD en bovinos.

En relación a la dosis administrada, aún cuando existen informes asociando la repetición de dosis altas de OXIT con un aumento en la incidencia de problemas renales (27), en el pre-

sente ensayo no se observaron signos clínicos ni evidencias macro o microscópicas indicativas de alteración renal en ninguno de los animales experimentales. Asimismo, no se observó ningún tipo de reacción local tras la administración subcutánea de OXIT, aun cuando los laboratorios fabricantes recomiendan el uso de la vía intramuscular profunda. El uso de la vía subcutánea tiene la ventaja de no lesionar el músculo y por lo tanto evita las potenciales pérdidas económicas que una lesión muscular provoca en animales productores de carne.

Los presentes resultados indican que no existen diferencias en la eficacia terapéutica de TILM (10 mg/kg) y OXIT (40 mg/kg), combinadas con meloxicam, en cuadros de ERB en animales de feed lot. Sin embargo, la diferencia en el costo entre ambos tratamientos es significativa; siendo el costo del tratamiento basado en OXIT a la dosis de 40 mg/kg tres veces menor que el tratamiento con TILM.

BIBLIOGRAFÍA

- 1- Kelly AP, Janzen ED. A review of morbidity and mortality rates and disease occurrence in North America feedlot cattle. *Can. Vet. J* 1986. 27: 496-500.
- 2- Costa EF, Giuliadori MJ, Dezillio M, Romero JR. Mortalidad en un feedlot de La Plata (Buenos Aires, Argentina): causas, distribución mensual e impacto económico. *Analecta Veterinaria* 2003; 23: 13-19.
- 3- Schunicht OC, Booker CW, Guichon PT, Jim GK, Wildman BK, Pittman TJ, Perrett T. An evaluation of the relative efficacy of tulathromycin for the treatment of undifferentiated fever in feedlot calves in Nebraska. *Can Vet J.* 2007 Jun;48(6):600-6.
- 4- Thompson PN, Stone A, Schultheiss WA. Use of treatment records and lung lesion scoring to estimate the effect of respiratory disease on growth during early and late finishing periods in South African feedlot cattle. *J. Anim. Sci.* 2006. 84:488-498.
- 5- Radostits, OM.; Gay, CC.; Blood, DC.; Hinchcliff, KW. *Medicina Veterinaria. Tratado de las enfermedades del Ganado bovino, ovino, porcino, caprino y equino.* 9ª Edición. Ed. Mc Grow- Hill. 2002. pp 514-547.
- 6- Johnson EG. Feedlot management practices and bovine respiratory disease. *Vet Clin North Am Food Anim Pract.* 1985 Jul;1(2):413-8.
- 7- Cusack PM, Mc Meniman N, Lean IJ. The medicine and epidemiology of bovine respiratory disease in feedlots. *Aust Vet J.* 2003 81:480-7.
- 8- Irwin MR, McConnell S, Coleman JD, Wilcox GE. Bovine respiratory disease complex: a comparison of potential predisposing and etiologic factors in Australia and the United States. *Journal of American Veterinary Medical Association.* 1979, 175: 1095-1099.
- 9- Doherty ML, Healy AM, Sherlock M, Cromie L, Mc Elvogue G. Combined oxitetracycline- flunixin therapy in field cases of acute bovine respiratory disease. *Irish Veterinary Journal* 2001, Vol 54 (5) 232-238.

- 10- Keita A, Pommier P, Pagot E, Couper A, Cromie L. A combination oxytetracycline /flunixin treatment of respiratory infections in cattle. *Revue Méd. Vét.* 2007, 158, 02, 86-91.
- 11- Roth JA, Kaeberle ML, Griffith RW. Effect of bovine viral diarrhoea virus infection on bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Am J Vet Res* 1981; 42: 244 - 250.
- 12- Rice JA, Carrasco-Medina L, Hodgins DC, Shewen PE. *Mannheimia haemolytica* and bovine respiratory disease. *Animal Health Research Reviews* (2007), 8:117-128.
- 13- Dabo SM, Taylor JD, Confer AW. *Pasteurella multocida* and bovine respiratory disease. *Anim Health Res Rev.* 2007 Dec ;8 (2):129-50.
- 14- Zecchinon L, Fett T, Desmecht D. How *Mannheimia haemolytica* defeats host defence through a kiss of death mechanism. 2005. *Vet. Res.* 36: 133-156.
- 15- Elitok B, Elitok ÖM. Clinical efficacy of carprofen as an adjunct to the antibacterial treatment of bovine respiratory disease. *J. vet. Pharmacol. Therap.* 2004, 27: 317-320.
- 16- Booker CW, Jim GK, Guichon PT, Schunicht OC, Thorlakson BE, Lockwood PW. Evaluation of florfenicol for the treatment of undifferentiated fever in feedlot calves in western Canada. *Can Vet J.* 1997 September; 38: 555-560. PMID: PMC1576756.
- 17- Morock DW, Merrill J K, Gard M S, Olson ME, Nation PN. Treatment of experimentally induced pneumonic pasteurellosis of young calves with tilmicosin. *Can J Vet Res.* 1997 July; 61(3): 187-192.
- 18- Jim GK, Booker CW, Guichon PT, Schunicht OC, Wildman BK, Johnson JC, Lockwood PW. A comparison of florfenicol and tilmicosin for the treatment of undifferentiated fever in feedlot calves in western Canada. *Can Vet J.* 1999 March; 40(3): 179-184.
- 19- Allen JW, Viel L, Batemam KG, Rosendal S, Shewen PE, Physick-Sheard P. The microbial flora of the respiratory tract in feedlot calves: Associations between nasopharyngeal and bronchoalveolar lavage cultures. *Can J Vet Res* 1991; 55: 341-346.
- 20- Lawrence K. Micotil: safe use and administration. *Vet. Rec.* 2007.161:731-740.
- 21- Laven R, Andrews AH. Long-acting antibiotic formulations in the treatment of calf pneumonia: a comparative study of tilmicosin and oxytetracycline. *Vet Rec.* 1991 Aug 10;129(6):109-11.
- 22- Schunicht OC, Guichon PT, Booker CW, Jim GK, Wildman BK, Hill BW, Ward TI, Bauck SW, Jacobsen JA. A comparison of prophylactic efficacy of tilmicosin and a new formulation of oxytetracycline in feedlot calves. *Can Vet J.* 2002 May; 43(5): 355-362.
- 23- Nouws JFM, Van Ginneken CAM, Ziv G. Age dependent pharmacokinetics of oxytetracycline in ruminants. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 1983. 6: 59-66.
- 24- Terhune TN, Upson DW. Oxytetracycline pharmacokinetics, tissue depletion, and toxicity after administration of a long acting preparation at double the label dosage. *J Am Vet Med Assoc.* 1989. 194 (7): 911-7.
- 25- Fritton GM, Cajal C, Ramirez Romero R, Kleemann R. Clinical efficacy of meloxicam (Metacam) and flunixin (Finadyne) as adjuncts to antibacterial treatment of respiratory disease in fattening cattle. *Berl Munch Tierarztl Wochenschr.* 2004.117(7-8):304-309.
- 26- Musser J, Mechor GD, Gröhn YT, Dubovi EJ, Shin S. Comparison of tilmicosin with long-acting oxytetracycline for treatment of respiratory tract disease in calves. *J Am Vet Med Assoc.* 1996 Mar 1;208(5):655-6.
- 27- Lairmore MD, Alexander AF, Powers BE, Milisen WB, McChesney AE, Spraker TS. Oxytetracycline-associated nephrotoxicosis in feedlot calves. *J Am Vet Med Assoc.* 1984 Oct 1;185(7):793-5.

BOTULISMO POR *Clostridium botulinum* TIPO C EN PATOS EN URUGUAY

Cattáneo M^{1,2}, Bermúdez J^{1,2}, Duran E², Baison M², Meriño I²,
Carvalho Filho MB³, Nascimento RAP³, Lobato FCF⁴, Uzal FA⁵, Assis RA³

¹ Área de Bacteriología. Departamento de Microbiología. Facultad de Veterinaria.
Universidad de la República. Uruguay.

² Laboratorio Santa Elena S.A. Uruguay.

³ Ministerio da Agricultura, Pecuaria e Abastecimento, LANAGRO-MG, Brasil.

⁴ Escola de Veterinária da UFMG, Belo Horizonte, MG, Brasil.

⁵ California Animal Health and Food Safety Laboratory System, CA, USA.

RESUMEN: El botulismo en aves es una toxi-infección producida por la ingestión de toxina botulínica preformada o esporas de *Clostridium botulinum*. El agente produce gran mortalidad en aves acuáticas y se encuentra presente en la mayoría de los países del mundo. El objetivo del presente trabajo es informar una mortandad debido a toxi-infección por *C. botulinum* tipo C en patos de un criadero del Departamento de Salto. La sintomatología clínica que presentaban los animales fue disnea, respiración a pico abierto, parálisis flácida del cuello (cuello colgante) y patas estiradas hacia atrás. Se detectó toxina botulínica en contenido de ciego de los patos y agua y se aisló *C. botulinum* tipo C del agua de bebida. Los resultados obtenidos sugieren que el brote fue a causa de la ingestión de esporas de *C. botulinum* tipo C presentes en el agua de bebida.

Palabras claves: Patos, botulismo, *Clostridium botulinum* tipo C.

BOTULISM *Clostridium botulinum* TYPE C IN DUCKS IN URUGUAY

ABSTRACT: Botulism in birds is a toxi-infection caused by the ingestion of preformed toxin or spores of *Clostridium botulinum*. This disease produces high mortality in waterfowl and it occurs in most countries of the world. The objective of this paper is to report an outbreak of botulism by *C. botulinum* type C in ducks in a duck farm of Salto Department, Uruguay. The clinical signs consisted of dyspnoea, open mouth breathing and flaccid paralysis of the neck. *C. botulinum* type C toxin was detected in cecal content of the ducks and in drinking water. This microorganism was also isolated from the water. The results suggest that the outbreak was caused by the ingestion of spores of *C. botulinum* type C present in the drinking water.

Keys Words: Ducks, botulism, *Clostridium botulinum* type C

Fecha de recepción: 19/07/08

Fecha de aprobación: 12/12/08

Dirección para correspondencia: M. Cattáneo. Departamento de Microbiología. Facultad de Veterinaria. UdelaR. Uruguay. Lasplaces 1550, Montevideo, Uruguay, CP 11.600, tel.: 0598-02-6227311

E-mail: catta1973uy@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

El botulismo en aves es una toxi-infección producida por la ingestión de toxina preformada o esporas de *Clostridium botulinum*. Esta bacteria produce 8 tipos de neurotoxinas diferentes (A, B, C, D, E, F y G) siendo la intoxicación más común en aves la del tipo C. El botulismo produce gran mortalidad en aves acuáticas, encontrándose presente en la mayoría de los países del mundo. Los síntomas más característicos son parálisis flácida afectando los músculos de las alas y del cuello; esto último le provoca la muerte por inmersión al no poder los patos mantener la cabeza por encima del agua. Los animales se pueden intoxicar a partir de alimentos y agua contaminados. La ración contaminada con materia orgánica en descomposición, la muerte de aves o peces en el agua y vegetales muertos son los lugares adecuados para la producción de toxina botulínica. En Uruguay, en 1948, Trenchi y col (1), describieron la enfermedad en patos, de los que aislaron *C. botulinum* a partir de hemocultivo.¹⁻⁴ El objetivo del presente trabajo es informar un brote de botulismo por *C. botulinum* tipo C en patos y el aislamiento de este microorganismo del agua de bebida en un criadero familiar del Departamento de Salto, Uruguay.

MATERIALES Y MÉTODOS

HISTORIA CLÍNICA

El brote se produjo en un establecimiento familiar ubicado en el Barrio Artigas de la ciudad de Salto dedicado a la cría de patos, donde había una población de 200 animales al momento del brote. La anamnesis indicaba que 185 patos murieron con síntomas de parálisis flácida en un periodo de 2 meses y al momento de realizar una visita al criadero solo quedaban 15 patos vivos, de los cuales 4 presentaban alteraciones clínicas y 11 fueron considerados clínicamente sanos. La sintomatología clínica que presentaban los 4 patos enfermos al momento de la visita consistía en disnea, respiración con pico abierto, parálisis flácida del cuello (cuello colgante) y patas estiradas hacia atrás. Según los dueños del criadero los animales comenzaban a morir a partir de las 24 a 48 horas de administrarles una ración de afrechillo de trigo recién adquirida. La mayoría de los patos morían el mismo día que comenzaban a mostrar alteraciones clínicas, en forma aguda. La ración fue retirada a los 15 días de comenzadas las muertes, pero estas continuaron por un periodo de 45 días.

Se tomaron muestras de sangre de los 4 patos con sintomatología clínica descrita más arriba, se los sacrificó y se les realizó necropsia completa, recogiendo las siguientes muestras en forma aséptica: hígado, cerebro, contenido del intestino delgado y contenido del ciego. La

sangre se centrifugó, separándose el suero. Se tomaron además muestras de agua de un charco que utilizaban los animales para beber.

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS EN LABORATORIO

Las muestras fueron enviadas refrigeradas al laboratorio donde se las mantuvo entre 4-8 °C hasta el momento de su procesamiento dentro de las 24 h de obtenidas. La utilización de animales de laboratorio se realizó bajo las normas y procedimientos de la Comisión Honoraria de Experimentación Animal -CHEA de la Universidad de la República (2).

ESTUDIO TOXICOLÓGICO

Las muestras de tejido (hígado y cerebro) y contenido intestinal fueron diluidas en un buffer de gelatina obteniéndose una suspensión homogénea la que se centrifugó a 3.000 g y se filtró por membrana esterilizante de 0,22 µm. Se inocularon 2 ratones blancos adultos en forma intraperitoneal con 0,5 ml del supernadante de cada muestra. Además, dos ratones se inocularon también en forma intraperitoneal con 0,5 ml de las muestras de agua y suero, respectivamente, previamente filtradas como se indicó más arriba. Los ratones fueron observados durante 5 días para registrar sintomatología o muerte. A los materiales que provocaron síntomas se lo neutralizó con antitoxina botulínica de los tipos C y D. Para esto se utilizaron antitoxinas del tipo C y D con 5 y 1 UI/ml (Veterinary Research Institute, Onderstepoort, Sudáfrica). Se enfrentaron 0,1 ml de la antitoxina con 0,5 ml de la muestra, se incubaron 60 minutos a 37 °C y se inocularon ratones en forma intraperitoneal (3, 4).

ESTUDIO BACTERIOLÓGICO

De la suspensión de los materiales y del agua se inocularon tubos con medio de carne picada (Cooked Meat; DIFCO™, USA) y se incubaron durante 48 horas a 37 °C. Los cultivos con crecimiento se centrifugaron a 3000 RPM, durante 10 minutos, a una temperatura de 18 °C y se inocularon ratones utilizando el mismo procedimiento que en los estudios toxicológicos. Los cultivos positivos a toxina botulínica se subcultivaron para obtener cultivos puros. Estos consistieron en siembra en placas de agar sangre en forma anaeróbica durante 72 horas a 37 °C. Una vez obtenido la colonia aislada se le realizaron las siguientes pruebas: tinción de Gram, tinción de espora (Wirtz-Conklin), pruebas bioquímicas de rutina, inmunofluorescencia directa y estudios toxicológicos tal como se describió más arriba (3, 4, 5, 6).

