

# ANALECTA VETERINARIA



Publicación de la  
**FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS**  
**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA**  
*Volumen 29 nº 2 año 2009*





FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

# ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 29 n° 2, 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](http://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](mailto: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](http://www.latindex.unam.mx)),

Ulrich's International Periodicals Directory

([www.ulrichsweb.com](http://www.ulrichsweb.com))

Zoological Records

([www.biosis.org.uk/products\\_services/zrss.html](http://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](http://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 (Zootecnia general) 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

# ANALECTA VETERINARIA Vol 29 n° 2, 2009

## Artículos de Investigación

### Research articles

**ANATOMÍA DEL MÚSCULO SEMITENDINOSO DE CERDO Y SU INFLUENCIA SOBRE LOS PARÁMETROS QUE ESTIMAN LA CALIDAD DE LA CARNE.** PIG SEMITENDINOSUS MUSCLE AND ITS INFLUENCE ON MEAT QUALITY TRAITS. **Graziotti GH y col.** 5-9

**CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTO CONCENTRADO PARA PERROS ADULTOS QUE SE EXPENDE EN COSTA RICA.** MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF COMMERCIAL ADULT DOG PELLETS SOLD IN COSTA RICA. **M. Herrera M y col.** 10-15

**ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA CAUSADA POR *Mycoplasma pulmonis* EN RATONES DE LA CEPA N:NIH (S)-Fox1nu TRANSPLANTADA CON LA LÍNEA TUMORAL HUMANA A549.** STUDY OF THE INTERFERENCE CAUSED BY *Mycoplasma pulmonis* IN IMMUNODEFICIENT N:NIH (S)-Fox1nu MICE TRANSPLANTED WITH THE HUMAN TUMOR LINE A549. **Milocco S y col.** 16-18

**ACTIVIDAD ANTILISTERIA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE PECES MARINOS.** ANTILISTERIAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM MARINE FISH. **Vallejo M y col.** 19-23

**DETERMINACION DE LA DOSIS ÓPTIMA DE TARTRATO DE TILOSINA PARA EL CONTROL A CAMPO DE LA LOQUE AMERICANA DE LAS ABEJAS.** DETERMINATION OF THE OPTIMUM DOSES OF TYLOSIN TARTRATE FOR THE CONTROL OF AMERICAN FOULBROOD IN HONEY BEE COLONIES. **Reynaldi F y col.** 24-30

**EFFECTOS DE LA APLICACIÓN DE KETAMINA-MIDAZOLAM Y KETAMINA-MIDAZOLAM-EPINEFRINA EN EL CANAL EPIDURAL DEL PERRO.** EFFECTS OF THE KETAMINE-MIDAZOLAM AND KETAMINE-MIDAZOLAM-EPINEPHRINE APPLICATION IN THE EPIDURAL CHANNEL OF THE DOG. **Cruz J y col.** 31-38

## Comunicaciones breves

### Short communications

**CANINE CEREBELLAR CORTICAL ABIOTROPHY IN TWO MIXED BREED LITTERMATES.** ABIOTROFIA CEREBELAR CORTICAL EN DOS CANINOS MESTIZOS HERMANOS. **del Amo AN y col.** 34-41

**TRASPLANTE DE UN MELANOMA CANINO EN RATONES INMUNODEFICIENTES DE LA CEPA N:NIH (S)-Fox1nu: ESTUDIOS PRELIMINARES.** CANINE MELANOMA TRANSPLANTATION IN IMMUNODEFICIENT IN:NIH (S)-Fox1nu MICE STRAIN: A PRELIMINARY STUDY. **Cuitiño MC y col.** 42-44

**SINDROME ULCEROSO GÁSTRICO EN EQUINOS DEL HIPODROMO NACIONAL “LA RINCONADA” CARACAS VENEZUELA.** EQUINE GASTRIC ULCER SYNDROME IN THE NATIONAL RACE TRACK “LA RINCONADA” CARACAS-VENEZUELA. **Morales A y col.** 45-47

**RINITIS NO SUPURATIVAS EN EL PERRO. HALLAZGOS ENDOSCÓPICOS.** PRESENTACIÓN DE CASOS. ENDOSCOPIC FINDINGS OF CANINE NON-SUPPURATIVE RHINITIS: A CASE SERIES. **Giordano A y col.** 48-52

**PRIMER AISLAMIENTO DE *Ornithobacterium rhinotracheale* EN ARGENTINA.** FIRST ISOLATION OF *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) IN ARGENTINA. **Uriarte J y col.** 53-55

## Revisiones

### Review

**ACUTE BULLOUS KERATOPATHY IN CATS.** QUERATOPATIA AMPOLLAR AGUDA DE LOS GATOS. **Vecchio NE** 56-59

## ANATOMÍA DEL MÚSCULO SEMITENDINOSO DE CERDO Y SU INFLUENCIA SOBRE LOS PARÁMETROS QUE ESTIMAN LA CALIDAD DE LA CARNE

Graziotti<sup>1</sup> GH, Cossu<sup>2</sup> ME, Ríos<sup>1</sup> CM, Moisés<sup>2</sup> SJ,  
Rodríguez Menéndez<sup>1</sup> JM, Basso<sup>2</sup> L, Bosco<sup>1</sup> A.

<sup>1</sup>Anatomía, Facultad de Ciencias Veterinarias,

<sup>2</sup>Laboratorio de Carnes. Facultad de Agronomía. Universidad de Buenos Aires.

**Resumen:** El objetivo del presente trabajo fue determinar diferencias significativas en parámetros relacionados con la calidad de carne en diferentes subvolúmenes (R1, R2, R3 y R4) del músculo semitendinoso de cerdo. Cerdos machos castrados (genética INTA-MGC) fueron divididos en tres sistemas de terminación: confinamiento (T1), semiextensivo sobre pastura de trébol y alfalfa (T2) o sobre campo natural (T3) y faenados a 100 kg de peso. En cada subvolumen se determinaron las fibras I, IIA y IIX/B por actividad de la enzima miosina adenosina trifosfatasa, el metabolismo por actividad de la enzima nicotinamida dinucleótido tetrazolium reductasa y el área de sección transversa. Se determinó el pH 24 hs postfaena (Testo 230), el color (colorímetro Minolta CR-300) a través de los parámetros L\* (luminosidad), a\* (índice de rojo) y b\* (índice de amarillo) y dureza Warner Bratzler (WB, Instron 4442). Se realizaron análisis de varianza y comparaciones múltiples entre las regiones musculares según Tukey (P=0,05). Se concluye que los parámetros considerados difieren significativamente (R1=R4 ≠ R2=R3) de acuerdo a la estructura del músculo y en menor medida respecto a los tratamientos productivos, evidenciando la necesidad de realizar estudios anatómicos previos a la toma de muestras.

**Palabras clave:** cerdo, confinado, semiextensivo, calidad de carne, fibra muscular, anatomía.

## PIG SEMITENDINOSUS MUSCLE AND ITS INFLUENCE ON MEAT QUALITY TRAITS

**Abstract:** The objective was to determine significant differences about meat quality traits in subvolumens (R1, R2, R3 and R4) of pig semitendinosus muscle. Castrated male pigs (INTA-MGC genetic line) were divided into three reared systems: indoor and outdoor with pasture or natural field and slaughtered at an average body weight of 100 kg. Fibrillar characteristics were evaluated on n 87 and physical-chemical variables on n 50. In each subvolumen were determined fiber types I, IIA and IIX/B by myofibrillar ATPase activity, metabolic profile by nicotinamide adenine tetrazolium reductase reaction and fiber cross sectional area. Also were determined pH 24 postmortem (Testo 230), tenderness (Warner Bratzler, WB, Instron 4442) and color (Minolta CR-300) through the parameters L\* (brightness), a\* (redness) and b\* (yellowness). Were carried out ANOVA and multiple comparisons among the muscular regions according to Tukey (P=0,05). We conclude that the considered variables have significant differences principally according to muscle structure (R1=R4≠R2=R3) and smaller importance about traits showing the impact of prior anatomical studies before sampling.

**Key words:** indoor, outdoor, pig meat quality, fiber muscle, anatomy.

Fecha de recepción: 28/04/09

Fecha de aprobación: 10/12/09

**Dirección para correspondencia:** Guillermo Graziotti. Facultad de Veterinaria. UBA. Chorroarín 280 CWO 1427, Fax 4524-8480, Argentina.

**E-mail:** [ggrazio@fvvet.uba.ar](mailto:ggrazio@fvvet.uba.ar)

## INTRODUCCIÓN

La valoración de los parámetros relacionados con la evaluación de la calidad de la carne es de vital importancia. Entre los parámetros cualitativos más importantes, asociados a las preferencias y decisión de compra de los consumidores, se encuentran: el color, descrito a través de los parámetros colorimétricos luminosidad ( $L^*$ ), índice del amarillo ( $b^*$ ) e índice del rojo ( $a^*$ ); y la terneza (medida como dureza, Warner Bratzler).

Diversos factores intrínsecos del músculo como los tipos de fibras musculares, el área de sección transversal de las fibras (AST) y su metabolismo en los momentos próximos a la faena, y factores ambientales como la alimentación y el sistema de crianza, influyen sobre las transformaciones post-mortem del músculo en carne modificando los valores de estos parámetros (1, 2).

Otro punto importante a tener en cuenta, es que los músculos esqueléticos de los mamíferos, en apariencia homogéneos, están compuestos por compartimientos neuromusculares indicados por la distribución de las ramas primarias del nervio, entre los cuales pueden variar el diseño arquitectónico macroscópico y las características de las fibras, incluido el perfil metabólico (3, 4, 5, 6). Esta heterogeneidad entre subvolumenes hace variar los parámetros físico-químicos de la carne, en función del sitio del músculo de donde sea obtenida la muestra. Los porcentajes de los tipos de fibras I, IIA, IIX y IIB, cuya capacidad oxidativa decrece en ese orden, varían significativamente entre los diferentes subvolumenes (7, 8).

El objetivo del presente trabajo fue determinar el efecto del sistema de producción porcina (confinado, semiextensivo sobre pastura o sobre campo natural) y los compartimientos neuromusculares del M. semitendinoso sobre los parámetros cualitativos de la carne de cerdo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 87 cerdos machos castrados pertenecientes a la genética INTA-MGC de Argentina, con un peso vivo inicial de 25 kg, distribuidos en tres sistemas productivos: confinado (T1), semiextensivo sobre pastura implantada (T2) y semiextensivo sobre campo natural (T3), con el objetivo de evaluar las características fibrilares de distintos subvolumenes del músculo semitendinoso (ST) y los parámetros cualitativos de la carne.

El grupo T1 fue instalado en boxes con piso de cemento mientras que los dos grupos semiextensivos se alojaron en potreros rotativos de 1,5 hectáreas con pradera implantada de trébol y alfalfa (T2) o sin pradera implantada (T3). Los cerdos fueron alimentados *ad-libitum* con una dieta estándar desde los 25 a los 60 kg de peso

vivo (ED: 3,30 Mcal/kg de MS, PC: 18%, Lisina: 1,05%) y desde los 60 kg hasta el peso de faena con una dieta de terminación (ED: 3,28 Mcal/kg de MS, PC: 17,5%, Lisina: 1,0 %) con base maíz y soja. Todos los animales fueron faenados al alcanzar los 100 kg de peso. Los músculos ST enteros fueron transportados, refrigerados con hielo, al Laboratorio de Calidad de Carnes de la FAUBA; a las 24 horas post faena se obtuvieron muestras de cada subvolumen, en las cuales se determinó el pH (peachímetro Testo 230), el color (colorímetro Minolta CR-300) a través de los parámetros  $L^*$  (luminosidad),  $a^*$  (índice de rojo) y  $b^*$  (índice de amarillo) y dureza Warner Bratzler (WB, Instron 4442) sobre muestras cocidas en baño de María (75°C, 50'). En un estudio previo (9) fueron determinados los subvolumenes musculares según la distribución de las ramas primarias del nervio ciático y del centro de cada uno de ellos fueron tomadas muestras musculares dentro de las cuatro horas siguientes a la faena, cubiertas con polvo de talco, congeladas por inmersión durante 40 segundos en nitrógeno líquido y guardadas a -80°C hasta análisis en el Laboratorio de Anatomía de la Fac. de Cs. Veterinarias de la UBA. Los cortes de cada muestra (10m $\mu$ ) fueron realizados en un crióstato Reichert- Jung 1800 a -27°C, montados en portaobjetos tratados para histoquímica con solución de polilisina (Poly-Lysine Sigma P-8920 U.S.A) al 1%. Los cortes fueron sometidos a la reacción histoquímica de adenosina trifosfatasa miofibrilar (mATPasa) previa preincubación ácida a pH 4.6 (10) modificado (11) para identificar los tipos fibrilares. En cortes seriados adicionales fue evaluada la reacción de la enzima nicotinamida adenina dinucleótido tetrazolium reductasa (NADH-TR) (12) para valorar la capacidad oxidativa de cada compartimiento. Las imágenes de cada corte fueron capturadas en formato TIFF (150 pixels/pulgada) empleando el software Motic Image plus 2.0. En las reacciones de mATPasa se dibujo una máscara siguiendo el borde de un determinado número (por lo menos 100) de fibras musculares para determinar el área de sección transversa (AST). La densidad óptica (DO) fue medida sobre las imágenes de la reacción de NADH-TR 40 X dibujando una máscara que incluya 3 fascículos adyacentes. Se adoptó esta técnica debido a que los tipos de fibras no se distribuyen al azar; las fibras anaeróbicas se ubican en la vecindad del perimio (13). Todas las mediciones fueron hechas en escala de grises usando un software analizador de imágenes de uso libre (Scion Image v. Beta 3b software, disponible para Windows). El programa fue calibrado en escala de 0.367 y 0.680 pixels/ $\mu$ m para las imágenes de 40X y 100X para NADH-TR y mATPasa respectivamente.