RESULTADOS

HALLAZGOS DE NECROPSIA

No se observaron lesiones macroscópicas en los animales examinados.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

El contenido del ciego y el agua sembrados en medio de carne picada fueron positivo a toxinas de *C. botulinum* tipo C. El resto de los materiales fueron negativos para el ensayo en ratones. En los estudios bacteriológicos solamente la muestra de agua brindo cultivos puros, caracterizado por el crecimiento de colonias blanco-cizentadas de aproximadamente 1 cm de diámetro y borde regular, características de *C. botulinum*. En la tinción de Gram se observaron bacilos Gram positivos y en la tinción de Wirtz la presencia de esporas ovaladas y subterminales. Las pruebas bioquímicas mostraron el siguiente resultado: Lecitina (-), Lipasa (+), glucosa, maltosa y hidrólisis de la gelatina (+), lactosa, sacarosa e indol (-). En la IFD se observó la presencia de bacilos positivos a *C. botulinum*. El estudio toxicológico de las colonias mostraron resultados positivos a toxinas de *C. botulinum* tipo C. Del cultivo de las otras muestras se obtuvieron cultivos mixtos en los que no se pudieron identificar colonias de *C. botulinum*.

DISCUSIÓN

En base a los signos clínicos, hallazgos de necropsia y toxicológicos, se confirmó la ocurrencia de botulismo por la toxina botulínica del tipo C. Se detectó la presencia de toxina botulínica tipo C en cultivos obtenidos de contenido de ciego de patos, en forma similar a lo que sucede en otras regiones del mundo, incluyendo el Uruguay. Se consideró que la ingestión de agua conteniendo las esporas fue la causa de este brote de toxi-infección botulínica ya que el agua del charco inoculada directamente en ratones fue negativa, mientras que el crecimiento obtenido de la siembra del agua en medio de carne picada (Cooked Meat; DIFCO™, USA) fue positivo a la inoculación en ratones y asilándose a partir de este mismo material *C. botulinum*.

BIBLIOGRAFÍA

1. Trenchi, H. Laringotraquitis infecciosa su comprobación en el Uruguay y intoxicación botulínica en patos. MGA. Dirección de Ganadería. Imprenta Rosgal. Ejido 1624, 1948; p. 3 -13.
2. www.csic.edu.uy/chea/
3. Sterne M, Batty I. *Pathogenic Clostridia*. Butterworth. 1975.
4. Metodología diagnósticas de las enfermedades producidas por el género clostridium. Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Argentina. 1984. Serie técnica n° 1.

5. Quinn PJ, Carter M, Carter, G. Clinical Veterinary Microbiology. 9 ed. USA. Ed. Mosby, 1994; p. 191-208.

6. Bermudez J, Cobo A, Lopez R, Franchi M, Mederos A. Botulismo: Primera comunicación sobre la detección de toxina botulínica en bovinos, en el Uruguay. 1982. www.santalena.com.uy

7. Cattáneo M, Bermúdez. Botulismo. 2006. www.santalena.com.uy

EFFECTO DE DISTINTOS NIVELES DE SUPLEMENTACIÓN DIETÉTICA CON ZINC EN LA FRACCIÓN PROSTÁTICA DEL EYACULADO CANINO

García Romero G, Valiente C, Ranea G, Rosa D, Mattioli G, Gobello C, Corrada Y

Laboratorio de Nutrición Mineral y Fisiología Reproductiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP. Calle 60 y 118 CC296 CP 1900. La Plata, Argentina.

Resumen: El zinc cumple funciones importantes en la próstata canina. El objetivo del presente estudio consistió en describir y comparar el efecto de dos concentraciones de óxido de zinc en la dieta sobre la fracción prostática del eyaculado, para el cual se utilizaron 8 caninos con parámetros reproductivos normales alimentados con alimento balanceado comercial conteniendo 275 mg de zinc/kg MS. El estudio tuvo una duración de 6 meses, divididos en periodos de 2 meses cada uno: pretratamiento (PRT), postratamiento1 (POST1) y postratamiento2 (POST2). Durante ambos periodos POST los animales recibieron aleatoriamente 525 mg de óxido zinc [(Grupo Zinc) n=4]; y ninguna suplementación [(Grupo Control) n=4]. Durante PRT, las concentraciones de zinc en la fracción prostática no fue diferente entre el Grupo Control y el Grupo Zinc ($316 \pm 69,45$ vs. $356,37 \pm 54,62$; $p > 0,65$). Durante POST1 las concentraciones fueron mayores en el Grupo Zinc respecto del Grupo Control ($348 \pm 83,89$ vs. $1412,5 \pm 190,98$; $p < 0,01$). Igual situación se produjo durante POST2 ($616,16 \pm 142,81$ vs. $2556,25 \pm 627,46$; $p < 0,05$). Cuando se compararon los 3 periodos del Grupo Zinc la concentración de zinc en la fracción prostática sufrió una variación significativa entre los periodos PRT y POST1 ($p < 0,01$) y entre los periodos PRT y POST2 ($p < 0,05$). Se concluye que la suplementación oral con óxido de zinc eleva su concentración en la fracción prostática del eyaculado, abriendo un panorama alentador en el tratamiento y prevención de las afecciones de la próstata canina basada en la terapéutica dietética con óxido de zinc.

Palabras clave: Zinc, Dieta, Perro, Próstata, Eyaculado

EFFECT OF DIFFERENT LEVELS OF ZINC SUPPLEMENTATION ON THE PROSTATIC FRACTION OF CANINE EJACULATE

Abstract: Zinc is an important oligoelement in canine prostatic function. The objective of this study was to describe and compare the effect of two diet concentrations of zinc oxide on prostatic fraction of canine ejaculate. Eight reproductively normal dogs were fed a commercial food containing 275 mg de zinc/kg DM during six months which were divided in pre treatment (PRT), post treatment 1 (POST1) and post treatment 2 (POST2) periods of two months each. During both POST periods the dogs were randomly allocated to a supplemented group, which received 525 mg/DM zinc oxide (Zinc Group; n=4) or a control group (Control Group; n=4) which did not receive any supplement. During PRT there were no differences in zinc concentration between groups ($316 \pm 69,5$ vs. $356,4 \pm 54,6$; $p > 0,65$), although zinc concentrations were higher in Zinc group during POST1 ($348 \pm 83,9$ vs. $1412,5 \pm 190,9$; $p < 0,01$) and POST2 ($616,2 \pm 142,8$ vs. $2556,6 \pm 627,5$; $p < 0,05$). Zinc concentrations also increased throughout periods when compared among themselves ($p < 0,01$). It is concluded that this zinc supplementation increased zinc concentration in the prostatic fraction of the ejaculate. A promising perspective may be opened in the treatment and prevention of canine of prostatic diseases by diet zinc supplementation.

Key Words: Zinc, Diet, Dog, Prostate, Ejaculate

Fecha de recepción: 26/02/09

Fecha de aprobación: 06/04/09

Dirección para correspondencia: Yanina Corrada. Laboratorio de Nutrición Mineral y Fisiología Reproductiva, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.
E-mail: ycorrada@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los oligoelementos, dentro de los cuales se incluye al zinc, son un grupo de sustancias que se encuentran en el organismo en proporciones tan ínfimas como indispensables para la vida. No existe capacidad de síntesis de los oligoelementos, en los animales, por el cual deben ser ingeridas a través de la dieta (1). Del mismo modo, tampoco se dispone de capacidad de almacenamiento de estos oligoelementos, con lo cual deben ser absorbidos, principalmente en intestino delgado, de acuerdo a las necesidades (2; 3; 4; 5; 6). Si bien la Association of American Feed Control Officials (AAFCO) recomienda para alimento balanceado de caninos adultos un mínimo de 120 mg/kg materia seca (MS) de zinc, el rango indicado es hasta los 1000 mg/kg MS, valor por encima del cual aparece toxicidad (7). Las sales más comúnmente empleadas en suplementación animal son el óxido de zinc (ZnO) y en menor grado, el sulfato de zinc (ZnSO₄) de mayor biodisponibilidad (8). El zinc interviene en la división celular requerida para el crecimiento, la madurez sexual y la reproducción (9).

A nivel reproductivo este oligoelemento actúa en la estimulación de la motilidad de los espermatozoides y la constitución e inmunología del fluido protático en entidades infecciosas y neoplásicas (10; 11). Se ha localizado zinc en el nucléolo, cromatina nuclear y gránulos secretorios de células epiteliales prostáticas caninas (12). Asimismo, y según un estudio de Fair y Parrish, 1981 (13), la actividad bactericida de la secreción prostática se relacionaría con la cantidad de zinc, siendo esto demostrado por el aumento del factor prostático antibacteriano (prostatic antibacterial factor, PAF) en prostatitis murinas. Contrariamente, se ha demostrado una disminución en los niveles de zinc prostáticos en humanos y perros con diagnóstico de prostatitis (14; 15; 16; 17). Se sugiere que la aplicación local de zinc en la próstata podría ser una opción terapéutica para la prostatitis bacteriana crónica (14). Bajo la hipótesis de que el incremento dietético del zinc podría reflejarse en sus concentraciones del líquido prostático, el objetivo del presente trabajo consistió en describir y comparar el efecto de dos concentraciones diferentes de óxido de zinc en la dieta sobre la fracción prostática del eyaculado canino.

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

El estudio fue realizado en una población de 8 caninos machos de razas Ovejero Alemán y Rottweiler de edades comprendidas entre los 2 y 5 años. Todos los animales, pertenecían a la División Perros del Servicio Penitenciario de Olmos y presentaban parámetros físicos, reproductivos

y seminales normales. Cuatro meses antes del inicio del experimento, y durante todo el estudio, los perros fueron alimentados con alimento balanceado V50®, Vital can Argentina que contiene 275 mg de zinc/ kg MS.

DISEÑO EXPERIMENTAL, TRATAMIENTOS Y ANÁLISIS DE ZINC

Durante dos meses previos al inicio del estudio, se entrenaron los caninos a la toma de muestra seminal por manipulación manual. La totalidad del experimento tuvo una duración de seis meses, el que se dividió en tres periodos de dos meses cada uno [Pretamiento (PRT), Postratamiento 1 (POST1) y Postratamiento 2 (POST2)].

Al final del primer periodo (PRT) en el cual los animales no recibieron suplementación alguna, los animales se distribuyeron aleatoriamente a los siguientes grupos:

*Grupo Zinc (n=4): suplementación de 525 mg de óxido zinc en cápsulas en la ración diaria

*Grupo Control (n=4): no recibió suplementación de zinc

Durante los 3 periodos y con intervalos de 15 días se realizó la determinación de zinc en fluido prostático. Para este propósito, se recolectó la tercer fracción de eyaculado (fracción prostática). Posteriormente se centrifugó durante 5 minutos a 2400 rpm y se tomó una alícuota del centrifugado, se desproteinizó agregando igual cantidad de ácido tricloroacético al 10 % (peso/volumen). La muestra se centrifugó nuevamente a 4000 rpm durante 10 minutos, se colectó el sobrenadante y sobre él se midió la concentración de zinc (18). El zinc fue determinado por espectrofotometría de absorción atómica (EAA), con un equipo (modelo GBC 902, Australia) con llama de aire y acetileno, tipo oxidativa a 219.3 nm de longitud de onda. Se preparó una curva de calibración de tres puntos (50, 100 y 200 µg/dl), empleando una mezcla de agua desionizada y ácido tricloroacético al 10 % en partes iguales como blanco y diluyente de los estándares.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó ANOVA de mediciones repetidas entre el grupo control y grupo zinc para comparar las concentraciones de zinc en fracción prostática. (SPSS 15.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA).

RESULTADOS

Dos de los perros pertenecientes al Grupo Control no lograron eyacular en ninguna de las extracciones. Las concentraciones de zinc en la fracción prostática del Grupo Control y del Grupo Zinc no presentaron diferencias antes de comen-

zar el experimento ($p = 0.65$). Durante POST1 y POST2 las concentraciones de zinc fueron mayores en el grupo zinc respecto del Grupo Control ($p < 0.01$ y $p 0.05$, respectivamente). Cuando se compararon los 3 periodos del Grupo Zinc (PRT, POST1 Y POST2) entre sí, se observó un incremento a través de los 3 periodos ($p < 0.01$). También se encontraron diferencias entre los periodos PRT vs. POST1 ($p < 0.01$), POST1 vs. POST2 ($p < 0.05$) y PRT y POST2 ($p < 0.05$; Fig. 1).

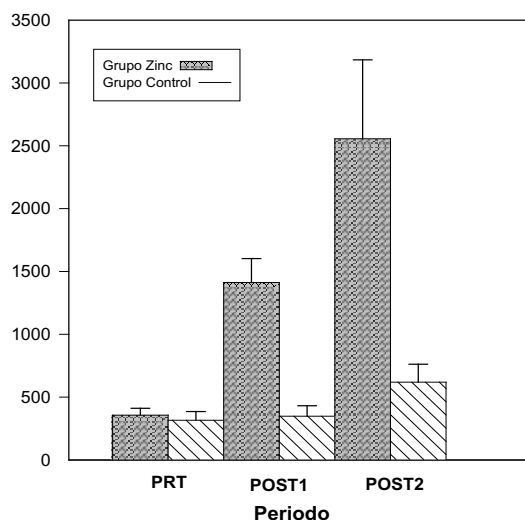


Fig.1. Concentración de zinc en fluido prostático ($\mu\text{g}/\text{dl}$) a través de los periodos PRT, POST1 y POST2 del grupo zinc y del grupo control.

Fig.1 Zinc concentration in prostatic fluid (mg/dl) through PRT, POST1 and POST2 periods of zinc and control group.

DISCUSIÓN

La próstata es la única glándula sexual accesoria de los caninos machos y suele ser frecuente asiento de patologías, principalmente en animales de edad avanzada y de raza grande. En el perro la glándula aumenta de tamaño (hiperplasia prostática benigna) con los años por efecto de las hormonas sexuales masculinas. La próstata hiperplásica puede dar lugar a complicaciones asociadas tales como quistes o infecciones diversas (19).

En el presente estudio, los resultados obtenidos indican que la suplementación oral (dietética) con óxido de zinc eleva la concentración de este oligoelemento en la fracción prostática del eyaculado canino. En el trabajo de Cho y col 2002 (14), se sugiere que la aplicación local de zinc en la glándula prostática coadyuva en el tratamiento de la prostatitis bacteriana crónica. Del mismo modo, el zinc desempeña un rol importante en la resistencia a la infección del tracto urinario masculino (13). La determinación de este oligoelemento podría utilizarse para el diagnóstico de pacientes con prostatitis bacteriana crónica o de

aquellos susceptibles de sufrir esta afección (13). Por ello, y en función de los resultados obtenidos, se aprecia que la suplementación dietética con óxido de zinc, resulta una vía adecuada para elevar las concentraciones locales de este oligoelemento en la glándula canina. Se requieren, sin embargo, realizar nuevos estudios en animales sanos y con afecciones de la próstata, para evaluar el impacto de la suplementación dietética con zinc en la prevención y tratamiento de las afecciones prostáticas en esta especie.

Se abre así un panorama alentador en el tratamiento y prevención de las afecciones de la próstata canina basada en la terapéutica dietética con óxido de zinc como adyuvante de la terapia tradicional que permitirá a los profesionales un mejor manejo de estas frecuentes entidades patológicas.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Empresa Vital Can Argentina, por el apoyo económico para llevar adelante dicho estudio y al Med Vet Mario Spicoli y a la División Perros del Servicio Penitenciario de Olmos.

BIBLIOGRAFÍA

- Villa Elizaga I, Navarro Blasco I, Martín Pérez A. Elementos Traza. En: Hernández M. y Sastre A. (eds.). Tratado de Nutrición. Ed. Díaz de Santos, S.A. Madrid (España), 1999; p.229-247.
- Hampton DL, Miller WJ, Neathery MW, Kincaid RL, Blackmon DM, Gentry RP. Absorption of zinc from small and large intestine of calves. *J Dairy Sci* 1976; 59(11):1963-1966.
- Neathery MW, Miller WP, Blackmon DM, Gentry RP, Jones JB. Absorption and tissue zinc content in lactating dairy cows as affected by low dietary zinc. *J Anim Sci* 1973; 37(3):848-852.
- Stake PE, Miller WJ, Neathery MW, Gentry RP. Zinc-65 absorption and tissue distribution in two- and six-month-old holstein calves and lactating cows. *J Dairy Sci* 1975; 58(1):78-81.
- Miller WJ, Blackmon DM, Gentry RP, Pate FM. Zinc absorption, metabolism, and endogenous excretion in zinc-deficient and normal calves over an extended time. *J Dairy Sci* 1991; 74(10):3535-3543.
- Spears JW. Trace mineral bioavailability in ruminants. *J Nutr.* 2003; 133(5 Suppl 1):1506S-1509S.
- Association of American Feed Control Officials. AAFCO Official Publication 1999; pp.143
- Wedeking KJ, Baker DH. Zinc bioavailability of feed grade sources of zinc. *J Anim Sci* 1990; 68, 684-689.
- Madding CI, Jacob M, Ramsay VP, Sokol RZ. Serum and semen zinc levels in normozoospermic and oligozoospermic men. *Ann Nutr Metab* 1986; 30(4):213-218.
- Elzanaty S, Malm J, Giwercman A. Viscosity of

seminal fluid in relation to the epididymal and accessory sex gland function and its impact on sperm motility. *Int J Andrology* 2004; 27(2):94-96.

11. Gomez Y, Arocha F, Espinoza F. Niveles de zinc en líquido prostático de pacientes con patologías de próstata. *Invest. Clín* 2007; 48 (3): 287-294.

12. Chandler JA, Sinowatz F, Timms BG, Pierreponit CG. The subcellular distribution of zinc in dog prostate studied by x-ray microanalysis. *Cell Tissue Res* 1977;185(1):89-103.

13. Fair WR, Parrish RF. Antibacterial substances in prostatic fluid. *Prog. Clin. Biol. Res* 1981; 75 A: 247-264.

14. Cho Y, Lee S, Lee J, Kim S, Kim J, Lee W, Yoon M. Changes in serum and prostatic zinc concentrations in rats after intraprostatic injection of zinc: comparison of two forms of zinc delivery. *Int J Urol* 2002; 9(12):681-687.

15. Thorburn-Wright E, Chmiel JS, Grayhack JT, Schaeffer AJ. Prostatic fluid inflammation in prostatitis. *Int J Urol* 1994; 152:2300-2303.

16. Bataineh Z. Zinc in normal and pathological human prostate gland. *Saudi Med J* 2002; 23(2):218-220.

17. Youmans G, Lyman R. The bactericidal action of prostatic fluid in dogs. *J Infec Dis* 1998; 62:117-121.

18. Ramirez, CE, Mattioli, GA, Giuliadori MJ, Yano H y Matsui I. Deficiencia de Zn en Bovinos de Cria de la Provincia de Buenos Aires. *Vet Arg* 1998; 15(142): 114-118.

19. Smith J. Canine prostatic disease: a review of anatomy, pathology, diagnosis, and treatment. *The-riogenology* 2008; 70(3):375-383.

BROTE DE DERMATOFILOSIS EN TERNEROS

Cattáneo M^{1,3}, Bermúdez J^{1,3}, Apolo A², Bermúdez I¹, Heras G³,
Velazques C⁴, Juambeltz R⁴, Assis R⁵

¹ Área de Bacteriología. Departamento de Microbiología.

² Área de Micología. Departamento de Microbiología. Facultad de Veterinaria.
Universidad de la República. Uruguay

³ Laboratorio Santa Elena S.A. Uruguay ⁴ Ejercicio Liberal.

⁵ Laboratorio Nacional Agropecuario. LANAGRO/MG. Brasil

Resumen: La Dermatitis es una enfermedad aguda o crónica de la epidermis, caracterizada por lesiones inflamatorias, exudativas, sangrantes con formación de costras, causada por una bacteria, *Dermatophilus congolensis*. Afecta a bovinos, ovinos, equinos, caprinos, animales salvajes y al hombre considerándose una zoonosis menor. El presente trabajo comunica un brote causado por *Dermatophilus congolensis* en terneros de tambo. Los animales afectados presentaban lesiones en piel, no pruriginosas, estas eran al comienzo sangrantes y dolorosas, terminando en costras las cuales se desprendían junto a los pelos quedando una superficie lisa alopecica. Las lesiones comenzaron en la cara y continuaron por el lomo y miembros posteriores. Se remitieron al laboratorio costras y exudados. Las muestras se procesaron para diagnóstico de dermatofitos y dermatofilia. Los resultados dieron negativos para dermatofitos y positivos para *Dermatophilus congolensis*. En base a la sintomatología clínica y a los hallazgos de laboratorio se llegó al diagnóstico de *Dermatophilus congolensis*.

Palabras claves: Dermatitis, bovinos, síntomas clínicos, diagnóstico, tratamiento.

OUTBREAK OF DERMATOFILOSIS IN CALVES

Abstract: Dermatitis is an acute or chronic epidermal disease, characterized by inflammation, exudation, bleeding injuries with scab formation, caused by a bacterium: *Dermatophilus congolensis*. The disease it causes is consider a minor zoonosis which affects bovines, ovines, equines, goats, wild animals and human beings. This work informs a bud, in a bull calves inn, caused by *Dermatophilus congolensis*. The affected animals displayed skin non itching injuries which were firstly bleeding and painful, and then scabby, the scabs were given off with hairs to render alopecia. The injuries began in the face and continued in the back and limbs. Scabs and exudates were sent to the laboratory. The samples were processed for diagnosis of dermatophytes and dermatophylosis. The results were negative for dermatophytes and positive for *Dermatophilus congolensis*. On the basis of the clinical sintomatology and the laboratory findings the diagnosis of *Dermatophilus congolensis* came up.

Key word: Dermatitis, cattle, clinical symptoms, diagnosis, treatment.

Fecha de recepción: 08/09/08

Fecha de aprobación: 30/09/08

Dirección para correspondencia: Milton Cattáneo. Alberto Lasplaces 1550. Departamento de Microbiología. Facultad de Veterinaria. Montevideo. Uruguay. CP: 11.600.

E-mail: catta1973uy@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

La Dermatofilosis es una enfermedad aguda o crónica de la epidermis, caracterizada por lesiones inflamatorias, exudativas, sangrantes con formación de costras, causada por una bacteria, *Dermatophilus congolensis* (1,2). Afecta a bovinos, ovinos, equinos, caprinos, animales salvajes y al hombre considerándose una zoonosis menor. Se presenta en bovinos de todas las edades siendo la lesión costrosa la más comúnmente observada y localizada preferentemente en las regiones cefálica, lumbar, caudal, cuartos posteriores y escroto (1,9). En ovinos afecta las partes cubiertas de lanas como son la zona lumbar, cervical y flancos denominada *Lumpy Wool*, lesiones en la cabeza principalmente orejas y comisuras de labios. En los carneros se presenta en la zona del escroto y en las extremidades desde la corona hasta la región tarsiana o carpiana denominada *Strawberry Foot Rot*.^{1,3} En equinos produce lesiones costrosas, exudativas, no pruriginosa localizándose más comúnmente en grupa y nalgas. Como factor predisponente se encuentra la alta humedad, teniendo esta enfermedad una mayor incidencia durante estaciones húmedas.^{1,4,5} En Uruguay en el año 1983 se describen cuadros con lesiones cutáneas por este agente en bovinos, ovinos, y equinos. En el año 1992 se reportan casos de dermatitis escrotal y *Strawberry Foot Rot* en carneros. En 1994 se comunica el primer hallazgo de dermatitis escrotal en toros. En el año 1995 se realiza la reproducción experimental de dermatitis escrotal en toros a *D. congolensis* (2, 6, 7, 8). En el año 2005 Cattáneo y col. describen un caso de dermatofilosis en bovinos de carne ocurrido en el departamento de Treinta y Tres (10).

El presente trabajo comunica un brote, en terneros de tambo, causado por *D. congolensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

HISTORIA CLÍNICA

El motivo de consulta de los profesionales veterinarios fue que tenían varios terneros de tambo, raza Holando, con lesiones en piel y querían tener un diagnóstico de la causa debido a que estaban alimentando a esos animales con una ración elaborada por ellos. Se concurrió a los establecimientos problemas que se encontraban en los departamentos de San José y Florida, en el mes de marzo de este año. Los animales enfermos tenían entre 5 días y 2 meses de edad, estaban criados a estaca y a corral. Los animales presentaban lesiones en piel, no pruriginosas, estas eran al comienzo sangrantes y dolorosas, terminando en costras las cuales se desprendían junto a los pelos quedando una superficie lisa alopécica. Las lesiones comenzaron en la cara y continuaron por el lomo y miembros posteriores. Los más afectados presentaron fiebre, decaimiento,

insuficiencias respiratorias y muerte. La morbilidad varió de un 10 al 40 % y la mortalidad del 2 %. Los animales tenían una evolución promedio de 2 meses. Un dato importante es que en el mes de marzo hubieron abundantes lluvias (140 mm) en esa zona. Colegas de Salto y Colonia también nos comunicaron que tuvieron animales con las mismas lesiones durante esos meses. Se extrajeron costras y exudados con hisopo en medio de transporte Stuart y enviadas, a temperatura ambiente, para su procesamiento en el laboratorio.

DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO

Las muestras se procesaron para diagnóstico de dermatofitos y dermatofilosis. Para descartar dermatofitos el material remitido se sembró en medio Sabouraud y se mezcló con partes iguales de KOH al 10 % y tinta Parker, observándose luego al microscopio óptico. Para dermatofilosis las costras se ablandaron en agua destilada estéril, se fijaron y se tiñeron por la técnica de Gram y Giemsa. A partir de este material se sembraron placas de agar sangre en forma aeróbica y en microaerofilia (11).

RESULTADOS

Los resultados dieron negativos para dermatofitos. En los frotis coloreados por Gram y Giemsa se observó gran cantidad de cocos y filamentos Gram positivos, ramificados, con el aspecto característicos a *Dermatophilus congolensis*. En las placas se identificaron colonias de color amarillo, rugosas y con un halo de beta hemólisis.

DISCUSIÓN

En base a la sintomatología clínica, lesiones y a los hallazgos de laboratorio se llegó al diagnóstico de *Dermatophilus congolensis*.

Las lesiones que presentaron los animales corroboran con las descritas por los autores citados. El brote se presentó en una época en la cual la zona estaba afectada por abundantes precipitaciones, el cual es el factor predisponente más importante para la ocurrencia de la enfermedad (1, 4, 5, 6, 7). El tipo de lesión que presentaban los terneros era distinta a la encontrada en la dermatitis escrotal en toros descrito por Hirigoyen en el año 1994 (7) y en el caso de los novillos de carne descrita por Cattáneo en el año 2005 (10), lo cual nos hizo dudar al principio de la etiología de este caso. En esta oportunidad, y que no ocurrió en los casos descritos en la bibliografía, el brote afectó a un número mayor de animales y de establecimientos, encontrándose animales con sintomatología grave que los afectó en forma sistémica con complicaciones secundarias lo que determinó la muerte de algunos de ellos. El trata-

miento recomendado fue administrar antibióticos por vía sistémica (oxitetraciclina larga acción 5 mg / kg pv/ semana / 4 semanas a los animales más afectados) y baños con sulfato de Zinc al 10 % por asperción. Otras medidas fueron el de retirar a los animales a zonas secas, separar sanos de enfermos y eliminar las camas de los animales afectados. El tratamiento, las medidas de manejo y la disminución de las precipitaciones lograron controlar la enfermedad y evitar la muerte de más animales.

BIBLIOGRAFÍA

1. Stewart GH. Dermatophilosis: A skin Disease of Animal and Man. Part. 1. Vet. Rec. 1972; 91: 537-544.
2. Hirigoyen D, Bermúdez J. Dermatofilia: Aislamiento del agente de lesiones de Strawberry Foot Rot y Dermatitis de escroto en carneros. V Congreso Nacional de Veterinaria. Noviembre. 1992. Montevideo. Uruguay.
3. Kruze J. Infección por *Dermatophilus congolensis* en carneros Corriedale en el Sur de Chile. 8° Congreso Latinoamericano de Microbiología. 1979. Valparaíso. Chile.
4. Bida SA, Dennis SM. Dermatophilosis in Northern Nigeria. Vet. Bull. 46 (7): 471-478.
5. Roberts DS, Graham NP. Control of ovine cutaneous actinomycosis. Aust.Vet. J. 1966; 42: 74-78.
6. Herrera de Rivas B, Franchi M, Rivas L. Dermatofilia: Aislamiento del agente causal de lesiones cutáneas de bovinos, ovinos y equinos. Reproducción experimental. III Congreso Nacional de Veterinaria. Noviembre. 1983. Montevideo. Uruguay.
7. Hirigoyen D, Rimbaud E, Lorenzo P. Primera descripción en Uruguay de dermatitis escrotal en toros a *Dermatophylus congolensis*. Jornadas de Reproducción y Biotecnología de la Reproducción. 1994. Atlántida. Uruguay.
8. Rimbaud E, Ehordoy D, Cattáneo M. Reproducción experimental de dermatitis escrotal en toros por *Dermatophylus congolensis*. XV Congreso Panamericano de Veterinaria. 1996. Campo Grande. Mato Grosso do Sul. Brasil
9. Acha P, Szyfres B. Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales. Tercera edición. Volumen I. Bacteriosis y micosis. 2001; p. 90-93
10. Cattáneo M, Apolo A, Bermúdez J. Dermatofilia en bovinos. Revista Argentina de Zoonosis. Volumen II. Número 3. 2005; p. 122-125.
11. Carter RC. Procedimientos de diagnóstico en Bacteriología y Micología Veterinarias. Editorial ACRIBA. 1986; p. 193-195.