El análisis estadístico de los datos, para todas las variables estudiadas, se realizó utilizando

la técnica de Análisis de Varianza, en un diseño mixto con factores cruzados y anidados. Los factores tratamiento (T1, T2 y T3) y región (R1, R2, R3, R4), se consideraron fijos y cruzados, y el factor animal aleatorio y anidado en tratamiento. Se efectuaron también comparaciones múltiples entre las regiones musculares utilizando el método de Tukey, y contrastes ortogonales entre los tratamientos.

**RESULTADOS**

Se identificaron fibras de tipo I (1), IIA (2) y IIB/X (3) de acuerdo a la foto 1. En la Tabla 1 se muestran los valores de los parámetros consideradas para evaluar la calidad de carne y características de las fibras musculares, según las diferentes regiones musculares y tratamientos productivos. La luminosidad (L\*) resultó similar para T1 y T2 (P=0,1159) pero presentaron diferencias significativas con respecto a T3 (P=0,025); no hubo diferencias significativas para los parámetros colorimétricos a\* y b\* entre tratamientos. Para la variable WB, (T1) resultó más tierno que los dos grupos semiextensivos, que resultaron similares entre sí (T2=T3; P=0,0296). Los valores de pH resultaron menores en T3 y superiores en T1 tomando T2 valores intermedios (P=0,0067) sin diferencia significativa. En función de la regiones consideradas, se encontraron diferencias significativas (P<0,05) en L\* (R1=R4<R2=R3), en a\* (R1=R4>R2=R3) y en b\* (R1=R4<R2=R3). Para la variable WB se diferenció R2 respecto a las otras tres (R2>R1=R3=R4; P<0,0001) mientras que para pH, las diferencias resultaron significativas entre las regiones 1 y 4 respecto a 2

y 3 (R1=R4>R2=R3) (P<0,0001). Respecto a las fibras, la distribución para los tipos I, IIA y IIX/B fue: R4=R1>R2=R3 (P=0,0006); R4>R1=R2=R3 (P=0,0047); R3>R1=R4 y R3=R2 (P=0,0006) respectivamente. Las diferencias para AST fueron R1 > R2 = R3 = R4 (P=0,00504). Las diferencias para la DO fueron R4>R1=R2=R3 (P=0.0005).

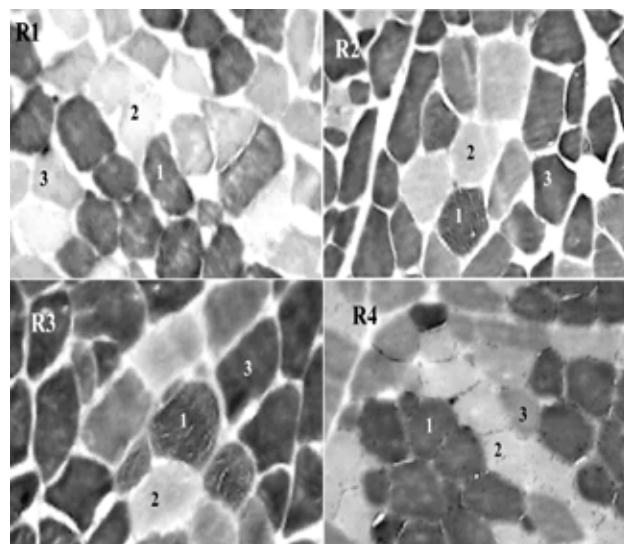


Foto 1. Se indican los tipos de fibra I (1), IIA (2) y IIX/B (3) en cortes transversales de las regiones R1, R2, R3 y R4 del músculo semitendinoso de cerdo (100X), de acuerdo a la reacción de mATPasa pH 4,6.

Photo 1. Cross sections of the semitendinosus muscle regions R1, R2, R3 and R4 showing I (1), IIA (2) and IIX/B (3) fiber types (100X), according to the mATPasa pH 4.6 reaction.

Tabla 1. Parámetros considerados para evaluar la calidad de carne y características de las fibras musculares, según las diferentes regiones musculares y tratamientos productivos.

Table 1. Meat quality traits and fiber characteristics according to different muscle regions and reared systems.

	R1	R2	R3	R4	T1	T2	T3
<b>L*</b>	69,31 <sup>a</sup> (3,44)	83,18 <sup>b</sup> (5,24)	83,96 <sup>b</sup> (4,51)	69,88 <sup>a</sup> (3,23)	75,54 <sup>c</sup> (8,47)	75,76 <sup>c</sup> (7,52)	78,25 <sup>d</sup> 8,19)
<b>a*</b>	19,34 <sup>a</sup> (1,68)	10,41 <sup>b</sup> (1,81)	10,55 <sup>b</sup> (1,99)	20,17 <sup>a</sup> (1,67)	14,89 <sup>c</sup> (5,10)	15,38 <sup>c</sup> (5,00)	15,12 <sup>c</sup> (4,92)
<b>b*</b>	12,87 <sup>a</sup> (2,07)	18,76 <sup>b</sup> (2,38)	19,13 <sup>b</sup> (2,01)	13,33 <sup>a</sup> (1,74)	16,56 <sup>c</sup> (3,74)	16,06 <sup>c</sup> (3,56)	15,48 <sup>c</sup> (3,41)
<b>WB</b>	7,70 <sup>b</sup> (2,25)	9,21 <sup>a</sup> (2,35)	7,90 <sup>b</sup> (2,05)	7,54 <sup>b</sup> (1,80)	7,40 <sup>c</sup> (1,96)	8,06 <sup>d</sup> (2,22)	8,76 <sup>d</sup> (2,25)
<b>pH<sup>24</sup></b>	6,14 <sup>a</sup> (0,24)	5,90 <sup>b</sup> (0,26)	5,95 <sup>b</sup> (0,28)	6,19 <sup>a</sup> (0,25)	6,18 <sup>c</sup> (0,27)	6,06 <sup>cd</sup> (0,29)	5,93 <sup>d</sup> (0,24)
<b>Tipo I</b>	20,75 <sup>a</sup>	7,25 <sup>b</sup>	6,75 <sup>b</sup>	35,5 <sup>a</sup>	16,12 <sup>c</sup>	28,25 <sup>c</sup>	12,94 <sup>c</sup>
<b>Tipo IIA</b>	12 <sup>a</sup>	10,25 <sup>a</sup>	8,5 <sup>a</sup>	23,375 <sup>b</sup>	11,875 <sup>c</sup>	16,375 <sup>c</sup>	12,94 <sup>c</sup>
<b>Tipo IIX/B</b>	39,25 <sup>a</sup>	59,38 <sup>ab</sup>	74,25 <sup>b</sup>	38,88 <sup>a</sup>	59 <sup>c</sup>	51,75 <sup>c</sup>	50,5 <sup>c</sup>
<b>DO<sub>bras</sub></b>	110,18 <sup>a</sup>	87,59 <sup>a</sup>	88,94 <sup>a</sup>	139,94 <sup>b</sup>	109,26 <sup>c</sup>	107,44 <sup>c</sup>	107,76 <sup>c</sup>
	(30,98)	(22,32)	(23,87)	(22,59)	(29,62)	(31,59)	(32,68)
<b>AST<sub>fibras</sub></b>	8372,28 <sup>a</sup>	6056,97 <sup>b</sup>	6241,89 <sup>b</sup>	5281,70 <sup>b</sup>	6637,14 <sup>c</sup>	6047,29 <sup>c</sup>	6634,20 <sup>c</sup>
	(2401,29)	(1752,40)	(1487,44)	(1283,30)	(2039,04)	(1807,00)	(2264,82)

L\* luminosidad, a\* índice de rojo, b\* índice de amarillo, dureza WB, pH<sup>24</sup> medido 24 hs post faena, DO densidad óptica, AST área de sección transversal ( μm<sup>2</sup>). Superíndices idénticos dentro de cada fila indican falta de significación (p>0,05). Entre paréntesis se indican los valores de desvío estándar.



## DISCUSIÓN

Las isoformas de miosina pueden ser un importante atributo en el desarrollo de la calidad de carne, ya que tienen influencia en el metabolismo perimortem (2). Así pueden fundamentarse los resultados obtenidos en este ensayo con respecto a las variables relacionadas con la calidad de carne, en las regiones estudiadas. Investigaciones previas han demostrado que los valores de estas variables en cada uno de los compartimientos, coinciden con las características de las fibras musculares, cuando se consideran músculos típicamente glicolíticos u oxidativos. Con respecto a la luminosidad ( $L^*$ ), ha sido recientemente documentada una correlación con el potencial glicolítico y con el pH 45 minutos, para los cerdos criados en confinamiento y en sistemas semiextensivos (14). Esto coincide con lo observado en el presente trabajo en las regiones glicolíticas (R2 y R3) que presentan menor pH y mayores valores de  $L^*$  con respecto a las regiones oxidativas del M. semitendinoso (R1 y R4). Si bien no hemos determinado el potencial glicolítico, podemos considerar que nuestros resultados son coincidentes con los resultados obtenidos en un reciente estudio (14) ya que el potencial glicolítico está correlacionado con el porcentaje de fibras glicolíticas (15), en este caso mayor en R2 y R3. Sin embargo, en la porción clara del ST de cerdos con dietas bajas en carbohidratos (probablemente R2 y R3 de nuestros resultados), se encontraron menores valores de  $L^*$ , menor valor de  $b^*$  y un valor más alto de pH (16). Esta relación con los carbohidratos de la dieta, probablemente explique nuestras observaciones de  $L^*$  y de pH encontradas en T2 y T3, aunque no disponemos de los valores de carbohidrato de la dieta utilizada. Esta misma relación de valores de  $L^*$ ,  $b^*$  y pH es documentada en el músculo semimembranoso (15), más oxidativo, al compararlo con un músculo glicolítico como el longissimus; los datos obtenidos en el M. semimembranoso podrían corresponderse con los resultados en las regiones más oxidativas del ST (R1 y R4).

Los mayores valores de  $a^*$  en R1 y R4, se corresponden con un mayor porcentaje de fibras oxidativas (I y IIA) (2, 14, 15, 17). Además hacen referencia a la relación positiva de  $a^*$  con el porcentaje de fibras rojas, las isoformas de miosina de tipo I y IIA, y los valores de oxihemoglobina.

En cuanto al pH, el mayor porcentaje de fibras rojas incrementa el nivel de mioglobina y el pH declina más lentamente por lo cual se explica el mayor descenso de pH en R2 y R3 con respecto a R1 y R4 (14). En correspondencia, los menores valores encontrados en R2 y R3 se explican por la mayor tasa y extensión de glicólisis posmortem en estas dos regiones (16).

Si bien no es clara la relación de la terneza instrumental (WB) con las características de

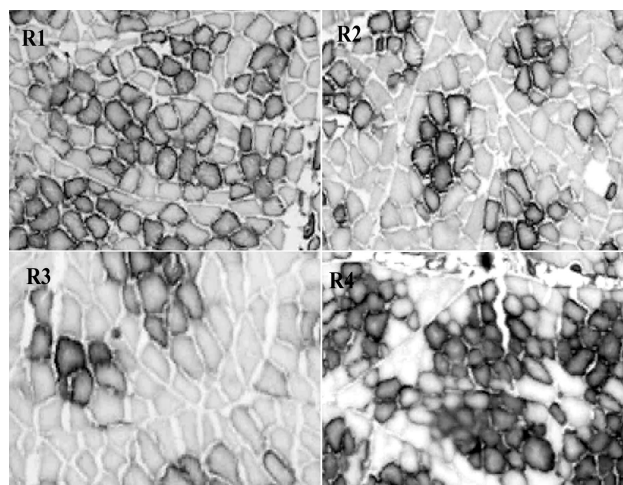


Foto 2. Se muestra la capacidad oxidativa en cortes transversales de las regiones R1, R2, R3, R4 del músculo semitendinoso de cerdo (40X), de acuerdo a la reacción de NADH-TR.