ENFERMEDADES ESOFÁGICAS EN CANINOS. HALLAZGOS ENDOSCÓPICOS EN 80 CASOS

Aprea AN¹, Giordano AL¹, Bonzo E²

¹Servicio de Endoscopia, ²Epidemiología Básica
Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

Resumen: En este trabajo se describen los hallazgos endoscópicos de esófago en caninos atendidos en el Servicio de Endoscopia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata durante el período 2002-2007. Se realizó un estudio retrospectivo sobre 343 fichas. Las alteraciones esofágicas se clasificaron en: cuerpos extraños, esofagitis, divertículos, estenosis, fistulas, hallazgos compatibles con megaesófago, intususcepción gastroesofágica. En el período analizado, 43% de las endoscopias realizadas correspondieron a digestivas altas (esófago-gastro duodenoscopia). En el 54% de estas se observaron alteraciones esofágicas, que correspondieron en 39% a esofagitis, en 30% a cuerpos extraños, en 14% a estenosis, en 14% a hallazgos compatibles con megaesófago, y en 3% de los casos a hallazgos como divertículos, fistulas, intususcepción y nódulos. La indicación temprana de la esogagoscopia ahorraría tratamientos, evitando sufrimiento del paciente y gastos innecesarios.

Palabras claves: caninos – esofagoscopia – enfermedad esofágica.

CANINE ESOPHAGICAL DISEASES. ENDOSCOPIC FINDINGS IN 80 CASES

Abstract: This paper describes the endoscopic findings of esophagus in dogs treated at the Endoscopy Service of the Faculty of Veterinary Sciences, La Plata National University during the period 2002-2007. We performed a retrospective study on 343 sheets of treated canines. Esophageal alterations were classified into the following groups: foreign bodies, esophagitis, esophageal diverticula, esophageal stricture, esophageal fistula, megaesophagus, gastroesophageal intussusception. In that period 43% of endoscopies performed were upper gastrointestinal (esophago-gastro-duodenoscopy). In 54% of them, were observed esophageal disorders, which corresponded in 39% to esophagitis, 30% to foreign bodies, in 14% esophageal stricture, in 14% of findings consistent with megaesophagus, and 3% of cases, findings as esophageal diverticula, esophageal fistula, intussusception, and nodules.

Key words: canine – esophagoscopy – esophageal diseases

Fecha de recepción: 04/03/09

Fecha de aprobación: 25/06/09

Dirección para correspondencia: Adriana N. Aprea, Servicio de endoscopia. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

E-mail: endoscopia@fcv.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los problemas digestivos son uno de los motivos de consulta más frecuentes en clínica de pequeños animales. Las esofagopatías representan una importante proporción de los mismos. La esofagoscopia está indicada para la evaluación de animales con signos de enfermedad esofágica, incluyendo regurgitación, disfagia, odinofagia y salivación excesiva (1, 2, 3). Esta técnica permite el examen visual de la mucosa y el lumen y permite la obtención de muestras para biopsia, citología y cultivo (3, 4, 5). Es el método más efectivo para obtener diagnóstico definitivo de enfermedades de la mucosa o de anomalías en la luz como por ejemplo la presencia de cuerpos extraños, esofagitis, estenosis esofágica, neoplasias, divertículos, anillos vasculares e intususcepción gastroesofágica (2, 4, 5). Comparado con los estudios radiográficos de contraste, la esofagoscopia es menos efectiva para el diagnóstico de megaesófago y otros trastornos de la motilidad, hernia de hiato, compresión extrínseca y acalasia cricofaríngea, aunque aporta información valiosa en estos casos (1, 6). Se puede utilizar como herramienta terapéutica para dilatar estenosis, extraer cuerpos extraños, colocar tubos para alimentación esofágica y ablación de tejidos neoplásicos (2, 4, 5).

El objetivo de este trabajo es describir los hallazgos endoscópicos de esófago en caninos atendidos en el Servicio de Endoscopia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata durante el período 2002-2007. Realizar un estudio transversal con el fin de evaluar la prevalencia del evento "presencia de cuerpos extraños en esófago" y la signología presentada.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo sobre 343 fichas de caninos atendidos en el citado servicio durante los años 2002-2007. Se seleccionaron todas las endoscopias digestivas altas realizadas. Dentro de este grupo se analizaron los casos que presentaron anomalías esofágicas. Se tuvieron en cuenta los datos relacionados con sexo, raza, síntomas, tiempo transcurrido desde la aparición de los signos hasta la realización de la endoscopia, la existencia de tratamientos previos y los hallazgos endoscópicos. Los estudios se realizaron con anestesia general inhalatoria. Se utilizó un colonofibroscopio Olympus® CF-EL de 13 mm de diámetro externo y 1,68 m de largo o un fibrogastroscopio pediátrico GIF/30 de 5 mm de diámetro externo y 1,0 m de largo dependiendo del tamaño del animal. Para la recolección de la información se utilizaron fichas donde se volcaban los datos referidos al dueño del paciente y propios del canino (raza, edad, signos). Los datos fueron analizados con EpiInfo versión

3.3.2 Las alteraciones esofágicas se clasificaron en los siguientes grupos: cuerpos extraños, esofagitis, divertículos, estenosis, fistulas, hallazgos compatibles con megaesófago, intususcepción gastroesofágica, y se calcularon las respectivas frecuencias. Para evaluar diferencias entre hallazgos según sexo o edad, se utilizaron las pruebas de chi cuadrado y Test exacto de Fisher, considerando existencia de significación estadística cuando se obtuvieron valores de $p < 0.05$.

RESULTADOS

El 43 % (149/343), de las endoscopias realizadas en ese período, correspondieron a digestivas altas (esofago-gastro duodenoscopia). En el 54 % (80/149) de estas se observaron alteraciones esofágicas, que correspondieron en 39 % (31/80) a esofagitis (Fig. 1), en 30 % (24/80) a cuerpos extraños (Fig. 2), en 14 % (11/80) a estenosis (Fig. 3), en 14 % (11/80) a hallazgos compatibles con megaesófago, y en 3 % de los casos a hallazgos como divertículos, fistulas (Fig.4), intususcepción (Fig. 5) y nódulos. El tiempo de evolución desde el inicio de los síntomas hasta la endoscopia varió desde 1 día a 1 año. Se había realizado tratamiento previo en el 16 % de los casos. Los signos más frecuentemente observados fueron vómitos en 42 % de los casos, regurgitación en 9 % de los casos, y disfagia en 6 %. Con respecto al hallazgo de cuerpos extraños, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la frecuencia de hallazgos en caninos menores de 1 año (33 %, 8/24) y caninos mayores de 1 año (66 %, 16/24). No se observaron diferencias significativas ($p > 0.05$) con respecto a la presencia de cuerpos extraños en machos o hembras. Los cuerpos extraños correspondieron en 62,5 % (15/24) de los casos a huesos, y en 37,5 % (9/24) a objetos como hilos de coser, restos de toalla, anzuelos. En el caso de los cuerpos extraños, el tiempo de evolución hasta la realización de la endoscopia varió entre 3 días y dos semanas.



Fig.1. Esofagitis en canino

Fig.1. Canine esophagitis

En 61 % de los casos donde se observaron cuerpos extraños, se pudo realizar la extracción exitosa del mismo por vía endoscópica con asas de polipectomía, canastilla de dormia y/o pinza cocodrilo. En 17 % se empujó el cuerpo extraño a estómago y en 22 % se debió realizar la derivación a cirugía.

Se concluye que el 54 % de las endoscopias digestivas altas realizadas en caninos presentaron lesiones en esófago, muchas de las cuales no hubieran sido diagnosticadas sin el uso de este método diagnóstico. La indicación temprana, ante la sospecha de algunas de estas afecciones, ahorraría tratamientos, evitando sufrimiento del paciente y gastos innecesarios.

AGRADECIMIENTOS

Programa de Incentivos de la UNLP V/164.



Fig.2 .Cuerpo extraño esofágico
Fig.2. Esophageal foreign body



Fig.3. Estenosis esofágica en canino
Fig.3. Canine esophageal stricture

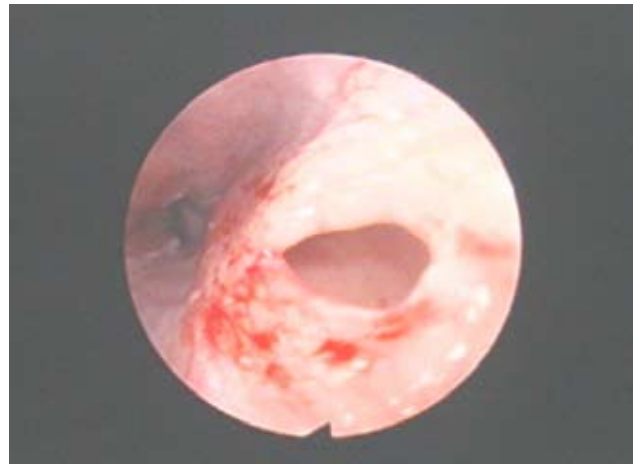


Fig.4. Fistula esofágica
Fig.4. Esophageal fistula



Fig.5. Intususcepción gastroesofágica
Fig 5. Gastroesophageal intussusception

BIBLIOGRAFÍA

1. Willard, M. Enfermedades de la cavidad oral, faringe y esófago. En: Nelson R; Couto G.(ed) Medicina Interna de Animales Pequeños. Ed. Inter-Médica, Buenos Aires (Argentina), 2005; p 431-444
2. Gualtieri M: Esophagoscopy. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2001; Vol 31 N° 4: p 605-629.
3. Tams T. Diseases of the Esophagus. En: Tams T. (ed) Handbook of Small Animal Gastroenterology. W.B Saunders Company Philadelphia (United States of America), 1996; p 163-216.
4. Sherding R, Johnson S, Tams T. Esophagoscopy. En: Tams T. (ed): Small Animal Endoscopy. Ed. Mosby. St. Louis, Missouri (United States of America), 1999; p 39-96.
5. Lecoindre P. Endoscopie de l'oesophage-Oesophagoscopy. En: LecondrieT. (ed) Atlas d'Endoscopie chez les carnivores domestiques. MED'COM éditions, Paris (France), 2001;p 11-38.
6. Guilford W, Strombeck D. Diseases of Swallowing. En: Guilford W, Strombeck D (ed) Strombeck's Small Animal Gastroenterology. Ed. WB Saunders. Philadelphia (United States of America), 1996, p 211-238.

FUNCIONES DEL GEN RELACIONADO A LA LATENCIA (GEN LR) DEL HERPES VIRUS BOVINO TIPO 1 (BoHV-1) Y OTRAS PROTEÍNAS EXPRESADAS DURANTE LA LATENCIA

Pérez SE

Investigadora de CONICET
Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva (SAMP),
Área de Virología. Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional del Centro de la Pcia de Buenos Aires, Argentina.

Resumen: *El herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1) causa diversos síndromes clínicos en el ganado. Al igual que otros alfa-herpesvirus, el ciclo de vida del BoHV-1 puede dividirse en tres etapas: infección aguda, latencia y reactivación. Durante la infección aguda, BoHV-1 expresa una cascada de genes altamente regulados. Sin embargo, durante la latencia, la expresión de genes virales se ve restringida al gen relacionado a la latencia (gen LR) y al ORF-E. El gen LR es poliadenilado y sufre empalmes alternativos, por lo cual puede dar origen a una familia de proteínas. En esta revisión se analizan las propiedades del gen LR en relación a la inhibición de los genes virales inmediatamente-tempranos, el ciclo celular, la respuesta a interferón, la apoptosis, la infiltración de células mononucleares en ganglio trigémino, la interacción con C/EBP- α y la latencia viral en tejido linfóide. Se describen brevemente los hallazgos recientes sobre ORF-E.*

Palabras claves: gen LR, latencia, reactivación, herpesvirus, ORF-E.

FUNCTIONS OF THE LATENCY-RELATED GENE (LR GENE) OF BOVINE HERPESVIRUS TYPE 1 (BoHV-1) AND OTHER PROTEINS EXPRESSED DURING LATENCY

Abstract: *Bovine herpesvirus type 1 (BoHV-1) causes several clinical syndromes in cattle. Like other alpha-herpesviruses, the life cycle of BoHV-1 can be divided in three stages: acute infection, latency and reactivation. During acute infection, BoHV-1 expresses a highly regulated cascade of genes. However, during latency, the expression of viral genes is restricted to the latency-related gene (LR gene) and ORF-E. The LR gene is polyadenylated and undergoes alternative splicing, giving rise to a family of proteins. In this review, the properties of the LR gene are analyzed in relation to the inhibition of viral immediate-early genes, the cell cycle, interferon response, apoptosis, infiltration of mononuclear cells in trigeminal ganglion, interaction with C/EBP- α and latency in lymphoid tissue. Briefly, the most recent findings on ORF-E are described.*

Keywords: LR gene, latency, reactivation, herpesvirus, ORF-E.

Fecha de recepción: 27/02/09

Fecha de aprobación: 06/03/09

Dirección para correspondencia: Sandra E. Pérez, Pinto 399. Tandil (7000) Buenos Aires (Argentina)

Te: + 54 2293 441912

E-mail: seperez@vet.unicen.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1), un miembro de la subfamilia *Alfa-herpesvirinae*, es responsable de una variedad de síndromes clínicos en el ganado, incluyendo desórdenes respiratorios, conjuntivitis, infecciones genitales, encefalitis, abortos y una enfermedad multisistémica fatal en terneros neonatos. La infección aguda del tracto respiratorio puede producir inmunosupresión, lo cual predispone al ganado a la colonización bacteriana secundaria, pudiendo ocasionar neumonía e incluso la muerte del animal (53).

Luego de la replicación inicial en las superficies mucosas, los alfa-herpesvirus establecen infecciones latentes, principalmente en las neuronas sensoriales de los ganglios trigéminos (GT) y sacro (51). Durante la latencia no se aísla virus infeccioso y no se detectan antígenos virales en las células infectadas (41). Los animales latentemente infectados pueden identificarse por la presencia de anticuerpos séricos específicos dirigidos contra el BoHV-1 (22). La reactivación del virus latente puede ocurrir como consecuencia de estrés natural o puede inducirse mediante la administración de glucocorticoides. Durante la reactivación espontánea o inducida, el virus es transportado nuevamente al sitio original de infección donde tiene lugar la replicación y el virus re-excretado se transmite a otros huéspedes susceptibles. La reactivación constituye el principal mecanismo de diseminación de la enfermedad en un rodeo. El estímulo antigénico causado por la reactivación del BoHV-1 produce un efecto "booster" en la respuesta inmunitaria que es detectable por la elevación en los títulos de anticuerpos (3).

INFECCIÓN AGUDA

El ciclo lítico de los alfa-herpesvirus ocurre en una cascada altamente regulada. Un componente del virión (bTIF), activa la expresión de los genes inmediatamente tempranos (IE), los cuales tienen un papel regulador sobre la activación de los genes tempranos (E) y tardíos (L). La replicación del ADN ocurre en el núcleo, luego de la expresión de los genes E (18). BoHV-1 posee cuatro proteínas IE que son homólogas a las proteínas codificadas por el herpes simplex virus tipo 1 (HSV-1). Las proteínas ICP0, ICP4, ICP27 e ICP22 del HSV-1 participan en el control de la expresión de los genes virales. ICP47 es un gen IE que interfiere con la presentación de antígenos en las células infectadas. BoHV-1 no codifica un homólogo de ICP47. Sin embargo, la inhibición de la presentación de antígenos por el CMH-1 depende de una pequeña proteína de membrana codificada por el gen UL49.5. ICP0 estimula la expresión de todos los genes virales y es necesario para que la infección lítica ocurra eficientemente, especial-

mente a bajas multiplicidades de infección (moi). ICP4 estimula la transcripción de los genes E y L y ICP27 regula el empalmado, la terminación y la exportación nuclear de los transcriptos virales e incrementa los niveles de traducción de los genes L. Ambos genes se requieren para la replicación eficiente en cultivos celulares (18). ICP22 es necesario para la replicación en ciertos tipos de células y reprime la expresión de ICP0 y ICP4 (4). A diferencia del ICP27 del HSV-1, el cual se expresa en forma inmediatamente temprana (IE), el gen homólogo en BoHV-1, bICP27, se expresa con una cinética temprana (E) (49). Al igual que ICP27, bICP27 probablemente esté involucrado en el procesamiento en 3' de los mRNA virales (49). Los genes E están involucrados en el metabolismo de los ácidos nucleicos, mientras que los genes L codifican las proteínas estructurales del virión (18).

LATENCIA Y REACTIVACIÓN

Se estima que aproximadamente entre un 10% y un 30% de las neuronas en el ganglio sensorial pueden alojar virus latente (52). Las infecciones con bajos títulos virales se correlacionan con GT que contiene un número reducido de neuronas latentemente infectadas, lo cual, a su vez, determina una menor probabilidad de reactivación viral. La replicación viral no es compatible con la sobrevivencia de la célula, por lo tanto, la reactivación solo ocurre en unas pocas neuronas por episodio a fin de mantener un pool de neuronas latentemente infectadas (44). Por el contrario, un número elevado de copias virales incrementará las probabilidades de reactivación del estado latente debido a que los genes virales serán capaces de neutralizar efectivamente a los factores que silencian su transcripción y aumentará la disponibilidad de moldes para la transcripción en los eventos iniciales de la reactivación (43). En contraste a la abundante expresión de genes que ocurre durante la infección aguda, en las neuronas latentemente infectadas, la expresión de genes está restringida a una pequeña región del genoma del BoHV-1, el gen relacionado a la latencia (gen LR). Recientemente, se demostró que otra proteína, denominada ORF-E, también es detectable en las neuronas durante la infección latente (15).

El virus latente puede reactivarse exitosamente mediante el tratamiento de los animales con glucocorticoides sintéticos como la dexametasona (DEX) (29). Sin embargo, los mecanismos que regulan la reactivación viral son aún desconocidos y el papel de los genes IE en el proceso de reactivación no está claro. Factores no virales, como el ambiente neuronal y el sistema inmunitario también estarían involucrados en el inicio y la regulación de la reactivación. Debido a que la reactivación viral es el mecanismo más

importante para la diseminación del BoHV-1 en los rodeos, es esencial determinar los factores y los genes virales y/o celulares que están involucrados en el inicio de estos episodios.

EL GEN LR DEL BoHV-1

El gen LR se localiza en la región larga y única del genoma viral, adyacente a las inversiones repetidas. Se superpone con la unidad de transcripción inmediatamente temprana 1 (IETu1) (20) y es anti-sentido al gen bICP0. El gen LR del BoHV-1 es homólogo al gen asociado a la latencia (LAT) del HSV-1. A diferencia del LAT, el cual aparentemente no codifica una proteína, el transcripto LR es poliadenilado y codifica una familia de proteínas. El gen LR tiene dos marcos de lectura abiertos (ORF), ORF-1 y ORF-2 y dos marcos de lectura (RF) sin un ATG iniciador, designados RF-B y el RF-C (18).

El promotor del gen LR contiene un dominio específico de unión a factores neuronales y tiene actividad transcripcional específica en las neuronas (1, 2) lo cual demuestra que la expresión génica es altamente dependiente de los factores neuronales. Devireddy y Jones (6) demostraron que el empalme alternativo del gen LR puede dar origen a distintas proteínas. Los autores observaron que el empalmado del ARN del gen LR que ocurre a los 7 días post-infección (dpi) es diferente al empalmado que tiene lugar a los 15 y 60 dpi, sugiriendo que los distintos productos del gen LR tienen funciones diversas en los diferentes estadios de la infección. El empalmado alternativo a los días 1 y 60 post-infección es responsable de la generación de una proteína de fusión entre ORF-1 y RF-C. La fusión de ORF-2 con ORF-1 a los 7 dpi o con RF-B a los 15 dpi genera una proteína de 35 a 45 kDa, lo cual indica que existe la posibilidad de que una familia de proteínas se exprese en momentos específicos del ciclo infeccioso viral. Una proteína de 40 kDa codificada por el gen LR fue identificada durante la infección productiva tardía y también es detectable en un subgrupo de neuronas durante la latencia (16, 17). Inicialmente, a esta proteína se la designó como "proteína LR".

Recientemente, Meyer y col (27) demostraron mediante microscopía confocal que ORF-1 se expresa en el citoplasma y en el núcleo de células de riñón bovino infectadas, mientras que RF-C se expresa en el citoplasma celular. Estudios inmunohistoquímicos realizados sobre secciones de GT latentemente infectados con BoHV-1 demostraron que ORF-1 también se localiza en el núcleo y el citoplasma neuronal. A diferencia de la localización citoplasmática en las células infectadas en forma productiva, RF-C se localiza en el núcleo de las neuronas latentemente infectadas. Aunque RF-C carece de un codón de iniciación ATG, los marcos de lectura sin una metionina ini-

ciadora también pueden expresarse. Por ejemplo, los marcos de lectura crípticos, sin un ATG o AUG convencional, pueden usar codones alternativos (CUG) que se decodifican como leucina en lugar de metionina. Los mecanismos de iniciación que usan codones no-AUG se observan frecuentemente en la traducción de los transcriptos virales (47). También es posible que ocurra un pequeño empalme cercano al inicio de RF-C, el cual puede fusionar una ATG para iniciar la traducción de RF-C (17). Los estudios de Meyer y col (27) también sugirieron que ORF-1 probablemente no se exprese como una proteína intacta, sino como una proteína de fusión con ORF-2, como consecuencia del empalme alternativo del gen LR. En conclusión, estos hallazgos confirmaron que tanto *in vitro* como *in vivo*, el gen LR da origen a diferentes proteínas que podrían poseer funciones específicas en las distintas etapas del ciclo de latencia y reactivación viral.

FUNCIONES DEL LAT DEL HERPES SIMPLEX VIRUS-1

Dada la importancia del HSV-1 en los seres humanos, existen numerosos estudios sobre la regulación del ciclo de latencia y reactivación, los cuales están mayormente destinados a definir el rol del LAT en la patogenia de la infección. La principal diferencia entre el LAT y el gen LR se evidencia a nivel genético, dado que este último codifica una proteína, mientras que la forma más abundante del LAT es un intrón estable de 2 kb que se origina a partir de un transcripto de 8,3 kb y no existe una proteína que medie su función (8). La existencia de una familia de proteínas, también determina que el gen LR tenga funciones adicionales a las descritas para el LAT del HSV-1 (18). El LAT no es absolutamente requerido, aunque facilitaría el establecimiento de la latencia en los modelos de infección (ratón y conejo) normalmente usados a nivel experimental (39). Sin embargo, este gen tendría una función directa en el proceso de reactivación (21, 39). Las mutantes LAT⁻ generalmente presentan una inadecuada reactivación *in vivo* (21). Con frecuencia se observa un retraso significativo en la recuperación de virus infeccioso a partir de los GT infectados con mutantes LAT⁻, lo cual se correlacionaría con un establecimiento de latencia menos eficiente por parte de estas cepas, aunque se desconoce si ésta es la principal causa de la baja eficiencia o si existiría un efecto directo sobre el proceso de reactivación. La función del LAT del HSV-1 involucrada en la reactivación espontánea se localiza en las primeras 1,5 kb del transcripto, una región que no se superpone con los genes ICP0 o ICP34.5γ, lo cual sugiere que un mecanismo de regulación anti-sentido mediado por LAT no es responsable de la reactivación espontánea. El gen LR del BoHV-1 y el LAT del HSV-1 poseen activi-

dad anti-apoptótica y esta función desempeñaría un papel en el proceso de reactivación (18, 39). Durante la reactivación se observa una reducción en la expresión del LAT, lo cual demuestra que no se requiere la inhibición total de la expresión del gen para que la reactivación tenga lugar o que sólo sufren episodios de reactivación aquellas neuronas en las que el LAT es inhibido (50). Rock y col (41) observaron también una disminución en la transcripción del gen LR en las neuronas sensoriales del GT de conejos entre las 24 y las 48 horas luego de la administración de DEX. Sin embargo, esta disminución es transitoria y se detectan niveles de expresión normales a las 72 horas post-tratamiento. Esta disminución regulada del ARN del gen LR se correlacionó con la reactivación de la latencia. Por lo tanto, estos estudios sugieren que se requiere que el efecto inhibitorio del gen LR, probablemente ejercido sobre los genes virales de la infección aguda, sea reprimido para que los episodios de reactivación ocurran.

CEPA MUTANTE DEL GEN LR

Para estudiar las funciones del gen LR, Inman y col (14) construyeron una cepa mutante del gen LR. Esta cepa contiene 3 codones de terminación al inicio del extremo 5' del transcripto LR. La mutante expresa el transcripto pero no las proteínas codificadas por ORF-2 (17). La construcción de este tipo de mutantes mediante la inserción de un oligonucleótido conteniendo codones de terminación es necesaria para no afectar la expresión de bICP0, cuya secuencia se superpone en sentido contrario a la del gen LR. Los títulos infecciosos en células bovinas y en la cavidad nasal de los terneros infectados con la mutante LR son similares a los observados con la cepa salvaje de BoHV-1 (14). Sin embargo, los terneros infectados con la mutante LR presentan títulos virales más bajos en las secreciones oculares y exhiben síntomas clínicos menos severos que los terneros experimentalmente infectados con la cepa salvaje de BoHV-1. Además, se detectan niveles más bajos de virus infeccioso y de ADN en los GT de los terneros infectados con el virus mutante. Finalmente, la mutante LR no se reactiva *in vivo* cuando se administra DEX a los terneros latentemente infectados (23). Esta cepa mutante permitió identificar numerosas propiedades del gen LR, tanto *in vitro* como *in vivo*.

EL GEN LR Y LA INHIBICIÓN DE LOS GENES IE.

Los genes IE son necesarios para iniciar la infección productiva. Bratanich y col (1) demostraron mediante ensayos de transfección que el gen LR inhibe el potencial transactivador de bICP0 al interferir con su expresión. De este

modo, el gen LR interrumpiría la infección viral productiva y facilitaría el establecimiento de latencia. En los modelos murinos de latencia del HSV-1, las mutantes con supresiones del gen ICP0 tienen un patrón de reactivación ineficiente, lo cual sugiere que se requiere la actividad transactivadora de ICP0 para que ocurran los episodios de reactivación (21). La reducción transitoria que se observa en la expresión del gen LR en las primeras 24-48 horas post-reactivación (41) permitiría la expresión de bICP0 y facilitaría el inicio de los ciclos de infección productiva. Debido a que ICP0 es especialmente importante a bajas *moi*, su expresión sería esencial en los estadios iniciales de la reactivación (21), cuando se producen pequeñas cantidades de virus.

EL GEN LR Y EL CICLO CELULAR

La actividad de las quinasas dependientes de ciclinas (*cdk*) se basa en su asociación con las subunidades regulatorias de éstas últimas (32). Ambas moléculas actúan como reguladores positivos o aceleradores del ciclo celular. El ciclo de una célula somática se divide en cuatro etapas: la fase S o sintética, en la cual se genera una copia del material genético, la fase M o mitosis en la que los componentes celulares se dividen entre dos células hijas y las fases G1 y G2 que corresponden a los períodos en los que las células se preparan para las fases S y M, respectivamente. En los inicios de la fase G1 actúan las *cdk4* y *cdk6* junto con las ciclinas del tipo D, probablemente en respuesta a factores de crecimiento. Los complejos de *cdk2* con las ciclinas E y A son importantes para la transición de G1 a S y para la replicación del ADN, respectivamente. La acción conjunta de las ciclinas A y B con la quinasa *cdc2* es esencial para la fase M. El pasaje de las células de un estadio a otro del ciclo es estrictamente regulado a nivel de la transcripción de los genes de las ciclinas, la degradación de las mismas, la acción de inhibidores proteicos y la modificación de las subunidades de las quinasas mediante fosforilación (31).

La expresión de las *cdk* y las ciclinas en las neuronas promueve la replicación viral (45, 59) y las neuronas que expresan ciclinas durante la infección aguda y la reactivación están destinadas a la muerte celular (59). En los GT de terneros infectados con BoHV-1, Winkler y col (59) detectaron la expresión de ciclina D1, ciclina E y ciclina A a los 7 dpi. Las mismas ciclinas se detectaron en un pequeño porcentaje de neuronas durante la reactivación inducida con DEX. Aproximadamente un 50% de las neuronas que expresaban ciclinas también contenían ADN viral. En un modelo de infección experimental en conejo, Schang y col (46) demostraron que el BoHV-1 induce la expresión de ciclina A en GT durante la infección aguda y su expresión se prolonga cuando los co-

nejos latentemente infectados son tratados con DEX. La expresión de ciclina A podría facilitar la expresión de genes virales y la replicación durante el ciclo de vida lítico. Por el contrario, durante la latencia, la ciclina A se asocia con la proteína LR y esto promovería la sobrevivencia neuronal. La reactivación del HSV-1 inducida mediante el explante de tejido ocurre en aquellas neuronas que expresan exclusivamente cdk2 y cdk4. La roscovitina, un inhibidor de la actividad de la cdk2, inhibe la reactivación, lo cual demuestra que la actividad de cdk2 es esencial para la reactivación del HSV-1. Aunque se desconoce la función exacta de esta quinasa en la reactivación, se sugiere que induciría modificaciones en ICPO que activarían su función transactivadora o fosforilaría alguna proteína celular requerida para la reactivación (45). Jiang y col (16) demostraron que la proteína LR se asocia en forma estable con los complejos de cdk2-ciclina E en las células infectadas en forma productiva. Los complejos cdk2-ciclina E fosforilarían y activarían a los factores necesarios para estimular la replicación del ADN (12). Aunque se desconoce el papel exacto que desempeñaría la unión de la proteína LR con los complejos de cdk2-ciclina E, se presume que ésta promovería la sobrevivencia de las neuronas al bloquear los efectos de la activación de los factores del ciclo celular producidos como consecuencia de la replicación viral (16, 59). En conclusión, BoHV-1 es capaz de manipular el ciclo celular para obtener una máxima replicación y producción de viriones durante la infección aguda y la reactivación. Durante la latencia, el gen LR "inactivaría" la acción de los complejos cdk-ciclinas para favorecer el establecimiento de latencia.