Photo 2. Cross sections of the semitendinosus muscle regions R1, R2, R3 and R4 showing the oxidative capacity (40X), according to the NADH-TR reaction.

las fibras musculares (18), se ha sugerido una correlación positiva entre fibras IIB y diámetro fibrilar con valores de WB (19); nuestros resultados indican mayor valor significativo de WB en R2, probablemente debido a que el mecanismo de calpastatina-calpaína no es el único factor que influye sobre la terneza (18). La falta de homogeneidad entre los subvolumenes del músculo corrobora la necesidad de determinar precisas referencias anatómicas para orientar la obtención de muestras, ya que las conclusiones de WB basadas sobre muestras tomadas en una sola localización no son representativas del músculo en conjunto (20). Además en el presente ensayo, la metodología utilizada no permitió diferenciar entre los tipos de fibras IIX y IIB, lo cual requerirá futuros estudios inmunohistoquímicos.

En general, hay una relación inversa entre el diámetro de las fibras y la capacidad oxidativa (15). Sin embargo, en nuestros resultados, la región significativamente oxidativa R4, no se diferencia en el AST de las regiones glicolíticas, probablemente por el elevado porcentaje de fibras de tipo IIA que contiene.

Desde la aplicación zootécnica, se cita la escasa precisión de conocimientos sobre la estructura de los músculos (21). Algunos autores (19, 22), utilizan una numerosa toma de muestras como metodología para corregir la falta de homogeneidad del músculo en conjunto y evaluar variaciones de calidad de carne, sin seguir un patrón estructural. De acuerdo con nuestro criterio, parece más adecuado y eficiente hacer un muestreo standarizado por compartimiento neuromuscular, ya que estudios previos de arquitectura muscular (7) indican que los comparti-

mientos se componen con fibras musculares con características homogéneas.

Concluimos que la toma de muestras siguiendo la distribución de las ramas primarias de los nervios, es un método apropiado para la estandarización de la toma de muestras, como herramienta de examinación completa de un músculo individual, manteniendo la orientación tridimensional y la relación con las referencias anatómicas.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente estudio fue desarrollado en el marco de los Proyectos UBACYT V803 y G10.

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. Karlsson AH, Klont RE, Fernandez X. Skeletal muscle fibres as factors for pork quality. *Livestock Prod. Sci.* 1999; 60 (2/3): 255-269.
2. Park BY, Kim NK, Lee CS, Hwang YH. Effect of fiber type on postmortem proteolysis in longissimus muscle of Landrace and Korean native black pigs. *Meat Sci.* 2007; 77 (4): 482-491
3. Bruce VL, Turek RJ, Schurg WA. Muscle fibre compartmentalization in the gluteus medius of the horse. *Equine Vet. J.* 1993; 25 (1): 69-72.
4. Roy RR, Powell PL, Kanim P, Simpson DR. Architectural and histochemical analysis of the semitendinosus muscle in mice, rats, guinea pigs, and rabbits. *J. of Morphol.* 1984; 181 (2): 155-160.
5. Kernell D. Muscle regionalization. *Can. J. Appl. Physiol.* 1998; 23 (1): 1-22.
6. Graziotti GH, Palencia P, Delhon G, Rivero JLL. Neuromuscular partitioning, architectural design and myosin fiber types of the muscle vastus lateralis of the llama (*Lama glama*). *J. of Morphol.* 2004; 262 (2): 667-681.
7. Graziotti GH, Rios CM, Rodríguez Menéndez J, Salinas M, Paltenghi Ceschel A, Bosco A, Affricano NO, Victorica C, Basso L. Capacidad metabólica del músculo de cerdo en sistemas confinado/semiextensivo. Estudio preliminar. *Rev. Argent. Prod. Anim.* 2008; 28: En prensa.
8. Quiroz-Rothe E, Rivero JLL. Coordinated expression of myosin heavy chains, metabolic enzymes, and morphological features of porcine skeletal muscle fiber types. *Microsc. Res. and Tech.* 2004; 65 (1-2): 43-61.
9. Graziotti GH, Rodríguez Menéndez JM, Rios MC, Salinas M, Paltenghi Ceschel A, Affricano O, Bosco A, Victorica C, Basso L. Perfil metabólico del músculo semitendinoso del cerdo. *InVet.* 2007; 9 (1): 19-26.
10. Brooke MM and Kaiser KK. Muscle fiber types: how many and what kind?. *Arch. Neurol.* 1970; 23 (4): 369-379.
11. Nwoye L, Mommaerts WFHM, Simpson DR, Sreyderian K, Marusich M. Evidence for a direct action of thyroid hormone in specifying muscle properties. *Am. J. Physiol.* 1982; 242 (3): R401-R408.

12. Blanco CE, Sieck GC, Edgerton VR. Quantitative histochemical determination of succinic dehydrogenase activity in skeletal muscle fibres. *Histochem. J.* 1988; 20 (4): 230-243.
13. Mc Conathy D, Giddings CJ, Gonyea WJ. Structure-function relationships of the flexor carpi radialis muscle compared among four species of mammals. *J. of Morphol.* 1983; 175 (3): 279-292.
14. Kwasiborski A, Sayd T, Chambon C, Santé-Lhoutellier V, Rocha D, Terlouw C. Pig Longissimus lumborum proteome: Part II: Relationships between protein content and meat quality. *Meat Sci.* 2008; 80 (4): 982-996.
15. Gil M, Delday MI, Gispert M, Font i Furnols M, Maltin CM, Plastow GS, Klont R, Sosnicki AA, Carrión D. Relationships between biochemical characteristics and meat quality of Longissimus thoracis and Semimembranosus muscles in five porcine lines. *Meat Sci.* 2008; 80 (3): 927-933.
16. Bee G, Biolley C, Guex G, Herzog W, Lonergan SM, Huff-Lonergan E. Effects of available dietary carbohydrate and preslaughter treatment on glycolytic potential, protein degradation, and quality traits of pig muscles. *J. Anim. Sci.* 2006; 84: 191-203
17. Bérard J, Kreuzer M, Bee G. Effect of litter size and birth weight on growth, carcass and pork quality and their relationship to postmortem proteolysis. *J. Anim. Sci.* 2008; 86 (9): 2357-2368.
18. Sazili AQ, Parr T, Sensky PL, Jones SW, Barsley RG, Buttery PJ. The relationship between slow and fast myosin heavy chain content, calpastatin and meat tenderness in different ovine skeletal muscles. *Meat Sci.* 2005; 69 (1): 17-25.
19. Hu H, Wang J, Zhu R, Guo J, Wu Y. Effect of myosin heavy chain composition of muscles of meat quality in Laiwu pigs and Duroc. *Sci. China Ser C- Life Sci.* 2008; 51 (2): 127-132.
20. Janz JAM, Aalhus JL, Dugan MER, Price MA. A mapping method for the description of Warner-Bratzler shear force gradients in beef Longissimus thoracis et lumborum and Semitendinosus. *Meat Sci.* 2006; 72 (1): 79-90.
21. Gentry JG, Mc Glone JJ, Miller MF, Blanton JR: Environmental effects on pig performance, meat quality and muscle characteristics. *J. Anim. Sci.* 2004; 82 (1): 209-217.
22. Cerisuelo A, Sala R, Nürnberg G, Baucells M, Rehfeldt C. How many muscle samples are required to obtain reliable estimations of muscle fibre characteristics from pig longissimus muscle?. *Meat Sci.* 2007; 76 (3): 583-587.

# CALIDAD MICROBIOLÓGICA DE ALIMENTO CONCENTRADO PARA PERROS ADULTOS QUE SE EXPENDE EN COSTA RICA

M. Herrera M, E. Mena J, C. Rojas S, E. Rodríguez C, C. Chaves U, ML Arias E

Facultad de Microbiología y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica

**Resumen:** El concentrado empacado en bolsa representa uno de los tipos de alimento para perro más utilizados actualmente. Su formulación incluye carne de origen animal como ingrediente mayoritario y un proceso térmico de extrusión, el cual condiciona la flora final predominante. Este tipo de producto, a pesar de su elaboración, está expuesto a muchas fuentes potenciales de contaminación, razón por la cual se decidió evaluar la carga microbiológica presente en 30 muestras expandidas en el Área Metropolitana de Costa Rica, así como estimar el efecto sobre la carga microbiológica que tiene la manipulación del alimento y determinar la presencia de bacterias resistentes a antibióticos. El análisis incluyó el estudio de indicadores de vida útil: recuento total aerobio y anaerobio mesófilo y de hongos y levaduras; indicadores de contaminación: número más probable de coliformes totales (NMP) y NMP de coliformes fecales; un indicador de manipulación: NMP de *Staphylococcus aureus* y la presencia de organismos patógenos: *Listeria sp.* y *Salmonella sp.*, y NMP de *Clostridium perfringens* productor de enterotoxina, todo según metodología estandarizada. Los resultados obtenidos demuestran una baja carga microbiológica en el producto, así como la ausencia de *Salmonella spp.*, y *Listeria monocytogenes*. *Clostridium perfringens* fue aislado de dos muestras, pero ningún aislamiento fue enterotoxigénico. El efecto de la manipulación y almacenaje, así como de la hidratación de los alimentos demuestra un aumento gradual de los recuentos bacterianos. Se aislaron cepas bacterianas resistentes a antibióticos, con idéntico perfil de sensibilidad provenientes de diferentes lotes y marcas del producto. Se concluye que el alimento seco para perro es de buena calidad microbiológica, no obstante se deben realizar más estudios que permitan confirmar la seguridad de éste tanto para los animales como para el ser humano.

**Palabras clave:** alimento concentrado para perro, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, recuentos.

## MICROBIOLOGICAL ANALYSIS OF COMMERCIAL ADULT DOG PELLETS SOLD IN COSTA RICA

**Abstract:** Actually, packed pellets represent one of the most used food sources for dogs. Its formulation includes animal origin meat as mayor ingredient and an extrusion thermic treatment, which conditions the final flora present. This type of product is exposed to several potential sources of contamination, reason why an evaluation of the microbiological load present in 30 different samples sold in the Metropolitan Area of Costa Rica was performed. Also, the effect of manipulation of the product over the microbiological load and the presence of antibiotic resistant bacteria was studied. Analysis included shelf life indicators: total mesophilic aerobic and anaerobic counts, molds and yeasts, contamination indicators: Most Probable Number (MPN) of total and fecal coliforms, a manipulation indicator: *Staphylococcus aureus* MPN, and the presence of pathogenic microorganisms: *Listeria sp.* and *Salmonella spp.* and *Clostridium perfringens* enterotoxin producer MPN, according to standardized methodology. Results obtained show a low microbiological load in the product, and the absence of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes*. *Clostridium perfringens* was isolated from two samples, but none was enterotoxigenic. The effects of manipulation and rehydration of the product show a gradual increase of the bacterial counts. Antibiotic resistant bacterial strains were isolated, with identical resistance patterns coming from different lots and brands of the product. Concluding, dog food pellets have good microbiological quality, nevertheless, further research shall be done in order to confirm the security of the product, for animals and human beings.

**Key words.** Dog food pellets, *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, counts.

Fecha de recepción: 15/05/09

Fecha de aprobación: 10/12/09

**Dirección para correspondencia:** M.L. Arias. Facultad de Microbiología y Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CIET), Universidad de Costa Rica, 2060 San José, Costa Rica.

**E-mail:** mlarias@fcariari.ucr.ac.cr

## INTRODUCCIÓN

Hoy día, uno de los tipos de alimento para perro más utilizados es el concentrado empacado en bolsa, en presentación de figuras compactas. Este producto utiliza carne de origen animal como ingrediente mayoritario, por lo que se considera que es responsable de la calidad final del producto (1); también, conlleva un proceso térmico de extrusión, el cual condiciona la flora normal predominante (2).

Este tipo de producto, a pesar de su elaboración, está expuesto a muchas fuentes potenciales de contaminación; diversos estudios han puesto de manifiesto la presencia de agentes patógenos en él. Strombeck (1) refiere que *Salmonella* sp. es el agente patógeno que se aísla con mayor frecuencia, seguido por *Staphylococcus aureus*. Por otro lado, *Clostridium perfringens* representa la causa más importante de enfermedad entérica clostridial en animales domésticos (3). También, los hongos y levaduras pueden ser aislados con cierta frecuencia, y son capaces de producir micotoxinas que pueden resultar tóxicas para el animal, causando hasta su muerte, como sucedió recientemente en Sudamérica (4). Al respecto, Penido y Pereira (2002) refieren un 12% de positividad por aflatoxinas (n=100) en alimentos para animales obtenidos en Brasil (5).

Por otra parte, varios estudios también han demostrado la presencia de bacterias resistentes a antibióticos en este tipo de producto, incluso se informa de cepas multiresistentes (6). Guardabassi *et al.* (7) demuestran que el uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro en medicina veterinaria ha ayudado a la producción de resistencia a medicamentos como aminopenicilinas combinadas con ácido clavulánico, cefalosporinas y fluoroquinolonas por parte de cepas de *S. intermedius*, *E. coli* y otras bacterias con potencial zoonótico. Además, varios estudios longitudinales de índole veterinaria indican que muchos de los fenotipos resistentes a antibióticos se originaron en hospitales veterinarios, como *S. aureus* meticilina resistentes, enterococos resistentes a vancomicina y *S. typhimurium* DT104 multiresistentes (8).

Lo anterior resulta de suma importancia al considerar la convivencia del ser humano con sus animales de compañía y la posibilidad de transmisión de microorganismos y de sus genes de resistencia (9). Adicionalmente, hay que destacar la poca atención que se le ha dado a las mascotas en la diseminación de bacterias resistentes, comparada con la que se le ha dado a animales y plantas utilizados en la alimentación humana.

Se pretende con este estudio evaluar la carga microbiológica presente en alimento concentrado para perro expendido en el Área Metropolitana de Costa Rica. Se desea estimar el efecto sobre los recuentos bacterianos y fúngicos que

tiene la manipulación del alimento por parte del comprador, así como determinar la presencia de bacterias resistentes a antibióticos y predecir su posible riesgo de diseminación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Origen de las muestras

Se trabajaron tres muestras de diferente lote de cada uno de 10 alimentos para perro adulto, de diferentes marcas nacionales e internacionales, disponibles (en bolsas cerradas) en las veterinarias del país.

Las bolsas fueron almacenadas a temperatura ambiente, en un sitio de baja humedad y protegido de la luz solar directa, hasta su análisis en la sección de Microbiología de Alimentos y Aguas de la Facultad de Microbiología en la Universidad de Costa Rica.

El análisis de las muestras consistió en el estudio de tres indicadores de vida útil: recuento total aerobio y anaerobio mesófilo y el recuento de hongos y levaduras; dos indicadores de contaminación: número más probable de coliformes totales (NMP) y NMP de coliformes fecales; un indicador de manipulación: NMP de *Staphylococcus aureus*; y la presencia de organismos patógenos: presencia de *Listeria* sp. y *Salmonella* sp., y NMP de *Clostridium perfringens* productor de enterotoxina, todo según la metodología descrita en Pouch (10).

## INDICADORES DE VIDA ÚTIL

### 2.1 Recuento total aerobio (RTAM) y anaerobio mesófilo (RTAnM)

Se pesaron 25 g del alimento y se homogenizaron en el Stomacher® con 225 mL de APE (Agua Peptonada Estéril). A partir de esta dilución ( $10^{-1}$ ) se prepararon diluciones decimales utilizando tubos con 9 mL APE. Se inoculó 1 mL de cada dilución en placas petri que fueron recubiertas con agar estándar fundido con 2,3,5 cloruro de trifetil tetrazolium (TTC) 0,5%. Las placas fueron incubadas por 48 h a 35°C en atmósfera aerobia. Para el análisis anaerobio, se realizó el mismo procedimiento pero las placas fueron incubadas en jarras de anaerobiosis.

### 1.2. Recuento de hongos y levaduras (RH<sub>YL</sub>)

Se utilizaron las mismas diluciones preparadas anteriormente y se inoculó 0,1 mL de cada una por esparcimiento en placas de Agar Papa Dextrosa, las cuales fueron incubadas por 4 días a temperatura ambiente.

## 3. INDICADORES DE HIGIENE Y CONTAMINACIÓN

### 3.1 NMP/g de coliformes totales y fecales

Se empleó la técnica de Número Más Probable (NMP) utilizando caldo lactosado simple con campana Durham en la fase de preenriquecimiento (35°C, 48 h), caldo bilis verde brillante (CBVB), incubado 48 h a 35°C para la confirmación de coliformes totales y caldo EC, incubado 24 h a 44,5°C para la confirmación de coliformes fecales.

Los tubos positivos por coliformes totales o fecales fueron rayados en agar sangre para separar las colonias que luego fueron identificadas mediante el sistema miniaturizado API20E® (bioMérieux).

#### **4. INDICADOR DE MANIPULACIÓN**

##### **4.1. NMP/g de *Staphylococcus aureus***

A partir de las diluciones preparadas previamente, se realizó la técnica de NMP para *S. aureus*. Como fase de preenriquecimiento se utilizaron tubos de caldo tripticase soya (CTS) + 10% NaCl los cuales se incubaron 48 h a 35°C, y como medio confirmatorio se utilizó agar Baird Parker el cual se incubó 24 h a 35°C.

Las colonias características fueron identificadas mediante tinción de Gram, pruebas de catalasa, coagulasa y crecimiento en agar Manitol Sal. La identificación definitiva se realizó utilizando el sistema miniaturizado APIStaph® (bioMérieux).

#### **5. PRESENCIA / AUSENCIA DE ORGANISMOS PATÓGENOS**

##### **5.1 Aislamiento de *Listeria sp.***

Se enriqueció 25 g del alimento en 225 mL de caldo *Listeria* y se incubó por 48 h a 35°C; posteriormente se inoculó en agar Oxford, el cual fue incubado 48 h a 35°C. A las colonias sospechosas se les realizó las pruebas de CAMP, xilosa, arabinosa, ramnosa y movilidad a temperatura ambiente para su confirmación.

##### **5.2. Aislamiento de *Salmonella sp.***

Se realizó un preenriquecimiento de 25 g del alimento en 225 mL de Caldo Lactosado Simple (CLS) y se incubó por 24 h a 35°C; posteriormente se realizaron enriquecimientos selectivos en Caldo Selenito (que se incubó por 24 h a 37°C) y en Caldo Tetrionato (que se incubó 24 h a 43°C). Luego del enriquecimiento selectivo se inoculó, por rayado, placas de agar xilosa, lisina, desoxicolato (XLD) y de agar Hecktoen las cuales fueron incubadas 48 h a 35°C. A las colonias sospechosas se les realizó la identificación definitiva con el sistema miniaturizado API20E® (bioMérieux).

##### **5.3. Número Más Probable de *Clostridium perfringens***

Se realizó una fase presuntiva utilizando las diluciones previamente preparadas e inoculándolas en series de tres tubos por dilución de caldo carne picada, anaerobios, prereducidos (PRAS) (11), los cuales fueron incubados a 44°C por 24 h. Los tubos que presentaron turbidez y formación de gas fueron confirmados rayando en placas

de agar oleandomicina polimixina sulfadiazina perfringens (OPSP) las cuales fueron incubadas en anaerobiosis 24 h a 44°C. Las colonias sospechosas fueron confirmadas por las pruebas de Gram, tinción de esporas, doble hemólisis en agar sangre, movilidad y las pruebas rapid ID 32A® (bioMérieux).

##### **5.4 Detección de enterotoxina tipo A de *C. perfringens***

Para la detección de enterotoxina A, cada cepa de *C. perfringens* aislada fue cultivada en caldo carne picada (PRAS) por 24 h a 44°C. Luego, cada tubo fue colocado en baño de agua a 75°C por 20 min y subcultivado en caldo modificado de Duncan y Strong (PRAS) por 96 h a 35°C. Posteriormente, se realizó la prueba de detección utilizando un kit de aglutinación de látex pasiva reversa (PET\_RPLA®, Oxoid) (12)

#### **6. EFECTO DEL ALMACENAJE, MANIPULACIÓN E HIDRATACIÓN DEL ALIMENTO**

Una vez obtenidos y analizados los resultados anteriores se escogieron dos muestras: aquella con el recuento más bajo y otra con el recuento más alto y se repitieron las pruebas, pero tres meses después de haber abierto el empaque y de haber realizado el primer análisis. Se verificó que la fecha de caducidad fuera posterior al análisis; el alimento fue almacenado en un recipiente plástico cerrado no hermético, a temperatura ambiente. Las muestras fueron evaluadas por indicadores de vida útil, manipulación e higiene. Además se pesaron 25 g de cada uno de los alimentos y se colocaron en un recipiente limpio con una taza de agua de tubo, como recomiendan muchas de las casas fabricantes. Se dejó a temperatura ambiente durante una hora y después se realizaron las pruebas descritas anteriormente.

#### **7. PRUEBA DE SENSIBILIDAD A LOS ANTIBIÓTICOS (PSA)**

Se seleccionó al azar una submuestra de coliformes totales y de las bacterias patógenas (30%) con el fin de someterlas a la prueba de sensibilidad a los antibióticos, por el método de difusión de Kirby-Bauer en agar Müeller Hinton (13). Se utilizaron como cepas control las cepas de *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Los antibióticos se seleccionaron de acuerdo con el tipo de bacteria aislada según tablas establecidas.

#### **RESULTADOS**

Como parámetro de comparación de este tipo de producto, se utilizó la norma de la Dirección General de Salud Ambiental de Perú (14) donde se establece como límites máximos

permisibles un recuento de aerobios mesófilos hasta  $1,0 \times 10^4$  UFC/g; de hongos y levaduras hasta  $1,0 \times 10^2$  UFC/g; de coliformes totales hasta  $10^1$  NMP/g y ausencia de *Salmonella* en 25 g de alimento.

Los recuentos totales aerobios, anaerobios mesófilos y de hongos y levaduras, así como los NMP/g de coliformes totales y fecales se detallan en la tabla 1. Según lo anterior, tres de los alimentos (10%) (alimento 2, lotes A y C, alimento 6, lote C) presentaron recuentos totales de aerobios mesófilos ligeramente mayores al límite superior para este tipo de alimento; el 63% de las muestras presentó un recuento total anaerobio inferior a  $10^2$  UFC/g. Con respecto al recuento de hongos y levaduras, 15 (50%) de las muestras presentaron recuentos superiores al límite establecido. Todas las muestras analizadas fueron negativas por la presencia de *Salmonella* sp. y *Listeria* sp. Con respecto a *C. perfringens*, únicamente se detectó en dos muestras (6,7%) (alimento 5, lote B y alimento 9, lote A) y ninguno de los aislamientos fue enterotoxigénico.

El efecto de la manipulación y almacenaje, así como de la hidratación de los alimentos seleccionados se puede apreciar en la tabla 2, donde se observa un aumento gradual del RTAM así como del RHyL.

A partir del 30% de aislamientos tomados al azar, se identificaron las especies *Klebsiella pneumoniae* spp. *pneumoniae*, *Enterobacter sakazakii* y *Staphylococcus aureus*. La prueba de sensibilidad a los antibióticos para *K. pneumoniae* demostró resistencia a ampicilina, ticarcilina y nitrofurantoína. Sólo un aislamiento de *E. sakazakii* mostró resistencia a cefotaxime. Dos de las cepas de *S. aureus* aisladas presentaron resistencia a penicilina, ampicilina, eritromicina y al imipenem.

## DISCUSIÓN

Las bacterias presentes en el producto analizado son consideradas como parte de su flora normal y la mayoría de los recuentos no superaron el umbral estipulado en la norma utilizada.

Todas las muestras analizadas presentaron RTAM por debajo del límite de detección con excepción de tres lotes, dos de ellos de la misma marca de alimento. Estas excepciones pueden indicar fallas en el proceso de manufacturación, en el empaquetado o en el almacenamiento del producto hasta su análisis. Las fallas de manufactura se dan especialmente cuando el alimento no alcanza una humedad menor del 10% debido a una mala extrusión, un mal secado o empaquetado (2).

Tal y como era de esperar, el RTAM fue bajo en la mayoría de las muestras pues la manufactura y almacenamiento del producto no favorece a esta población. No obstante, la importancia de este análisis estriba en mostrar

que probablemente el proceso de extrusión fue lo suficientemente efectivo como para disminuir las bacterias anaerobias esporuladas presentes.

Un buen número de los RHyL (50% de los lotes) fueron superiores al umbral aceptado de  $10^2$  UFC/g, por lo que se esperaría que la mayor parte del deterioro que sufre el alimento sea a causa del metabolismo de estos organismos. Ante esta situación, no se puede dejar por fuera la potencial presencia de micotoxinas y su efecto, tal y como ha sido descrito en el trabajo de Penido y Pereira (5), quienes informan un 12% de positividad para aflatoxinas en muestras de alimentos secos para mascotas, y el estudio de Purina donde se describe el impacto de aflatoxinas en gatos y perros en Sudamérica (4).

Con respecto a *S. aureus* como indicador de manipulación, únicamente se detectó en tres muestras (10%) lo cual demuestra un buen manejo del producto. Sin embargo, esta bacteria ha sido asociada con enfermedad alimentaria en animales por lo que representa un potencial riesgo para ellos.