EL GEN LR Y LA RESPUESTA A INTERFERÓN

Los interferones (IFN) son una familia de citoquinas multifuncionales que están involucradas en la defensa antiviral, la regulación del crecimiento celular y la activación de las células inmunitarias. Estas citoquinas son la primera línea de defensa contra las infecciones virales y se las implicó en la vigilancia inmunológica de las células malignas. Los IFN se clasifican en dos grupos principales: tipo I o IFN viral (principalmente IFN- α , - β , - ω , y - τ) y tipo II o IFN inmune (IFN- γ). Los IFN tipo I y tipo II no comparten una homología estructural obvia. El IFN tipo I se produce en respuesta directa a la infección viral; el IFN- α deriva principalmente de los leucocitos, mientras que los fibroblastos son la principal fuente de IFN- β , aunque también puede ser sintetizado por diferentes tipos celulares. El IFN tipo II es sintetizado primariamente por linfocitos T activados y por las células NK luego del reconocimiento de las células infectadas (11). Con respecto a los

bovinos, Capon y col (5) describieron una familia de genes de IFN- α (bIFN) semejante a la clase I de los IFN de los seres humanos IFN (HuIFN)- α , y una familia novedosa con características estructurales diferentes (clase II). Velan y col (56) también identificaron cinco genes del bIFN- α , que están estrechamente relacionados a nivel de su secuencia aminoacídica (93%). Cuatro de estos genes (A, B, C y D) codifican diferentes polipéptidos, mientras que se sugiere que el quinto (E) es una forma alélica del bIFN- α C. La homología de estos IFN- α con los subtipos de los IFN- α de los seres humanos y murinos es de aproximadamente un 60%. A diferencia de la mayoría de los mamíferos, en los que el IFN- β es codificado por un único gen, el IFN- β bovino consiste en una familia compleja de múltiples genes (57).

Recientemente, Peng y col (33), usaron una mutante del HSV-1 que no expresa el LAT y demostraron que esta región del genoma viral interfiere y retrasa la expresión de IFN *in vitro* y en los GT de ratones infectados en forma aguda.

Los codones de terminación en la cepa mutante LR impiden la expresión de productos proteicos, sin afectar la expresión del gen (14). En células bovinas infectadas, la mutante LR del BoHV-1 expresa prematuramente niveles de ARN más altos que el virus salvaje y estimula una respuesta a IFN más potente. El ARN del gen LR contiene regiones con la capacidad de formar estructuras de doble cadena, un estímulo potente para la inducción de IFN. También es probable que la hibridización del gen LR con bICPO origine la formación de dobles cadenas de ARN que induzcan esta potente respuesta a interferón. En las tonsilas de terneros infectados en forma aguda con la mutante LR se detectaron niveles elevados de IFN- α 1, IFN- β e IFN- γ . Por el contrario, no se detectó la expresión de ningún tipo de IFN en los GT de los animales infectados con el virus salvaje o la mutante LR en el mismo estadio del ciclo viral. Consecuentemente, el gen LR promovería las primeras fases del establecimiento de latencia a través de la inducción de una respuesta temprana a IFN durante la infección productiva (37), la cual, *in vivo*, es evidente a nivel de los tejidos periféricos.

EL GEN LR Y LA APOPTOSIS

La apoptosis es un proceso controlado de muerte celular que funciona en el desarrollo y la homeostasis de los organismos multicelulares a través de la remoción selectiva de las células dañadas o que no resultan necesarias. La apoptosis también puede actuar como una respuesta celular a la infección viral, la cual limita el tiempo y la maquinaria celular disponible para la replicación (55). Debido a que la muerte celular programada es un mecanismo de defensa contra la infección, evitar la apoptosis de la célula

huésped también representa una etapa esencial en el ciclo de vida de los virus. Por otro lado, los virus pueden tomar ventajas de la apoptosis para destruir a las células inmunitarias o para inducir la muerte de las células infectadas y favorecer así la diseminación viral. El HSV-1 tiene la capacidad de inducir e inhibir la apoptosis. Entre los genes con capacidad antiapoptótica se identificaron al ICP27, US3, US5, gJ, gD y LAT. Las propiedades antiapoptóticas de estos genes promoverían la sobrevivencia neuronal durante la infección aguda (10). Sin embargo, durante el establecimiento y mantenimiento de la latencia, la función de estos genes estaría silenciada, excepto por el gen LAT, el cual es abundantemente expresado en este estadio y cuya actividad anti-apoptótica resultaría esencial para mantener un pool de neuronas latentemente infectadas (18). La proteína p53 es una de las moléculas principales involucradas en la respuesta celular al estrés mediante la regulación de la apoptosis, el arresto del ciclo celular, la senescencia, el daño al ADN y la estabilidad genética (54). Al igual que el HSV-1, BoHV-1 induce apoptosis de las células de riñón bovino, en parte a través de la inducción de p53, lo cual facilitaría la liberación de los viriones durante la infección productiva (7). No obstante, durante la infección latente, el virus debe ser capaz de prevenir la apoptosis y este proceso ocurre a través de mecanismos que involucran al gen LR. Aunque se desconocen los mecanismos exactos por los cuales el gen LR inhibiría la apoptosis, recientemente se identificó la interacción de la proteína LR con dos proteínas pro-apoptóticas, Bid y Cdc42 (27). Henderson y col (13) también demostraron que durante la infección productiva, el gen LR inhibe la escisión de la caspasa 9 y de la caspasa 3, siendo esta última un efector crítico en las vías de señalización que conducen a la apoptosis celular.

Lovato y col (23), analizaron la frecuencia de apoptosis en el pico de la infección aguda y durante el establecimiento de la latencia en los GT de terneros infectados con la cepa mutante LR y con la cepa salvaje de BoHV-1 y demostraron que a los 14 dpi (establecimiento de la latencia) la mutante LR inducía niveles más altos de apoptosis, a pesar de que los GT contenían niveles más elevados de ADN del virus salvaje. A los 6 dpi, no se observaron diferencias significativas en el porcentaje de neuronas que presentaban tinción inmunohistoquímica positiva para caspasa 3 en los GT de animales infectados con la mutante LR o la cepa salvaje. Por el contrario, a los 14 dpi, las señales positivas para caspasa 3 eran de un 15% y de un 7,6% para la mutante LR y el BoHV-1 salvaje, respectivamente, y estas diferencias resultaron estadísticamente significativas. Resultados similares se obtuvieron cuando el número de neuronas apoptóticas se evaluó mediante la

técnica de TUNEL. En conclusión, estos hallazgos demostraron que el gen LR posee propiedades anti-apoptóticas *in vivo* y que la inhibición de la muerte neuronal promueve el establecimiento de latencia.

EL GEN LR Y LA REGULACIÓN DE LOS INFILTRADOS MONONUCLEARES EN GT

Durante el pico de la infección aguda (6 dpi), los terneros experimentalmente infectados con el BoHV-1 salvaje presentaban infiltrados de células mononucleares moderados a severos en los GT. En contraste, al mismo tiempo post-infección, no se observaron infiltrados celulares en los GT de terneros infectados con la mutante LR. Sin embargo, a los 14 dpi se detectaron numerosos focos inflamatorios en los GT de terneros infectados con la cepa mutante, aunque no en aquellos infectados con el BoHV-1 salvaje. Estas observaciones se asociaron con un probable papel de la proteína LR en la regulación de los infiltrados linfocitarios en GT (35). Varios estudios con el HSV-1 (30) sugirieron que la respuesta mediada por células jugaría un papel en el control de la infección de las neuronas sensoriales. Durante la etapa de replicación aguda, numerosos linfocitos T CD8⁺ infiltran el GT, los cuales son la principal fuente de IFN- γ (19). Las células inflamatorias y la expresión de citoquinas persisten durante varios meses luego de la infección primaria y se propone que la actividad no citolítica de los linfocitos T CD8⁺ (30) es responsable de la preservación de un reservorio neuronal latente y de la prevención de la reactivación de la latencia. Pérez y col (35) seleccionaron focos de células inflamatorias en secciones de GT de terneros infectados con la cepa mutante LR o con el virus salvaje y utilizaron la microdissección mediante captura por láser (LCM) para analizar neuronas rodeadas por infiltrados mononucleares. Las áreas ganglionares que contenían los infiltrados celulares se colectaron en forma separada a las neuronas. A partir de ambas muestras se extrajo ADN para determinar la presencia del genoma viral mediante PCR. Durante el pico de la infección aguda de los bovinos infectados con el BoHV-1 salvaje, la presencia de infiltrados mononucleares y de ADN viral en los GT se correlacionó con los niveles elevados de replicación del virus en esta etapa. Estos hallazgos también demostraron que no sólo las neuronas contienen ADN viral, sino también las células satelitales y, probablemente, las células mononucleares infiltrantes. A diferencia de las observaciones durante el pico de la infección aguda, a los 14 dpi no se detectó replicación del virus salvaje o de la cepa mutante. Sin embargo, la presencia de varios focos de células mononucleares en los GT de terneros infectados

con la mutante LR sugiere que la migración de linfocitos y monocitos ocurre más lentamente que en los tejidos infectados por el virus salvaje y que estas células persisten aún cuando no se detecta replicación viral. En parte, estos hallazgos están asociados con el crecimiento reducido de la cepa mutante en el sistema nervioso periférico. También es probable que la mutante LR no pueda controlar la migración de células inflamatorias durante la replicación aguda. La infiltración de células inmunitarias en GT ocurre como consecuencia de la replicación y expresión de genes virales, como se observa en el caso de la infección con BoHV-1 salvaje, y la migración de células inflamatorias cesa cuando la replicación viral aguda desaparece. En ausencia de la proteína LR podría ocurrir un incremento en el ciclo de muerte celular e infiltración de linfocitos durante los estadios finales de la infección aguda (establecimiento de la latencia). El incremento en las señales apoptóticas inducido por la mutante LR en el GT (23) probablemente incrementa la infiltración de linfocitos, en parte, debido a que se describió que ciertas caspasas involucradas en la apoptosis tienen propiedades anti-inflamatorias (24). En conjunto, estas observaciones sugieren que la muerte celular inducida por la mutante LR facilita la respuesta inflamatoria cerca del final de la infección aguda. Consecuentemente, el número de neuronas infectadas se reduce debido al proceso apoptótico, llevando a una disminución en la cantidad de ADN viral en GT y a una reducción drástica en la frecuencia de la reactivación de la latencia. En conclusión, para que ocurra el establecimiento y mantenimiento de la latencia es necesario que existan mecanismos que inhiban la actividad del sistema inmunitario contra el virus, especialmente que impidan el reconocimiento de la/las proteínas codificadas por el gen LR. Por lo tanto, se puede asumir que dichas proteínas poseen mecanismos que, directa o indirectamente, inhiben los mecanismos inmunológicos en GT (36). No obstante se requieren nuevos estudios que permitan esclarecer el rol de gen LR en relación a la respuesta inmunitaria en el sistema nervioso periférico.

UNA NUEVA PROTEÍNA EXPRESADA DURANTE LA LATENCIA: ORF-E

Recientemente, se identificó un pequeño ORF de 135 aminoácidos que está contenido en la secuencia del promotor del gen LR, al cual se lo denominó ORF-E. ORF-E es anti-sentido al transcripto LR, en dirección 3' con respecto al ORF del gen bICP0, aunque no se superpone a su secuencia (15). Pérez y col (36) observaron que ORF-E contiene sitios potenciales de fosforilación para la caseína quinasa 2 y para la proteína quinasa C. La presencia de esta pequeña proteína se detectó consistentemente en células bovinas

infectadas (15, 36). Una proteína de fusión ORF-E/GFP se detectó en el núcleo de líneas celulares de origen neuronal y en el núcleo y citoplasma de células de origen no neural (15). En líneas celulares neuronales, ORF-E induce proyecciones semejantes a las neuritas (prolongaciones del soma neuronal), probablemente a través de la cooperación con factores celulares, por lo cual se sugirió que ORF-E podría desempeñar un papel en el reestablecimiento de la función neuronal luego de la infección viral (36). En forma similar, el HSV-1 codifica un transcripto anti-sentido al LAT, el cual ocupa una localización genómica similar al transcripto ORF-E; sin embargo, no existe similitud a nivel de la secuencia aminoácida (38).

También se detectó la expresión de ORF-E *in vivo*, en las neuronas de los GT de terneros latentemente infectados (15, 36). A las 24 horas posteriores a la administración de DEX para inducir la reactivación, la proteína expresada a partir del ORF-E se detectó consistentemente en células satelitales o células inflamatorias, cerca de la periferia de las neuronas del GT. A las 48 horas post-reactivación, algunos núcleos neuronales presentaron tinción positiva para ORF-E. En comparación con la proteína LR, un mayor porcentaje de neuronas presentó reactividad positiva para ORF-E durante la infección aguda, latencia y reactivación (36). A diferencia del gen LR, ORF-E no induce arresto del ciclo celular y no posee actividad anti-apoptótica (15), por lo cual se asume que contribuye al ciclo infeccioso del BoHV-1 a través de mecanismos diferentes a los utilizados por el gen LR. Aunque se requieren más estudios para identificar el papel exacto que desempeña ORF-E en el ciclo vital del BoHV-1, los resultados preliminares sugieren que, al igual que el gen LR, su función sería importante en las etapas de latencia y reactivación.

INTERACCIÓN DEL GEN LR CON C/EBP-A

Entre las proteínas que interactúan con el gen LR se describió a la proteína alfa potenciadora de unión al CCAAT (C/EBP- α), una proteína cuya expresión es inducida en las neuronas del GT durante la infección productiva y la reactivación de terneros latentemente infectados. Las proteínas potenciadoras de unión al CCAAT son factores de transcripción que poseen un dominio bZIP de dimerización y unión al ADN. Estas proteínas están involucradas en diversos procesos como el control y la diferenciación celular, el metabolismo y la inflamación (40). Al igual que en la infección por el virus de Epstein-Barr (EBV) y el herpes virus humano 8 (HHV-8), C/EBP- α también activa ciertos promotores de BoHV-1 durante la infección lítica (26). En forma sinérgica con bTIF, C/EBP- α activa a la unidad de transcrip-

ción inmediatamente temprana (IEtu1) que activa la expresión de dos genes virales, bICP0 y bICP4 (25). Por lo tanto, se sugiere que la interacción de la proteína LR con C/EBP- α inhibiría la infección viral productiva en las neuronas y permitiría el establecimiento de la latencia.