Con respecto a los indicadores de higiene y contaminación, únicamente una muestra superó el umbral de 10 NMP/g para coliformes totales y sólo una muestra presentó coliformes fecales. No obstante, la presencia de materia fecal es inaceptable en un alimento ya que conlleva el riesgo de transmisión de bacterias y virus patógenos entéricos.

En este estudio no se logró aislar *Salmonella* spp. ni *Listeria monocytogenes*, probablemente porque son termosensibles y son eliminadas de la materia prima durante la extrusión y el manejo fue adecuado, tal como se señaló anteriormente.

Con respecto a *C. perfringens*, su porcentaje de aislamiento fue bajo (6,7%), lo cual se podría explicar con base en un procesamiento térmico adecuado durante la extrusión o a la presencia de preservantes en el alimento, especialmente antioxidantes artificiales, los cuales son, generalmente, compuestos fenólicos (15) que tienen una probada actividad antimicrobiana contra bacterias Gram positivas (16).

Tal y como se señaló, la detección de enterotoxina de *C. perfringens* fue negativa en las dos cepas aisladas, que se puede explicar por el hecho de que el gen que codifica por ésta (cpe) es difícilmente encontrado en cepas aisladas del ambiente (17); además, se informa que únicamente 5-6% de los aislamientos globales portan este gen (16). Incluso, en un estudio realizado por Yuan Tong y Labbé (18), de 40 muestras de alimentos positivas por *C. perfringens* tipo A, ninguna portaba el gen cpe ni la enterotoxina mencionada. Sin embargo, debe considerarse la posibilidad de que en los aislamientos realizados pudieran presentarse a la vez, tanto cepas enterotoxigénicas como no enterotoxigénicas (19).

En cuanto al efecto de la manipulación del alimento en los recuentos se puede observar una tendencia al aumento con el transcurrir del tiempo de exposición al aire. El mismo comportamiento se presenta cuando se da el humedecimiento del producto, por lo que si contiene algún microorganismo patógeno, éste podría aumentar y alcanzar eventualmente su dosis infectante.

Los alimentos para mascotas representan un vehículo poco investigado para transmisión de patógenos y fenotipos de resistencia al hombre, no obstante, la flora de la mascota depende en gran medida de su alimentación, por lo que la comida de perro afecta indirectamente la flora de su dueño. El propósito de realizar la prueba de PSA fue conocer la posible resistencia a los antimicrobianos presente en las cepas aisladas. A partir del análisis realizado, se destaca el aislamiento de cepas de *K. pneumoniae* con moderada resistencia a antibióticos de uso frecuente, pero más importante aún, con idéntico perfil de sensibilidad a partir de diferentes lotes y marcas de alimento, lo que permite suponer el uso de una misma materia prima contaminada.

Estudios hechos por Molbak (8) demuestran que el aumento en la prevalencia de la resis-

tencia a antibióticos en las bacterias comensales o patógenas de animales es indicadora del uso desmedido de antibióticos en medicina veterinaria. El impacto que tiene el uso de antibióticos como promotores de crecimiento (en algunos casos puede aumentar 4-5% del peso de un animal) ha sido extensamente estudiado en animales para consumo humano (20), pero no así en mascotas. Dentro de los pocos estudios que hay referidos a animales de compañía, se reporta también un excesivo uso, especialmente de cefalosporinas y fluoroquinolonas (21), drogas considerados por FDA (Food and Drug Administration) de los Estados Unidos como críticamente importantes para el uso humano y el surgimiento de resistencias debe ser evitado al máximo (9).

De los resultados obtenidos, se puede concluir que el alimento seco para perro es de buena calidad microbiológica, probablemente debido a su baja disponibilidad de agua y a que es sometido a un proceso de cocción a alta temperatura, lo que compensa en cierta medida la baja calidad de la materia prima y la poca estandarización de los procesos de producción.

También, se hace evidente la escasa información que existe sobre el tema en publicaciones

Tabla 1. Análisis microbiológico de alimento concentrado para perros adultos que se expenden en Costa Rica.

Microbiological analysis of commercial adult dog pellets sold in Costa Rica.

		RTAM		RHyL	NMP de <i>S. aureus</i>	NMP de coliformes totales (NMP/g)	NMP de coliformes fecales (NMP/g)
	Lote	(UFC/g)	RTAnM	(UFC/g)	(NMP/g)		
1	A	$2,0 \times 10^1$	$6,1 \times 10^2$	$2,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$7,0 \times 10^2$	$1,5 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	4	< 3
	C	$7,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$1,1 \times 10^4$	< 3	< 3	< 3
2	A	$5,0 \times 10^4$	$8,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$4,9 \times 10^2$	$6,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$1,1 \times 10^4$	$5,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
3	A	$3,6 \times 10^2$	$4,5 \times 10^1$	$1,0 \times 10^3$	< 3	< 3	< 3
	B	$8,1 \times 10^3$	$6,8 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$1,7 \times 10^3$	$4,8 \times 10^2$	$3,3 \times 10^4$	< 3	< 3	< 3
4	A	$6,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$8,0 \times 10^2$	9	4	< 3
	B	$1,2 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$9,0 \times 10^1$	$8,1 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
5	A	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$7,0 \times 10^1$	$9,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$2,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
6	A	$7,5 \times 10^3$	$1,0 \times 10^1$	$4,0 \times 10^4$	< 3	9	< 3
	B	$3,6 \times 10^3$	$2,7 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	< 3	< 3	< 3
	C	$8,3 \times 10^4$	$4,9 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	43	< 3
7	A	$1,2 \times 10^3$	$3,7 \times 10^1$	$1,0 \times 10^3$	< 3	4	< 3
	B	$4,4 \times 10^2$	$5,8 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$3,3 \times 10^2$	$4,2 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	4	4
8	A	$4,0 \times 10^1$	$7,0 \times 10^1$	$5,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$1,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$5,0 \times 10^3$	$2,6 \times 10^2$	Inc	4	< 3	< 3
9	A	$6,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	$6,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$3,7 \times 10^2$	$6,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$5,3 \times 10^2$	$9,1 \times 10^1$	$4,0 \times 10^2$	7	9	< 3
10	A	$9,0 \times 10^1$	$2,9 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	B	$2,5 \times 10^2$	$1,0 \times 10^1$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	C	$8,0 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3

**Tabla 2.** Efecto de la manipulación y almacenaje del alimento para perro con respecto a los recuentos microbiológicos realizados

Effect of manipulation and storage of dog food according to the microbiological counts realized.

Alimento	Condición	RTAM (UFC/g)	RHyL (UFC/g)	NMP de <i>S. aureus</i>	NMP de coliformes totales	NMP de coliformes fecales
1	Seco	$6,6 \times 10^2$	$1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
	Húmedo	$3,3 \times 10^3$	$1,0 \times 10^2$	< 3	< 3	< 3
2	Control	$7,5 \times 10^3$	$4,0 \times 10^4$	< 3	4	< 3
	Seco	$9,0 \times 10^3$	$1,0 \times 10^3$	4	4	4
	Húmedo	$1,2 \times 10^4$	$1,7 \times 10^4$	9	4	4

formales, por lo que hace falta nuevos estudios relacionados con la detección de organismos patógenos para el hombre y para los animales; de toxinas presentes en el alimento y el potencial de transmitir al ser humano cepas resistentes a diversos antibióticos y capaces de producir enfermedad.

## REFERENCIAS

1. Strombeck D. The question of Bacteria in Processed Pet Foods. Animal Protection Institute (API) for AAFCO (Association of American Feed Control Officials). Pet Food Committee 2001.
2. Barrios A, Quincke D, Bayley L & Colombi G. Alimento balanceado para perros. Montevideo, Uruguay: Editorial de la Universidad Católica de Uruguay. 2002; p. 19-21.
3. Walker P. *Clostridium*. En: Carter G y Cole J., editores. Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and micology. Academic Press. California. EEUU, 1990; p 229-251.
4. PURINA. NESTLÉ S.A. de Venezuela. 2005. Sitio oficial: [www.purina.com.ve/comunicado](http://www.purina.com.ve/comunicado) Consultado septiembre del 2007.
5. Penido P & Pereira M. Occurrence of aflatoxins B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> in some Brazilian pet foods. Food Addit. Contam. J. 2002; 19: 1180-1183.
6. White D, Datta A, McDermott P, Friedman S, Qaiyumi S, Ayers S, English S, Wagner D. & Zhao S. Antimicrobial susceptibility and genetic relatedness of *Salmonella* serovars isolated from animal-derived dog treats in the USA. J. Antimic. Chemoth 2003; 52: 860-863.
7. Guardabassi L, Schwarz S & Lloyd D. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. J. Antimic. Chemoth 2004; 54: 321-332.
8. Molbak K. Spread of Resistant Bacteria and Resistance Genes from Animals to Humans. The Public Health Consequences. J. Vet. Med 2004; 51: 364-369.
9. Heuer O, Vibeke F & Hammerum A. Antimicrobial Drug Consumption in Companion Animals. CDC Emerg. Infec. Dis. J 2005; 11: 46-54.
10. Pouch F. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington, APHA 2001.
11. Holdeman, LV, Cato EP & Moore WEC. Anaerobe Laboratory Manual. 4<sup>th</sup> ed. Blacksburg: Virginia Polytechnic Institute and State University 1977.
12. Sakagushi G, Uemura T & Riemann H. Simplified method for purification of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. J. Appl. Microbiol 1973; 26: 762.767.
13. Munro M. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington. ASM Press 1995.
14. DIGESA. Normativa de criterios microbiológicos de calidad sanitaria e inocuidad para los alimentos y bebidas de consumo humano. Codex Alimentario del Perú RM n° 615 2003.
15. Hillestad K. Antioxidants as preservatives in dog food. Pet Education 1998.
16. Raccach M. The antimicrobial activity of phenolic antioxidants in foods: a review. J. Food Safety 1984; 6: 141-170.
17. Van Damme-Jongsten M, Wernars K. & Notermans S. Cloning and sequencing of the *Clostridium perfringens* enterotoxin gene. J. Microb 1989; 56: 181-190.
18. Yuan-Tong L & Labbé R. Enterotoxigenicity and genetic relatedness of *Clostridium perfringens* isolates from retail foods in the United States. Appl. Environ. Microbiol 2003; 69: 1642-1646.
19. Garcia-Alvarado JS, Labbé RG & Rodríguez MA. Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A at 37 and 43°C. Appl. Environ. Microbiol 1992; 58: 1411-1414.
20. Salyers A. Agricultural use of antibiotics and antibiotic resistance in human pathogens: Is there a link? ROAR II, Alliance for a Prudent Use of Antibiotics. [www.apua.com](http://www.apua.com) Consultado setiembre del 2007.
21. DANMAP. Consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from food animals, food and humans in Denmark. Danish Zoonosis Center, Danish Veterinary Laboratory. DANMAP . 1997.



## **ESTUDIO DE LA INTERFERENCIA CAUSADA POR *Mycoplasma pulmonis* EN RATONES DE LA CEPA N:NIH (S)-Fox1nu TRANSPLANTADA CON LA LÍNEA TUMORAL HUMANA A549**

**Milocco S, Carriquiriborde M, Laborde J, Ayala M,  
Cagliada M, Carbone C**

Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio, Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Nacional de La Plata

**RESUMEN:** Entre las cepas de ratones inmunodeficientes disponibles en Argentina se encuentra la N:NIH (S)-Fox1nu. Se utiliza fundamentalmente como modelo animal para el trasplante de tumores humanos. Estos ratones se producen bajo estrictas barreras sanitarias y deben estar libres de sus patógenos específicos; uno de los más frecuentes es *Mycoplasma pulmonis* que afecta el aparato respiratorio, genital, oído medio y articulaciones. El objetivo de este trabajo fue evaluar la interferencia que causa *Mycoplasma pulmonis* en ratones N:NIH (S)-Fox1nu transplantados con la línea tumoral humana A549. Cuarenta ratones hembra N:NIH (S)-Fox1nu de 4 a 6 semanas se dividieron en cuatro grupos (G) de 10 animales cada uno: G1, transplantados con la línea tumoral A549; G2, inoculados con *Mycoplasma pulmonis*; G3, transplantados con la línea tumoral e inoculados con *Mycoplasma pulmonis* y G4 control. Siete de los 10 animales del G1 presentaron crecimiento tumoral, los ratones de los G2 y G3 murieron durante los 6 primeros días p.i, la necropsia mostró lesiones en pulmón, el G4 no presentó lesiones. Se concluyó que las infecciones por *Mycoplasma pulmonis* son fatales en ratones N:NIH (S)-Fox1nu, interfiriendo en los resultados, debiendo estar ausente de estas colonias.

**Palabras claves:** ratones nude, *Mycoplasma pulmonis*, línea tumoral

## **STUDY OF THE INTERFERENCE CAUSED BY *Mycoplasma pulmonis* IN IMMUNODEFICIENT N:NIH (S)-Fox1nu MICE TRANSPLANTED WITH THE HUMAN TUMOR LINE A549**

**ABSTRACT:** N:NIH (S)-Fox1nu is one of the immunodeficient mice strains available in Argentina. It is mainly used for human tumors transplantation. These mice must be kept under strict barrier systems and should be free of specific pathogens infections. One of the frequent contaminations is caused by *Mycoplasma pulmonis*, it affects the respiratory and genital tract and produces otitis and arthritis. The objective of this study was to evaluate the interference produced by *Mycoplasma pulmonis* in N:NIH (S)-Fox1nu mice transplanted with the human tumor line A549. Forty female N:NIH (S)-Fox1nu mice 4-6 weeks old were divided into four groups (G) each of 10 animals. G1 transplanted with the tumor line A549; G2 inoculated with *Mycoplasma pulmonis*, G3 transplanted with the tumor line and inoculated with *Mycoplasma pulmonis* and G4 control. Seven mice from G1 showed tumor growth, mice from G2 and G3 died within the six days after the infection and there were found lung lesions during the necropsy, in G4 no lesions were observed. It was concluded that *Mycoplasma pulmonis* should be considered a fatal infection in nude mice. This microorganism produces interferences in the results, consequently it must be absent in these colonies.

**Key words:** Nude mice, *Mycoplasma pulmonis*, tumor cell line

Fecha de recepción: 15/05/09

Fecha de aprobación: 10/12/09

**Dirección para correspondencia:** S. Miloco, Cátedra de Animales de Laboratorio. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

**E-mail:** [@fcv.unlp.edu.ar](mailto:@fcv.unlp.edu.ar)

## INTRODUCCION

Actualmente, se dispone de una variada cantidad de cepas de ratones que se utilizan para distintos fines experimentales, las cuales se pueden dividir en dos grandes grupos de acuerdo con su condición inmunológica: inmunocompetentes e inmunocomprometidas. Los ratones pertenecientes a esta última categoría son muy importantes ya que se emplean en estudios oncológicos, por no rechazar los trasplantes de tumores de otras especies, especialmente los humanos (1). Entre las cepas inmunodeficientes disponibles en Argentina se encuentra la N:NIH (S)-*Fox1nu*, a partir de ahora *nude*, que se produce en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP) y que se utiliza como modelo animal para el trasplante de tumores humanos (2). Estos ratones, por sus características, se mantienen bajo estrictas barreras sanitarias para evitar que se infecten con microorganismos específicos (3).

La calidad de los animales que se destinan a la investigación científica debe estar definida desde el punto de vista microbiológico. Esto se rige por normativas internacionales (4) mediante un listado de microorganismos que deben estar ausentes de las colonias de ratas y ratones (5), especialmente en los inmunocomprometidos. Entre los patógenos que infectan más frecuentemente a estas especies están los que afectan el aparato respiratorio. El agente etiológico que causa más inconvenientes de este tipo a nivel mundial es *Mycoplasma pulmonis* el cual produce pérdidas millonarias tanto en la industria farmacéutica como en los centros de investigación.

*Mycoplasma pulmonis* es una bacteria Gram negativa, pleomórfica, de 200 a 300 nm de diámetro y carece de pared celular. Crece en medios de cultivo enriquecidos y es muy sensible al calor, la desecación, a desinfectantes y no sobrevive fuera del organismo vivo (6, 7). No afecta al hombre ni a otros roedores, las únicas especies susceptibles son la rata y el ratón, en estos animales no sólo afecta el tracto respiratorio sino que suele infectar el aparato genital femenino produciendo reabsorción embrionaria, puede también ser causa de artritis y otitis media. La vía de contagio es por aerosoles y si la vagina de la hembra está colonizada por esta bacteria, los animales se infectan al nacer. Cuando el microorganismo ingresa por las vías aéreas se adosa a las células epiteliales del tracto respiratorio fijándose a la membrana celular. En estos casos los animales menores de tres meses no presentan síntomas debido a que la carga bacteriana en esta vía de contagio es pobre y por esta razón los signos clínicos de la enfermedad tardan en aparecer. En ratones la enfermedad tiende a ser más severa que en ratas, causa neumonía aguda

y si el animal sobrevive desarrolla bronconeumonía crónica (8, 9).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la interferencia que provoca una infección con *M. pulmonis* en ratones inmunocomprometidos o inmunodeficientes de la cepa *nude* trasplantados con la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549.

El presente trabajo fue realizado respetando las normativas internacionales para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (10, 11).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Animales

Se utilizaron 40 ratones hembras de la cepa N:NIH (S)-*nu*, libres de patógenos específicos (SPF) de 4 a 6 semanas de edad producidos bajo estrictas barreras sanitarias en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la U.N.L.P.

Durante la experiencia los animales se alojaron en microaisladores con lecho de viruta estéril en una cabina ventilada y filtración absoluta de aire a través de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air), en condiciones ambientales controladas: temperatura 23+/-1°C, humedad 50-55%, iluminación 12 h luz/ 12 h oscuridad; se les suministró alimento balanceado (Cargil) y agua autoclavados, *ad libitum*. Los cambios de lecho se realizaron dos veces por semana (12).

### Células Tumorales

La línea celular A549 se mantiene desde hace dos años en nuestro laboratorio a través de trasplantes subcutáneos sucesivos en ratones hembras homocigotas de la cepa N:NIH (S)-*nu*, de donde se obtuvieron las células para realizar la experiencia.

### Trasplante tumoral

Las células tumorales se transplantaron por vía subcutánea, según el protocolo del diseño experimental, en los ratones anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg, i.p.), realizando una incisión en la piel laxa del cuello con un trócar.

### Microorganismo

Se utilizó la cepa de *Mycoplasma pulmonis* perteneciente al cepario de la Cátedra de Animales de Laboratorio de FCV-UNLP, una suspensión de esta bacteria se sembró en caldo PPLO (Lab. Britania, Los Patos, Argentina), se incubó a 37 °C durante 7 días, se realizó el recuento de bacterias repicando 0,1 ml en placas de agar PPLO (Lab. Britania, Los Patos, Argentina) incubándolas bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura con el agregado de un 5 % de CO<sub>2</sub> (6, 7, 13), se contaron las colonias por placas y se determinó una concentración bacteriana de 10<sup>6</sup> UFC/ml, luego se fraccionó en cada tubo de centrifuga 1 ml de la suspensión del caldo PPLO, se centrifugó

a 10000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se utilizó para realizar las inoculaciones por vía intranasal.

### Diseño experimental

Los ratones se dividieron en 4 grupos de 10 animales cada uno.

Grupo 1: ratones con trasplante tumoral únicamente. Cuando los tumores alcanzaron un tamaño de 9 x 12 mm los ratones se sacrificaron y se les extrajo el tumor para realizar los estudios histopatológicos correspondientes.

Grupo 2: ratones inoculados con una suspensión de *M. pulmonis* en una concentración bacteriana de 10<sup>6</sup> UFC/mL por vía intranasal

Grupo 3: animales con trasplante de tumor e inoculados con *M. pulmonis* con una concentración bacteriana de 10<sup>6</sup> UFC/ml por vía intranasal.

Grupo 4: grupo control inoculados con solución fisiológica. Estos animales se sacrificaron a los 10 días PI y se les realizó la necropsia.

Todos los animales se sacrificaron con una mezcla de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> (14).

Todos estos procedimientos se realizaron siguiendo las recomendaciones para el uso de ratones en investigaciones científicas sobre el cáncer del Canadian Council on Animal Care (CCAC) (10).

### RESULTADOS

Siete de los 10 animales del grupo 1 presentaron crecimiento tumoral a los 9 días post-inoculación.

Todos los ratones de los grupos 2 y 3 murieron dentro de los primeros 6 días post-inoculación, no habiéndose podido confirmar el crecimiento tumoral. Al realizarles la necropsia se observaron lesiones pulmonares macroscópicas.

Los ratones del grupo control no presentaron ninguna lesión.

### DISCUSIÓN

Todos los animales inoculados con *M. pulmonis* murieron dentro de los 6 días P.I, por lo tanto las infecciones con este microorganismo se pueden considerar fatales, no habiéndose observado diferencias en las respuestas entre los animales con o sin tumor. Se concluyó que *M. pulmonis* es un microorganismo que interfiere en las pruebas produciendo una enfermedad aguda que desemboca en la muerte de los ratones de las cepas inmunodeficientes por lo cual en las investigaciones en las que se los utilizan como modelo, este microorganismo debe estar ausente de la colonia.

### BIBLIOGRAFIA

1. Dooley, TP, Stamp-Cole, M. and Ouding, R. Evaluation of a *Nude* Mouse Tumor Model Using  $\beta$ -Galactosidase-expressing Melanoma Cells. *Lab Anim Sci.* Vol. 1993, 43 (1): 48-57.

2. Martín Carriquiriborde, Silvana N. Milocco, Guido Principi, Pilar Cagliada, Cecilia Carbone. *Pasteurella pneumotropica* causa la regresión de tumores humanos trasplantados en ratones inmunodeficientes. *Revista Medicina (Buenos Aires)*. 2006, 66: 242-244.

3. Flynn RJ, Brennan PC, Fritz TE. Pathogen Status of commercially produced laboratory mice. *Lab. Anim. Care.* 1965, 15: 440-448.

4. Kraft V, Deeny AA, Blanchet HM, Boot R, Hannsen AK, Hem A, von Herck H, Kunstyr I, Milite G, et al. Report of the FELASA Working Group on Animal Health: Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit breeding colonies. *Laboratory Animals.* 1994, 28 (1): 1-12.

5. Won YS, Jeong ES, Park HJ, et al. Microbiological contamination of laboratory mice and rats in Korea from 1999 to 2003. *Exp Anim.* 2006, Jan;55(1):11-6.

6. Axel Fornerup Hansen. *Handbook of Laboratory Animal Bacteriology*, CRC Press LLC. 2000.

7. Williams & Wilkins. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, USA. 1984.

8. Fonseca-Aten M, Rios AM, Mejias A, Chavez-Bueno S, Katz K, Gomez AM, McCracken GH Jr, Hardy RD. *Mycoplasma pneumoniae* induces host-dependent pulmonary inflammation and airway obstruction in mice. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005, 32(3):201-210.

9. Weisbroth S.H., Beker H.J. Lindsey, R.J. 1979. *Bacterial and micotic diseases. The Laboratory Rat. Vol I.* New York. Academic Press.

10. Canadian Council on Animal Care "Guide to the care and use of experimental animals". CCPA, Manual Vol. 1. (2nda edición) 1998: Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. 1999. Copyright National Academy Press, Washington, D.C. 1996

11. Hume CW. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals.* UFAW. 5<sup>ta</sup> Edición. UFAW. Great Britain by T. & A. Constable Ltd., Edinburgh. 1976, 16: 172-192.

13. *Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals.* NIH publication USA. 1986.

14. American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) "Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals", Columbia Inn, Columbia, MD, 1990.

## ACTIVIDAD ANTILISTERIA DE BACTERIAS ÁCIDO LÁCTICAS AISLADAS DE PECES MARINOS

Vallejo M<sup>1</sup>, Olivera N<sup>2</sup>, Sequeiros C<sup>2</sup>, Marguet E<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Biología Celular y Molecular, Facultad de Ciencias Naturales (Sede Trelew)  
Universidad Nacional de la Patagonia San Juan Bosco

<sup>2</sup>Centro Nacional Patagónico. CONICET. Pto. Madryn-Chubut.

**Resumen:** Con el propósito de caracterizar el efecto inhibitorio contra *Listeria monocytogenes*, se estudiaron 53 cepas de bacterias ácido lácticas (BAL) aisladas de peces marinos. Sobre la base de la actividad antilisteria se seleccionaron 5 cepas que posteriormente se identificaron por secuenciamiento de ARNr 16S. Dos cepas fueron identificadas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, dos como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y la restante como *Lactobacillus sakei*. En todos los casos, después de la neutralización con NaOH y tratamiento térmico (100 °C, durante 5 min, 121 °C durante 5 min) el efecto antagonista de los caldos libres de células se mantuvo activo. La actividad enzimática de lisozima, lipasa y catalasa no inhibió el efecto antimicrobiano. Por el contrario, se observó la supresión completa de la actividad inhibitoria después del tratamiento con tripsina, confirmando por esta manera la naturaleza proteica del agente activo. Las características bioquímicas y fisicoquímicas de los agentes antilisteria producidos por las BAL seleccionadas sugieren que la actividad del antagonista es llevada a cabo por sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas (SITB). La estabilidad a los tratamientos térmicos y la actividad antilisteria exhibidas por las SITB estudiadas, las hace útiles para el uso en tecnologías de procesamiento de pescados y en la aplicación para el control en seguridad alimentaria.