EL GEN LR Y EL ESTABLECIMIENTO DE LATENCIA EN TEJIDO LINFOIDE

El principal sitio para el establecimiento de latencia de los alfa-herpesvirus son las neuronas sensoriales. No obstante, las infecciones latentes o persistentes también pueden ocurrir en sitios no-neurales. Al igual que las neuronas sensoriales, las células linfoides son células altamente diferenciadas y tienen una vida media larga. Por lo tanto, son sitios adecuados para alojar al virus durante la latencia. Diversos estudios demostraron que el ADN del virus de la pseudorabia (42), del herpesvirus equino-1 (48) y del herpesvirus canino-1 (28) estaba presente en tejido linfóide. El ADN del BoHV-1 se detectó consistentemente en las tonsilas (34), leucocitos, ganglios linfáticos y bazo, en ausencia de virus infeccioso, lo cual indica que el virus puede establecer latencia o persistir en estas células. La infección de las células mononucleares sanguíneas (PBMC) por BoHV-1 lleva a la alteración de sus actividades inmunológicas y los estudios de Winkler y col (58, 60) demostraron que durante la infección aguda, BoHV-1 infecta e induce apoptosis de los linfocitos T CD4⁺.

Utilizando la cepa mutante LR, Pérez y col (34) demostraron que el gen LR estimula el crecimiento viral en las tonsilas bovinas. Los títulos de esta cepa en las tonsilas durante la infección aguda fueron más bajos que para el virus salvaje y mediante hibridización *in situ* no se logró detectar el ADN de la cepa mutante durante la infección aguda de las tonsilas. A pesar de los niveles más bajos de virus infeccioso y de ADN viral durante la infección aguda, mediante PCR semicuantitativo se determinó que ambas cepas alcanzan niveles similares de ADN en las tonsilas durante la latencia. Este estudio sugiere que el gen LR estimula el crecimiento del BoHV-1 en este tejido. La presencia de ADN viral a los 60 días post-infección, en ausencia de niveles detectables de la expresión de genes IE, E y L, confirma que las tonsilas son un sitio específico para la latencia del BoHV-1. La recuperación de virus

infeccioso sólo fue posible mediante el explante y co-cultivo de las tonsilas, lo cual es consistente con las características de una infección latente (34). La mutante LR no se reactiva *in vivo* luego de la administración de DEX. Sin embargo, la recuperación de la cepa mutante a partir de los explantes tonsilares también demostró que el ADN viral es infeccioso luego del establecimiento de la latencia. Como se describió previamente, Lovato y col (23) demostraron que la mutante LR induce niveles más elevados de apoptosis en GT hacia el final de la infección aguda. Aunque el ARN del gen LR se expresa abundantemente en los GT del ganado infectado (18), este ARN no se detecta en forma abundante en las tonsilas (34, 58), lo cual sugiere que las proteínas codificadas por el gen LR tampoco se expresan a altos niveles. A diferencia de los resultados en GT, el gen LR no desempeñaría un papel importante en la regulación de la apoptosis en tejido linfóide, en parte porque éste no sería abundantemente expresado. El transcripto LR sufre empalmes que son específicos del tejido neuronal (7), por lo cual es probable que no ocurra un empalme adecuado en las tonsilas y, por lo tanto, la proteína LR podría no tener una actividad anti-apoptótica potente en este tejido. También es posible que el virus infecte un número muy bajo de células en las tonsilas. De acuerdo a este concepto, Fuchs y col (9) demostraron que la infección de los PBMC es un evento común durante la infección aguda del ganado, aunque sólo un pequeño número de leucocitos (10^{-4} a 10^{-2}) en la sangre periférica contienen ADN del BoHV-1.

Las células linfoides son tipos celulares altamente diferenciados al igual que las neuronas; no obstante, también debe considerarse que los factores de transcripción y/o los factores regulatorios involucrados en el control del ciclo celular, pueden afectar la actividad de los genes virales en una forma dependiente del tejido. En resumen, estos resultados demuestran que el gen LR no sería esencial para el ciclo de latencia y reactivación en las tonsilas como lo es en las neuronas sensoriales de los bovinos. Sin embargo, el establecimiento de la latencia en células linfoides y la probabilidad de un mecanismo diferente involucrado en la regulación de la latencia del BoHV-1 imponen una mayor complejidad para el control de la enfermedad.

Cuadro 1. Principales funciones del gen LR en el ciclo de latencia y reactivación del herpesvirus bovino tipo 1 (BoHV-1).

Inhibición de la expresión de los genes virales inmediatamente tempranos
Inhibición de la actividad de los complejos cdk-ciclinas
Inhibición de la apoptosis
Inducción temprana de la respuesta a interferón
Inhibición de la infiltración de células mononucleares hacia el final de la infección aguda

CONCLUSIÓN

En el Cuadro 1 se resumen las principales funciones del gen LR que participarían en el ciclo de latencia y reactivación del BoHV-1. A diferencia de lo que ocurre con el LAT del HSV-1, el cual es importante pero no esencial para el ciclo de latencia y reactivación viral, las funciones del gen LR del BoHV-1 son críticas en estas etapas del ciclo infeccioso. Las funciones descritas utilizan mecanismos para manipular la maquinaria celular y permitir la perpetuación del virus en el huésped y la naturaleza. Se requieren más investigaciones para determinar y discernir las propiedades de la familia de proteínas codificadas por el gen LR y ORF-E.

Muchos países utilizan vacunas vivas modificadas contra el BoHV-1. Sin embargo, estas vacunas pueden establecer latencia y el virus vacunal puede reactivarse del estado latente. La reactivación del BoHV-1 es el principal medio de transmisión del virus en los rodeos. El hecho de que la cepa mutante LR no se reactiva, determina que la introducción de mutaciones en el gen LR puede permitir el desarrollo de cepas capaces de proteger a los animales de la infección y a su vez evitar los riesgos de reactivación. El entendimiento de los mecanismos que utiliza el virus para establecer y mantener el estado latente es esencial para lograr el desarrollo de inmunógenos eficaces que permitan controlar la infección.

AGRADECIMIENTOS

El autor agradece especialmente al Dr. Gustavo Bretschneider por la lectura y comentarios sobre el manuscrito.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bratanich AC, Hanson ND, Jones CJ. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits the activity of immediate-early transcription unit 1. *Virology*. 1992 Dec;191(2):988-91.
2. Bratanich AC, Jones CJ. Localization of cis-acting sequences in the latency-related promoter of bovine herpesvirus 1 which are regulated by neuronal cell type factors and immediate-early genes. *J Virol*. 1992 Oct;66(10):6099-106.
3. Brown GA, Field HJ. Experimental reactivation of bovine herpesvirus 1 (BHV-1) by means of corticosteroids in an intranasal rabbit model. *Arch Virol*. 1990;112(1-2):81-101.
4. Cai W, Astor TL, Liptak LM, Cho C, Coen DM, Schaffer PA. The herpes simplex virus type 1 regulatory protein ICP0 enhances virus replication during acute infection and reactivation from latency. *J Virol*. 1993 Dec;67(12):7501-12.
5. Capon DJ, Shepard HM, Goeddel DV. Two distinct families of human and bovine interferon-alpha genes are coordinately expressed and encode functional polypeptides. *Mol Cell Biol*. 1985 Apr;5(4):768-79.
6. Devireddy LR, Jones C. Alternative splicing of the latency-related transcript of bovine herpesvirus 1 yields RNAs containing unique open reading frames. *J Virol*. 1998 Sep;72(9):7294-301.
7. Devireddy LR, Jones CJ. Activation of caspases and p53 by bovine herpesvirus 1 infection results in programmed cell death and efficient virus release. *J Virol*. 1999 May;73(5):3778-88.
8. Farrell MJ, Dobson AT, Feldman LT. Herpes simplex virus latency-associated transcript is a stable intron. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991 Feb 1;88(3):790-4.
9. Fuchs M, Hübert P, Detterer J, Rziha HJ. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol*. 1999 Aug;37(8):2498-507.
10. Galvan V, Brandimarti R, Roizman B. Herpes simplex virus 1 blocks caspase-3-independent and caspase-dependent pathways to cell death. *J Virol*. 1999 Apr;73(4):3219-26.
11. Goodbourn S, Didcock L, Randall RE. Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures. *J Gen Virol*. 2000 Oct;81(Pt 10):2341-64.
12. Heichman KA, Roberts JM. Rules to replicate by. *Cell*. 1994 Nov 18;79(4):557-62.
13. Henderson G, Perng GC, Nesburn AB, Wechsler SL, Jones C. The latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 can suppress caspase 3 and caspase 9 cleavage during productive infection. *J Neurovirol*. 2004 Feb;10(1):64-70.
14. Inman M, Lovato L, Doster A, Jones C. A mutation in the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 leads to impaired ocular shedding in acutely infected calves. *J Virol*. 2001 Sep;75(18):8507-15.
15. Inman M, Zhou J, Webb H, Jones C. Identification of a novel bovine herpesvirus 1 transcript containing a small open reading frame that is expressed in trigeminal ganglia of latently infected cattle. *J Virol*. 2004 May;78(10):5438-47.
16. Jiang Y, Hossain A, Winkler MT, Holt T, Doster A, Jones C. A protein encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 is expressed in trigeminal ganglionic neurons of latently infected cattle and interacts with cyclin-dependent kinase 2 during productive infection. *J Virol*. 1998 Oct;72(10):8133-42.
17. Jiang Y, Inman M, Zhang Y, Posadas NA, Jones C. A mutation in the latency-related gene of bovine herpesvirus 1 inhibits protein expression from open reading frame 2 and an adjacent reading frame during productive infection. *J Virol*. 2004 Mar;78(6):3184-9.
18. Jones C. Herpes simplex virus type 1 and bovine herpesvirus 1 latency. *Clin Microbiol Rev*. 2003 Jan;16(1):79-95.
19. Kodukula P, Liu T, Rooijen NV, Jager MJ, Hendricks RL. Macrophage control of herpes simplex virus type 1 replication in the peripheral nervous system. *J Immunol*. 1999 Mar 1;162(5):2895-905.
20. Kutish G, Mainprize T, Rock D. Characterization

- of the latency-related transcriptionally active region of the bovine herpesvirus 1 genome. *J Virol.* 1990 Dec;64(12):5730-7.
21. Leib DA, Bogard CL, Kosz-Vnenchak M, Hicks KA, Coen DM, Knipe DM, Schaffer PA. A deletion mutant of the latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 reactivates from the latent state with reduced frequency. *J Virol.* 1989 Jul;63(7):2893-900.
22. Lemaire M, Weynants V, Godfroid J, Schynts F, Meyer G, Letesson JJ, Thiry E. Effects of bovine herpesvirus type 1 infection in calves with maternal antibodies on immune response and virus latency. *J Clin Microbiol.* 2000 May;38(5):1885-94.
23. Lovato L, Inman M, Henderson G, Doster A, Jones C. Infection of cattle with a bovine herpesvirus 1 strain that contains a mutation in the latency-related gene leads to increased apoptosis in trigeminal ganglia during the transition from acute infection to latency. *J Virol.* 2003 Apr;77(8):4848-57.
24. Martinon F, Tschopp J. Inflammatory caspases: linking an intracellular innate immune system to auto-inflammatory diseases. *Cell.* 2004 May 28;117(5):561-74.
25. Meyer F, Jones C. The cellular transcription factor, CCAAT enhancer-binding protein alpha (C/EBP-alpha), has the potential to activate the bovine herpesvirus 1 immediate-early transcription unit 1 promoter. *J Neurovirol.* 2008 Dec 29:1-8.
26. Meyer F, Pérez S, Geiser V, Sintek M, Inman M, Jones C. A protein encoded by the bovine herpesvirus 1 latency-related gene interacts with specific cellular regulatory proteins, including CCAAT enhancer binding protein alpha. *J Virol.* 2007 Jan;81(1):59-67.
27. Meyer F, Pérez S, Jiang Y, Zhou Y, Henderson G, Jones C. Identification of a novel protein encoded by the latency-related gene of bovine herpesvirus 1. *J Neurovirol.* 2007 Dec;13(6):569-78.
28. Miyoshi M, Ishii Y, Takiguchi M, Takada A, Yasuda J, Hashimoto A, et al. Detection of canine herpesvirus DNA in the ganglionic neurons and the lymph node lymphocytes of latently infected dogs. *J Vet Med Sci.* 1999 Apr;61(4):375-9.
29. Narita M, Inui S, Nanba K, Shimizu Y. Recrudescence of infectious bovine rhinotracheitis virus and associated neural changes in calves treated with dexamethasone. *Am J Vet Res.* 1981 Jul;42(7):1192-7.
30. Nash AA. T cells and the regulation of herpes simplex virus latency and reactivation. *J Exp Med.* 2000 May 1;191(9):1455-8.
31. Park MT, Lee SJ. Cell cycle and cancer. *J Biochem Mol Biol.* 2003 Jan 31;36(1):60-5.
32. Payton M, Coats S. Cyclin E2, the cycle continues. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Apr;34(4):315-20.
33. Peng W, Henderson G, Inman M, BenMohamed L, Perng GC, Wechsler SL, et al. The locus encompassing the latency-associated transcript of herpes simplex virus type 1 interferes with and delays interferon expression in productively infected neuroblastoma cells and trigeminal Ganglia of acutely infected mice. *J Virol.* 2005 May;79(10):6162-71.
34. Pérez S, Inman M, Doster A, Jones C. Latency-related gene encoded by bovine herpesvirus 1 promotes virus growth and reactivation from latency in tonsils of infected calves. *J Clin Microbiol.* 2005 Jan;43(1):393-401.
35. Pérez S, Lovato L, Zhou J, Doster A, Jones C. Comparison of inflammatory infiltrates in trigeminal ganglia of cattle infected with wild-type Bovine herpesvirus 1 versus a virus strain containing a mutation in the LR (latency-related) gene. *J Neurovirol.* 2006 Oct;12(5):392-7.
36. Pérez S, Meyer F, Henderson G, Jiang Y, Sherman S, Doster A, et al. A protein encoded by the bovine herpesvirus 1 open reading frame E gene induces neurite-like morphological changes in mouse neuroblastoma cells and is expressed in trigeminal ganglionic neurons. *J Neurovirol.* 2007 Apr;13(2):139-49.
37. Pérez S, Meyer F, Saira K, Doster A, Jones C. Premature expression of the latency-related RNA encoded by bovine herpesvirus type 1 correlates with higher levels of beta interferon RNA expression in productively infected cells. *J Gen Virol.* 2008 Jun;89(Pt 6):1338-45.
38. Perng GC, Maguen B, Jin L, Mott KR, Kurylo J, BenMohamed L, et al. A novel herpes simplex virus type 1 transcript (AL-RNA) antisense to the 5' end of the latency-associated transcript produces a protein in infected rabbits. *J Virol.* 2002 Aug;76(16):8003-10.
39. Perng GC, Slanina SM, Yukht A, Ghiasi H, Nesburn AB, Wechsler SL. The latency-associated transcript gene enhances establishment of herpes simplex virus type 1 latency in rabbits. *J Virol.* 2000 Feb;74(4):1885-91.
40. Ramji DP, Foka P. CCAAT/enhancer-binding proteins: structure, function and regulation. *Biochem J.* 2002 Aug 1;365(Pt 3):561-75.
41. Rock D, Lokensgard J, Lewis T, Kutish G. Characterization of dexamethasone-induced reactivation of latent bovine herpesvirus 1. *J Virol.* 1992 Apr;66(4):2484-90.
42. Sabó A, Rajcáni J. Latent pseudorabies virus infection in pigs. *Acta Virol.* 1976 Jun;20(3):208-14.
43. Sawtell NM, Poon DK, Tansky CS, Thompson RL. The latent herpes simplex virus type 1 genome copy number in individual neurons is virus strain specific and correlates with reactivation. *J Virol.* 1998 Jul;72(7):5343-50.
44. Sawtell NM. The probability of in vivo reactivation of herpes simplex virus type 1 increases with the number of latently infected neurons in the ganglia. *J Virol.* 1998 Aug;72(8):6888-92.
45. Schang LM, Bantly A, Schaffer PA. Explant-induced reactivation of herpes simplex virus occurs in neurons expressing nuclear cdk2 and cdk4. *J Virol.* 2002 Aug;76(15):7724-35.
46. Schang LM, Hossain A, Jones C. The latency-related gene of bovine herpesvirus 1 encodes a product which inhibits cell cycle progression. *J Virol.* 1996 Jun;70(6):3807-14.
47. Schwab SR, Shugart JA, Horng T, Malarkannan S, Shastri N. Unanticipated antigens: translation

- initiation at CUG with leucine. *PLoS Biol.* 2004 Nov;2(11):e366.
48. Scott JC, Dutta SK, Myrup AC. In vivo harboring of equine herpesvirus-1 in leukocyte populations and subpopulations and their quantitation from experimentally infected ponies. *Am J Vet Res.* 1983 Jul;44(7):1344-8.
49. Singh M, Fraefel C, Bello LJ, Lawrence WC, Schwyzer M. Identification and characterization of BICP27, an early protein of bovine herpesvirus 1 which may stimulate mRNA 3' processing. *J Gen Virol.* 1996 Apr;77 (Pt 4):615-25.
50. Spivack JG, Fraser NW. Expression of herpes simplex virus type 1 latency-associated transcripts in the trigeminal ganglia of mice during acute infection and reactivation of latent infection. *J Virol.* 1988 May;62(5):1479-85.
51. Stevens JG, Cook ML. Latent herpes simplex virus in spinal ganglia of mice. *Science.* 1971 Aug 27;173(999):843-5.
52. Thompson RL, Sawtell NM. The herpes simplex virus type 1 latency-associated transcript gene regulates the establishment of latency. *J Virol.* 1997 Jul;71(7):5432-40.
53. Tikoo SK, Campos M, Babiuk LA. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis, and control. *Adv Virus Res.* 1995;45:191-223.
54. Vaseva AV, Moll UM. The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Oct 25.
55. Vaux DL, Haecker G, Strasser A. An evolutionary perspective on apoptosis. *Cell.* 1994;76:777-79.
56. Velan B, Cohen S, Grosfeld H, Leitner M, Shafferman A. Bovine interferon alpha genes. Structure and expression. *J Biol Chem.* 1985 May 10;260(9):5498-504.
57. Wilson V, Jeffreys AJ, Barrie PA, Boseley PG, Slocombe PM, Easton A, et al. A comparison of vertebrate interferon gene families detected by hybridization with human interferon DNA. *J Mol Biol.* 1983 Jun 5;166(4):457-75.
58. Winkler MT, Doster A, Jones C. Persistence and reactivation of bovine herpesvirus 1 in the tonsils of latently infected calves. *J Virol.* 2000 Jun;74(11):5337-46.
59. Winkler MT, Schang LS, Doster A, Holt T, Jones C. Analysis of cyclins in trigeminal ganglia of calves infected with bovine herpesvirus-1. *J Gen Virol.* 2000 Dec;81(Pt 12):2993-8.
60. Winkler MT, Doster A, Jones C. Bovine herpesvirus 1 can infect CD4(+) T lymphocytes and induce programmed cell death during acute infection of cattle. *J Virol.* 1999 Oct;73(10):8657-68.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

La revista ANALECTA VETERINARIA es una publicación semestral de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Está destinada a la difusión de trabajos científicos en el campo de las Ciencias Veterinarias, generados en esta Unidad Académica y en otras instituciones. Asimismo, reflejará las actividades académicas de postgrado, de extensión y de educación a distancia que se desarrollan en esta Casa de Estudio. El idioma oficial es el español aunque se aceptarán trabajos en inglés que seguirán el mismo esquema detallado más abajo.

ANALECTA VETERINARIA seguirá los "Requerimientos uniformes" para la presentación de manuscritos en revistas biomédicas según la quinta edición de 1997 (*International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirement for manuscript submitted to biomedical Journals. N Engl J Med 1997; 336:309-15*). Puede obtener el original en Inglés en: <http://www.icmje.org/index.html>. Una traducción de estos requerimientos pueden ser recuperada en INTERNET en la dirección electrónica:

<http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta.html>

ANALECTA VETERINARIA puede ser recuperada gratuitamente en INTERNET en formato pdf (Adobe Acrobat Reader®) que permite su impresión tal como aparece en la copia final incluyendo gráficos y tablas. La misma se encuentra en la dirección electrónica <http://www.fcv.unlp.edu.ar>. La revista consta de las siguientes secciones:

I.-Trabajos de investigación, II.-Artículos de revisión, III.-Comunicaciones breves IV-Información institucional y V. Cartas al editor.

Normas generales de redacción

Los manuscritos deberán ser enviados para su publicación al Comité editorial en idioma español o inglés. Deberán enviarse por triplicado en hoja tamaño A4 (210 x 297 mm), numeradas correlativamente y escritas a doble espacio, simple faz, con un margen de 4 cm a la izquierda y no menor de 2 cm en el derecho. Deberá enviarse además una copia en archivo electrónico (MS-Word 2000®) que pueden enviarse vía mail; dos de las copias no deberán contener el nombre de los autores ni su filiación científica. Los autores deben retener una copia de todo el material enviado inclusive fotografías ya que no se aceptará responsabilidad por daño o pérdida de trabajos.

Las fotografías en blanco y negro podrán ser incluidas en número no mayor a 3 por artículo. Otras inclusiones de fotografías en blanco y negro o en color tendrán un cargo extra y estarán a cargo de los autores. Las versiones electrónica y en CD-ROM de la revista podrán contener fotografías color sin costo para los autores. La inclusión de fotografías color en el material impreso deberá ser expresamente solicitado al editor. El material enviado estará listo para su reproducción, deberán además enviarse fotografías o gráficos en formato TIF, CRD o JPG.

No son aceptables aquellos gráficos, esquemas, fotografía, tabla de excel o similares "incrustados" en el archivo de texto (word).

El costo de cada artículo será de \$ 50 (o 50 U\$S si el lugar de trabajo del primer principal proviene del exterior) hasta 5 hojas (publicadas) y \$ 10 por cada hoja adicional que deberá ser abonado por los autores indefectiblemente antes de su publicación.

Las unidades de medida se expresarán siguiendo las normas del Sistema Internacional de Unidades. El material enviado será analizado para su publicación por el Comité Editorial, el que lo someterá a consideraciones del referato externo. El Comité Editorial informará al autor del trabajo de las correcciones y/o recomendaciones sugeridas por el evaluador y determinará en función de ello la aceptación o rechazo del mismo. Si hubiere correcciones, las mismas deberán ser efectuadas por los autores en un plazo máximo de 6 meses, caso contrario se considerará el trabajo como "rechazado". Se deja constancia que el hecho de recibir un trabajo no conlleva la obligación de su publicación por parte de ANALECTA VETERINARIA. Una vez aceptado el trabajo se enviará a los autores la "prueba de galera" para su corrección, la que deberá ser devuelta en un plazo no mayor de 15 días. La falta de respuesta luego del plazo estipulado se entenderá como una aceptación de la misma. El envío de un trabajo a ANALECTA VETERINARIA deberá realizarse con el consentimiento de todos los autores. En todos los casos se tomará como fecha de remisión la del timbre postal correspondiente.

La falta de cumplimiento de cualquiera de las normas implica la devolución del trabajo para su adecuación. La Facultad no se hace solidaria con las opiniones vertidas en los trabajos, siendo los autores los únicos responsables. Tampoco se hace responsable ni respalda la publicidad incluida en la revista.

Normas particulares de redacción:

1.Trabajos de investigación:

No deberán exceder de 30 páginas, incluyendo 25 citas bibliográficas. Deberán ser inéditos y estarán organizados de la siguiente manera.

a)Título: será breve, preciso y reflejará el contenido del trabajo. A renglón seguido se indicará el nombre y apellido (s) del autor, acompañados de sus grados académicos más importantes, separando los autores por una coma. A renglón seguido se señalará el nombre de la institución, cátedra o laboratorio a la que pertenece, así como su dirección postal, número de fax, y dirección electrónica si la posee. Cuando haya más de un autor que pertenezca a diferentes instituciones, cátedras o laboratorios, las mismas serán identificadas con un número arábigo superíndice, después del apellido. Agregar un título resumido de un máximo de 40 caracteres (considerar espacios y símbolos como caracteres).

b)Resumen: será redactado en castellano y en inglés (abstract) incluyendo además en este último caso el título en idioma inglés. El resumen deberá sintetizar los objetivos principales del trabajo, la metodología empleada, los resultados más sobresalientes y las conclusiones que se hayan obtenido. No superará tanto en español como en inglés las 200 palabras.

c) Palabras clave: al finalizar el resumen y el "abstract" en renglón aparte, deberán consignarse palabras clave, cinco como máximo, colocándolas bajo el título Palabras clave o "Key Words" según corresponda.

d) Introducción: se señalarán los antecedentes sobre el tema, citando la bibliografía más relevante y especificando claramente los objetivos y el fundamento del trabajo.

e) Materiales y Métodos: toda técnica nueva deberá detallarse para facilitar su comprensión. Se evitará pormenorizar sobre métodos ya experimentados, citándose los materiales utilizados en la realización del trabajo. En los casos en que el diseño experimental requiera una evaluación estadística, se indicará el método empleado.

f) Resultados: se presentarán en forma clara, ordenada y breve.

g) Discusión: incluirá la evaluación y la comparación de los resultados obtenidos con los de otros autores, indicando las referencias bibliográficas correspondientes. Las conclusiones deberán sustentarse en los resultados hallados, evitando todo concepto vago o condicional.

h) Agradecimientos: colaboraciones, ayuda técnica, apoyo financiero, etc. deberán especificarse en agradecimientos. Estas personas deberán conceder su permiso para ser nombradas.

i) Bibliografía: deberá escribirse en hoja aparte ordenada según aparece en el texto y numerada correlativamente con números arábigos, contendrá todas las citas mencionadas en el texto teniendo en cuenta el siguiente formato:

Autores: Apellido, seguido por las iniciales del/los autor/res separados del siguiente autor por coma. Título: completo del trabajo en el idioma en que fue publicado. Nombre de la revista o publicación donde aparece el artículo abreviada de acuerdo al "US National Library of Medicine (NLM)" que usa el *Index Medicus* <http://www.nlm.nih.gov>. En forma seguida el año de publicación; en forma continuada el número de volumen de la revista, seguido de coma y el número de la revista (si lo posee), dos puntos, seguido del número de páginas de inicio y terminación del trabajo. Ej.

1. Rodríguez-Vivas RI, Domínguez-Alpizar JL. Grupos entomológicos de importancia veterinaria en Yucatán, México. *Rev Biomed* 1998; 9 (1):26-37

En el texto del trabajo hacer referencia mediante números arábigos entre paréntesis.

Si se tratase de trabajos publicados en libros:

Apellido y nombres en forma similar al indicado para revistas periódicas. A continuación el nombre del libro, edición, editorial, ciudad, país entre paréntesis, seguidas del año de publicación y páginas consultadas. Ej.

1. Plonat H. Elementos de Análisis Clínico Veterinario, Ed. Acribia. Zaragoza (España), 1984; p.45-75

Las tablas se presentarán en hojas separadas y con títulos completos ubicados sobre el margen superior y numerados con números arábigos, deberá incluirse además el título en inglés. Los gráficos se presentarán también en hojas separadas pero con títulos explicativos ubicados al pie de los mismos y numerados consecutivamente con números romanos debiéndose incluir además el título en inglés. Las tablas, gráficos o fotos se adjuntarán al final del manuscrito debiéndose indicar en el texto la posición correspondiente "insertar" tabla N° o gráfico N° o foto N°. Las fotografías deberán remitirse con la numeración en el reverso escrito con lápiz (o pegar una etiqueta de papel) de acuerdo a su secuencia en el texto, así como también indicarse el título y el autor del trabajo y cuál es la parte superior de la misma.

El tamaño deberá ser de 10 por 15 cm, pudiendo reducirse en la publicación por lo que se sugiere la buena calidad del detalle que se quiera resaltar. Cada foto deberá ser acompañada de una breve reseña explicativa de la misma en español y en inglés.

MUY IMPORTANTE: No enviar trabajos con bibliografía numerada automáticamente por el procesador Word, tampoco copiar y pegar *link* de internet, estos deben ser tipeados en el procesador de texto por los autores.

II. Artículos de revisión

Versarán sobre temas relevantes incluyendo una revisión bibliográfica adecuada y sus autores deberán tener idoneidad en los mismos. Estos artículos incluirán las siguientes secciones: título, título en inglés, resumen, "abstract", texto, agradecimientos y bibliografía. La extensión de estos trabajos no excederán las cincuenta páginas y sesenta citas bibliográficas.

El autor no deberá solamente realizar una recopilación bibliográfica exhaustiva, sino que además deberá hacer una discusión crítica sobre el tema considerado, destacando la trascendencia actual y futura y los puntos sobre los que existan diferencias de opinión.

III. Comunicaciones breves

Esta sección estará destinada a la comunicación de hallazgos preliminares en trabajos de investigación en marcha y a la descripción de nuevas técnicas (de laboratorio, quirúrgicas, de producción), hallazgos clínicos exóticos o poco frecuentes, etc. Su organización deberá seguir el lineamiento general indicado en el Ítem I. No deberán exceder las dos páginas incluyendo no más de 10 citas bibliográficas.

IV. Información institucional

Esta sección será destinada a difundir todas aquellas actividades o informaciones de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata que tengan una relación directa con los objetivos dispuestos para la presente publicación.

V. Cartas al editor

En esta sección se incluirán actualizaciones breves y comentarios sobre artículos ya publicados. Las cartas (hasta 1000 palabras de texto) deberán ser en formato carta y no se dividirán en secciones. Las cartas comenzarán con una introducción breve sobre la relación del tema. Incluir desarrollo de métodos; referencias, en no más de cinco; y figuras o ilustraciones, en no más de dos.

Correspondencia

Toda correspondencia dirigida a esta revista deberá realizarse a la siguiente dirección:

Sr. Director ANALECTA VETERINARIA
CC 296 (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA
TEL/FAX: 0221-4257980
Desde el exterior: +54-221-4257980
E-mail: analecta@fcv.unlp.edu.ar
<http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html>