**Palabras clave:** peces marinos, *Listeria monocytogenes*, bacterias ácido lácticas

## ANTILISTERIAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM MARINE FISH

**Abstract:** In order to characterize inhibitory effect against *Listeria monocytogenes*, 53 strains of lactic acid bacteria (LAB) isolated from marine fish were studied. On the basis of antilisterial activity, 5 strains were selected and further identified by 16S rRNA sequencing. Two strains were identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, two as *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* and the remaining as *Lactobacillus sakei*. In all cases, after neutralization with NaOH and heat treatment (100 °C for 5 min, 121 °C for 5 min) the antagonist effect of the cell-free broth remained active. The enzymatic activity of lysozyme, lipase and catalase did not inhibit the antimicrobial effect. On the other hand, complete suppression of inhibitory activity was observed after treatment with trypsin, confirming by this way the proteinaceous nature of the active agent. The biochemical and physicochemical characteristics of antilisterial agents produced by the selected LAB suggest that the antagonist activity is carried out by bacteriocin-like inhibitory substance (BLIS). The heat treatment stability and antilisterial activity exhibited by the BLIS studied, makes them useful for applications in fish processing technologies and food safety control applications.

**Key words:** marine fish, *Listeria monocytogenes*, lactic acid bacteria

Fecha de recepción: 20/05/09

Fecha de aprobación: 10/12/09

**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

*Listeria monocytogenes* está ampliamente distribuida en la naturaleza y es un frecuente contaminante de alimentos (1, 2). Tiene la capacidad de infectar y reproducirse en el citoplasma de diversos tipos de células lo que le permite atravesar las barreras intestinal, meníngea y placentaria (1). Su habilidad para tolerar amplios rangos de pH, temperatura y concentración de sales constituye una propiedad que facilita la colonización de una gran variedad de alimentos como carnes, leche, vegetales, pescados y sus respectivos derivados (3, 4).

Esta bacteria ha sido la causa del aumento de enfermedades transmitidas por alimentos, especialmente en niños, ancianos y pacientes inmunocomprometidos. La listeriosis puede considerarse de baja frecuencia, sin embargo su tasa de mortalidad es alta, siendo responsable de aproximadamente la tercera parte de las muertes atribuidas a patógenos de origen alimentario (5).

En el ámbito marino, especialmente en sus estuarios, tanto como en peces se ha detectado una alta ocurrencia de miembros del género *Listeria* (8, 9). Si bien se ha demostrado que la carga bacteriana de los peces es baja, debe tenerse en cuenta que las características fisiológicas particulares de este patógeno permiten que se adapte a condiciones poco favorables y en consecuencia su número se eleva en forma frecuente después de la captura y procesos posteriores de manipulación (6,7). Esta situación crea un problema adicional debido a que *Listeria monocytogenes* no sólo puede colonizar el equipamiento utilizado en las plantas de procesamiento de pescado (8, 9, 10) sino que exhibe una gran resistencia a los más severos tratamientos de lavado y desinfección (8). Se ha demostrado que las cepas que colonizan y persisten bajo estas condiciones son genéticamente similares (11).

La situación expuesta sugiere la necesidad de buscar métodos alternativos que puedan mejorar la eficiencia de los procesos de desinfección en plantas procesadoras de pescado (12, 13). Durante los últimos años se ha intensificado el estudio de bacterias ácido lácticas (BAL), poniendo especial interés en la búsqueda de cepas productoras de metabolitos con capacidad antibiótica (14, 15). Las BAL se utilizan como fermentos en la industria láctea y es posible aislarlos de diversos nichos ecológicos y en una gran variedad de alimentos, donde desarrollan un importante papel conteniendo o limitando la presencia de *Listeria monocytogenes* y otros patógenos. La capacidad inhibitoria de las BAL se basa en la generación de productos metabólicos que exhiben mecanismos inespecíficos (ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, diacetilo) o específicos como es el caso de las bacteriocinas (14, 16). Estos peque-

ños péptidos de síntesis ribosomal actúan sobre la membrana de las células blanco alterando su permeabilidad (16). Se han identificado más de 50 bacteriocinas producidas por BAL dentro de las cuales, la nisina y la lactocina son producidas en forma industrial y hasta nuestros días, las únicas admitidas para ser utilizadas como aditivos en alimentos (16). Un grupo especial de bacteriocinas producidas por BAL son las tipo pediocinas que pertenecen a la Clase IIa y son reconocidas por ser efectivos agentes antilisteria (17, 18).

En el presente trabajo se describe la capacidad inhibitoria contra *Listeria monocytogenes* de 5 cepas de bacterias lácticas productoras de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas (SITB) aisladas de peces capturados en el litoral marítimo del noreste de la provincia de Chubut. Se describen además las principales características fisicoquímicas de las bacteriocinas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Aislamiento de bacterias ácido lácticas

Se tomaron muestras del tracto digestivo, tegumento y branquias de peces capturados en el litoral marítimo del noreste de la provincia de Chubut. Las muestras se trasladaron a 4 °C hasta el laboratorio y se procesaron dentro de las 6 h. El enriquecimiento primario se realizó en caldo de Man Rogosa Sharp (MRS), MRS ajustado a pH 4,6 y 5,4; MRS sin acetato a pH 8, MRS con NaCl al 6,5% y caldo M17. Los enriquecimientos se incubaron a 25 y 30 °C durante 24 h (30 °C) y 48 h (25 °C). Luego del período de incubación los cultivos líquidos se repicaron a agar MRS suplementado con ácido nalidíxico (40 µg/mL) y cicloheximide (10 µg/mL) y se incubaron durante 24 h (30 °C) y 48 h (25 °C).

### Identificación fenotípica

Las colonias sospechosas se sometieron a las siguientes pruebas bioquímicas:

Coloración de Gram.

Prueba de la catalasa.

Fermentación de azúcares.

Producción de gas (CO<sub>2</sub>) a partir de glucosa.

### Ensayos antimicrobianos de los sobrenadantes

Las cepas de BAL se cultivaron en caldo MRS a 32 °C hasta alcanzar la fase logarítmica. Luego del período de incubación los medios se centrifugaron a 3.000 rpm durante 15 min. El sobrenadante libre de células se empleó en el ensayo antimicrobiano que 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 overnight de la cepa *L. monocytogenes* ATCC 7644 (19). Las placas se mantuvieron a 4-8 °C durante 2 h y luego se incubaron a 35 °C

durante 18-24 h. También se ensayó la actividad antagonista según lo descrito cultivando las 5 cepas seleccionadas a 10 °C.

### 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 y 121 °C durante 5 min. En ambos casos la actividad residual se determinó por el procedimiento previamente descrito (19). La sensibilidad a enzimas se llevó a cabo, determinando la actividad residual luego de tratar los sobrenadantes durante 1 h con tripsina, lipasa, lisozima y catalasa (5mg/mL) en las condiciones óptimas para cada enzima.

### Identificación genotípica

Luego de una incubación a 32 °C durante 12 h en caldo MRS, las cepas de BAL seleccionadas sobre la base de su actividad antagonista, se centrifugaron a 12.000 g durante 5 min y el ADN se extrajo utilizando un equipo comercial de purificación (Wizard Genomics, Promega).

Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificó el gen que codifica ARNr 16S con un termociclador Multigene Gradient (Labnet International Inc., Woodbridge, NJ), usando los cebadores universales para procariontes 5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3' y 5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3', según lo descrito en DeLong (20). Ambas hebras de los productos de PCR se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc. (Seúl, Corea). Las secuencias obtenidas se compararon con las depositadas en la base de datos del NCBI utilizando el programa BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (21).

## RESULTADOS

De las muestras procesadas se lograron aislar y clasificar mediante identificación fenotípica 53 cepas de bacterias ácido lácticas, 5 de las cuales exhibieron actividad inhibitoria sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. La identificación genotípica permitió clasificar a 2 cepas como *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, 2 cepas como *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* y una cepa como *Lactobacillus sakei*.

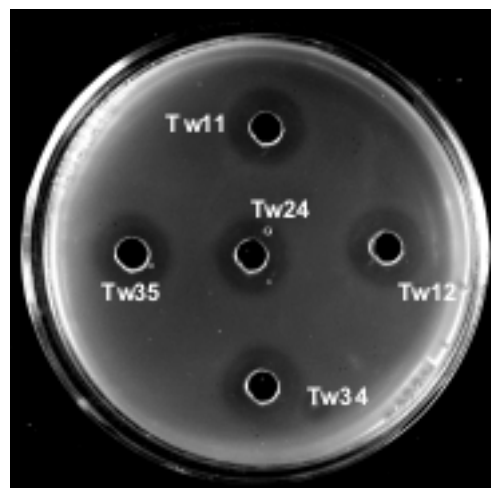
Luego de tratar los sobrenadantes obtenidos a 32 °C con NaOH hasta alcanzar la neutralidad, el efecto inhibitorio no exhibió modificaciones. Los mismos resultados se obtuvieron cuando los sobrenadantes neutralizados se sometieron al calentamiento de 100 °C durante 5 min o 121°C durante 5 min. Siguiendo el protocolo previamente descrito, también fue posible determinar el efecto antagonista ejercido por los sobrenadantes obtenidos a 10 °C.

El tratamiento enzimático llevado a cabo con lipasa, catalasa y lisozima no alteró la actividad antagonista ejercida por los sobrenadantes de las 5 cepas seleccionadas, en cambio el tratamiento con tripsina abolió por completo la capacidad de inhibir el crecimiento de *L. monocytogenes*.

En la Figura 1 se pueden observar los halos de inhibición de crecimiento de *L. monocytogenes* ATCC 7644 debido a la actividad antimicrobiana de los sobrenadantes obtenidos a 32 °C, neutralizados y calentados a 100 °C de las 5 cepas de BAL seleccionadas.

Fig. 1. Actividad inhibitoria de bacterias ácido lácticas aisladas de peces marinos sobre *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Tw11, Tw34), *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Tw12, Tw35) y *Lb. sakei* (Tw24)

Fig. 1. Inhibitory activity of lactic acid bacteria isolated from marine fish on *Listeria monocytogenes* ATCC 7644. *Lc. lactis* subsp. *cremoris* (Tw11, Tw34), *Lc. lactis* subsp. *lactis* (Tw12, Tw35) and *Lb. sakei* (Tw24).



## DISCUSIÓN

En el estudio realizado, la alta frecuencia de aislamientos de cepas de BAL en peces sugiere que, no obstante los complejos requerimientos nutricionales exigidos por estos microorganismos, exhiben una alta adaptabilidad a un variado número de ambientes incluyendo, como en este caso, al medio marino.

La presencia de cepas de *Lactococcus* es frecuente en leche y sus derivados y en otros medios como la superficie de vegetales, pero en el medio marino sólo habían sido descritas por métodos moleculares y consideradas dentro del grupo de células viables pero no cultivables (VBNC) (22). Sin embargo, recientemente se logró aislar una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* y una cepa de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* del intestino de un pez globo (*Takifugu niphobles*) (23).

En consecuencia es interesante destacar en este trabajo que, 4 de las 5 cepas seleccionadas

das pertenecen al género *Lactococcus*. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Tw11, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Tw12 y Tw35 se aislaron de tegumento de pejerrey panzón (*Odontesthes platensis*), mientras que *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Tw34 se aisló del intestino de la misma especie. La restante cepa, *Lactobacillus sakei* Tw24, también se aisló de tegumento de pejerrey panzón.

La actividad antagónica contra *Listeria monocytogenes* de los sobrenadantes de las 5 cepas seleccionadas efectuados a 32 °C y 10 °C, no sufrió alteraciones cuando se neutralizaron con NaOH, fenómeno que demuestra que la inhibición de crecimiento no era producida por efecto de los ácidos orgánicos generados por el metabolismo de las BAL. Tampoco el efecto antimicrobiano se vio afectado cuando los sobrenadantes se sometieron, luego de la neutralización, a una temperatura de 100 °C ó 121 °C durante 5 minutos, demostrándose la estabilidad del principio activo en las condiciones impuestas.

La actividad enzimática de lipasa y lisozima no alteró la actividad antilisteria de los sobrenadantes lo que permite descartar la existencia de lípidos o azúcares involucrados con la actividad del principio activo.

Algunas cepas de BAL tienen la capacidad de producir peróxido de hidrógeno, molécula con gran capacidad antagonista que puede ejercer su acción sobre una gran variedad de microorganismos. Sin embargo, la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes ensayados no se vio afectada luego del tratamiento enzimático con catalasa y en consecuencia es posible afirmar que no existe una relación entre el fenómeno y la presencia del metabolito.

Luego de 1 hora de incubación la actividad proteolítica de la tripsina inactivó por completo la capacidad inhibitoria de los sobrenadantes, demostrándose de esta manera que el principio activo era de naturaleza proteica.

Las características determinadas en las pruebas descritas permiten afirmar que las 5 cepas seleccionadas ejercen su actividad antagónica gracias a la síntesis de sustancias inhibitorias tipo bacteriocinas (SITB). En los 5 casos estudiados, la estabilidad térmica de estas moléculas indicaría que se trata de péptidos de bajo peso molecular con actividad específica contra *L. monocytogenes*, propiedades que permitirían incluirlas dentro del grupo de bacteriocinas clase I o II (16, 18).

Se ha demostrado que la principal fuente de contaminación de los productos de mar en las plantas procesadoras está vinculada más al instrumental utilizado en las distintas fases que a la carga bacteriana natural (5, 10, 11). Los procesos de lavado y desinfección resultan, bajo determinadas condiciones, ineficaces para elimi-

nar la contaminación y en consecuencia ejercen una presión selectiva sobre la flora contaminante que conduce a la supervivencia de especies de *Listeria monocytogenes* que resultan dominantes y persistentes (8, 11, 13).

Esta situación induce a la búsqueda de métodos alternativos para controlar el desarrollo de patógenos alimentarios. El control biológico y la biopreservación mediante el uso de BAL productoras de metabolitos antagónicos constituyen metodologías que han empezado a utilizarse con éxito en sistemas de producción de alimentos (14, 15, 17).

Las cepas estudiadas en este trabajo son productoras de SITB que podrían resultar efectivas para el control de *Listeria monocytogenes* en plantas de procesamiento de pescados. Su aislamiento del medio marino les otorga algunas características particulares como desarrollarse y producir el principio antagónico a bajas temperaturas.

También se debe tener en cuenta que, a excepción de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* Tw51, las cepas fueron aisladas de tegumento lo que permite pensar que tienen afinidad por el carácter hidrofóbico del mucus de este medio. Esta propiedad implica la posibilidad de incluir estas cepas en técnicas de pulverización que utilizan suspensiones celulares de microorganismos antagónicos de patógenos alimentarios. Esta metodología ya ha sido usada con éxito y demostrada su efectividad en el control específico de *Listeria monocytogenes* (17, 24).

## BIBLIOGRAFÍA

1. Jianshun C, Xiaokai L, Lingli J, Peijie J, Wei W, Dongyou L, Weihuan F. Molecular characteristics and virulence potential of *Listeria monocytogenes* isolates from Chinese food systems. *Food Microbiol.* 2009; 26:103-111
2. Byelashov OA, Carlson BA, Geornaras I, Kendall PA, Scanga JA, Sofos JN. Fate of post-processing inoculated *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged pepperoni stored at 4, 12 or 25 °C. *Food Microbiol.* 2009; 26:77-81
3. Nyachuba DG, Donnelly CW, Howard AB. Impact of nitrite on detection of *Listeria monocytogenes* in selected ready-to-eat (RTE) meat and seafood products. *J Food Sci.* 2007; 72 (7):267-275
4. Manfreda G, De Cesare A, Stella S, Cozzi M, Cantoni C. Occurrence and ribotypes of *Listeria monocytogenes* in Gorgonzola cheeses. *Int J Food Microbiol.* 2005;102 (3):287-293
5. Fønnesbech Vogel B, Henrik Huss H, Ojeniyi B, Ahrens P, Gram L. Elucidation of *Listeria monocytogenes* contamination routes in cold-smoked salmon processing plants detected by dna-based typing methods. *Appl Environ Microbiol.* 2001; 67:2586-2595
6. Rodas-Suárez OR, Flores-Pedroche JF, Betancourt-Rule JM, Quiñones-Ramírez EI, Vázquez-Salinas

- C. Occurrence and antibiotic sensitivity of *Listeria monocytogenes* strains isolated from oysters, fish, and estuarine water. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72:7410-7412
7. Jallewar PK, Kalorey DR, Kurkure NV, Pande VV, Barbuddhe SB. Genotypic characterization of *Listeria* spp. isolated from fresh water fish. *Int J Food Microbiol.* 2007; 114 (1):120-123.
8. Hansen CH, Vogel BF, Gram L. Prevalence and survival of *Listeria monocytogenes* in Danish aquatic and fish processing environments. *J Food Prot.* 2006; 69:2113-2122
9. Miettinen H, Wirtanen G. Prevalence and location of *Listeria monocytogenes* in farmed rainbow trout. *Int J Food Microbiol.* 2005; 104:135-143
10. Destro MT. Incidence and significance of *Listeria* in fish and fish products from Latin America. *Int J Food Microbiol.* 2000; 62:191-196
11. Wulff G, Gram L, Ahrens P, Fonnesbech Vogel B. One group of genetically similar *Listeria monocytogenes* strains frequently dominates and persists in several fish slaughter- and smokehouses. *Appl Environ Microbiol.* 2006; 72:4313-4322
12. Atanassova V, Reich F, Klein G. Microbiological quality of sushi from sushi bars and retailers. *J Food Prot.* 2008; 71 (4):860-864
13. Porsby CH, Vogel BF, Mohr M, Gram L. Influence of processing steps in cold-smoked salmon production on survival and growth of persistent and presumed non-persistent *Listeria monocytogenes*. *Int J Food Microbiol.* 2008; 122 (3):287-295
14. Stiles ME. Biopreservation by lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 1996; 70:331-345
15. Jones RJ, Hussein HM, Zagorec M, Brightwell G, Tagg JR. Isolation of lactic acid bacteria with inhibitory activity against pathogens and spoilage organisms associated with fresh meat. *Food Microbiol.* 2008; 25 (2):228-234
16. Papagianni M. Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function, and applications. *Biotechnol Adv.* 2003; 21:465-499
17. Izquierdo E, Marchioni E, Aoude-Werner D, Hasselmann C, Ennahar S. Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes*. *Food Microbiol.* 2009; 26:16-20
18. Eijsink VGH, Skeie M, Middelhoven PH, Brurberg MB, Nes IF. Comparative studies of class IIa bacteriocins of lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol.* 1998; 64:3275-3281.
19. 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.
20. De Long EF. Archaea in coastal marine environments. *Proc Natl Acad Sci.* 1992; 89:5685-5689.
21. Altschul SF, Gish W, Miller M, Myers EW Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 1990; 215:403-410
22. Shiina A, Itoi S, Washio S, Sugita H. Molecular identification of intestinal microflora in *Takifugu niphobles*. *Comp Biochem Physiol D.* 2006; 1:128-132
23. Itoi S, Abe T, Washio S, Ikuno E, Kanomata Y, Sugita H. Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *Int J Food Microbiol.* 2008; 121:116-121
24. Byelashov OA, Kendall PA, Belk KE, Scanga JA, Sofos JN. Control of *Listeria monocytogenes* on vacuum-packaged frankfurters sprayed with lactic acid alone or in combination with sodium lauryl sulfate. *J Food Prot.* 2008; 71:728-734



## DETERMINACION DE LA DOSIS ÓPTIMA DE TARTRATO DE TILOSINA PARA EL CONTROL A CAMPO DE LA LOQUE AMERICANA DE LAS ABEJAS

Reynaldi FJ<sup>1</sup>, Albo GN<sup>2</sup>, Giusti M<sup>2</sup>, Alippi AM<sup>3</sup>

<sup>1</sup> CONICET. Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI)

<sup>2</sup> Curso de Producción Animal I. <sup>3</sup> CIC. Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI)  
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata

**RESUMEN:** La loque americana es la enfermedad más grave de origen bacteriano que afecta a las larvas de las abejas melíferas en todo el mundo. En este trabajo, se evaluó la eficacia de 3 dosis diferentes de tartrato de tilosina administradas bajo la forma de "paper-pack" en colmenas inoculadas artificialmente con esporas de *Paenibacillus larvae*, agente etiológico de la enfermedad. La ausencia de larvas con síntomas clínicos demostró que las dosis de 1.000 mg y 1.200 mg de tilosina fueron las más efectivas in vivo protegiendo a las colmenas por un período de hasta 365 días desde la aplicación del tratamiento. Paralelamente, se encontró una mayor efectividad de la dosis de 1.000 mg con el agregado de gelatina de cereza como saborizante. La utilización del tartrato de tilosina en Argentina puede ser una herramienta alternativa para el control de la loque americana a campo, principalmente en colmenares en los cuales se haya detectado resistencia a tetraciclina. Un tratamiento otoñal de 1.000 mg de p.a. de tilosina con saborizante junto con otras pautas de manejo facilitaría el control integrado de la enfermedad evitando la difusión de cepas del patógeno resistentes a tetraciclina. -

**PALABRAS CLAVES:** *Paenibacillus larvae*, *Apis mellifera*, tartrato de tilosina, control, loque americana

## DETERMINATION OF THE OPTIMUM DOSES OF TYLOSIN TARTRATE FOR THE CONTROL OF AMERICAN FOULBROOD IN HONEY BEE COLONIES

**ABSTRACT:** American foulbrood (AFB), caused by the spore-forming bacterium *Paenibacillus larvae* is the most serious disease affecting the larval and pupal stages of honey bees worldwide. Field studies were conducted to evaluate the optimum dosage of tylosin tartrate for controlling infections of American Foulbrood in artificially inoculated colonies. The absence of larvae with clinical symptoms demonstrated that tylosin tartrate at the doses of 1,000 mg and 1,200 mg per colony were effective for the elimination of clinical signs for up to 365 days. On the other hand, cherry jelly used as attractant increased the consumption of the antibiotic. Tylosin tartrate at a doses of 1,000 mg a.i. plus cherry jelly is a valuable tool for controlling AFB infections.

**KEY WORDS:** *Paenibacillus larvae*, *Apis mellifera*, tartrato de tilosina, control, American Foulbrood.

Fecha de recepción: 27/05/09

Fecha de aprobación: 10/12/09

**Dirección para correspondencia:** F. Reynaldi. Centro de Investigaciones de Fitopatología (CIDEFI) Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Universidad Nacional de La Plata. 60 y 119 (1900). La Plata. Argentina.

**E-mail:** freynaldi@yahoo.com

## INTRODUCCIÓN

La loque americana es la enfermedad más grave y peligrosa que afecta a las larvas y pupas de las abejas (*Apis mellifera* L.), es muy contagiosa, no se presenta como epidemia, aparece en cualquier época del año (1,2) y está ampliamente difundida en todos los países productores de miel (3). El agente causal es *Paenibacillus larvae* (4), una bacteria con la capacidad de formar esporas que mantienen su capacidad infectiva por largos períodos y sobreviven frente a condiciones adversas (5).

En la Argentina (6) está presente en todas las zonas productoras de miel, llegando a una incidencia mayor al 50% en la Provincia de Buenos Aires (7). En áreas donde la ocurrencia de la enfermedad es alta, el control con antibióticos aparece como una alternativa a la quema o eliminación de cuadros de cría de las colmenas infectadas (2). Durante décadas, el antibiótico de elección para el control de esta enfermedad ha sido la oxitetraciclina lo que generó la aparición de cepas del patógeno resistentes en distintas regiones geográficas de la Argentina, EUA y Canadá (8, 9, 10, 11).

El tartrato de tilosina es un antibiótico macrólido eficaz sobre bacterias Gram positivas y espiroquetas, pero no sobre la mayoría de los microorganismos Gram negativos (12, 13) que ha sido citado como efectivo en la inhibición de *P. larvae* tanto *in vitro* como *a campo* (14, 15, 16, 17, 18, 19, 20), razón por la cual fue recientemente aprobado en EUA para su uso en colmenas ([http://www.fda.gov/cvm/cvm\\_updates/honeybee.htm](http://www.fda.gov/cvm/cvm_updates/honeybee.htm))

El objetivo del presente trabajo fue determinar la dosis óptima de tartrato de tilosina suministrada bajo la forma de "paper-pack" para eliminar los síntomas clínicos de loque americana en colmenas inoculadas artificialmente. Adicionalmente, se evaluó el agregado de gelatina de cereza como saborizante para mejorar la palatabilidad de la formulación.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Los ensayos se realizaron en el colmenar experimental de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina (Latitud 35° S, Longitud 57° O). Se efectuaron dos experimentos, el primero entre los meses de febrero y noviembre de 2006 y el segundo entre febrero y noviembre de 2007. En todos los experimentos se utilizaron colmenas tipo Langstroth de abejas melíferas (*Apis mellifera ligustica* L.) acondicionadas en cámaras de cría (3-4 cuadros de cría, 6-7 cuadros de abejas y 2-3 cuadros de miel) inoculadas mediante la técnica de injerto de un trozo de panal con síntomas de

loque americana 45 días previos a la aplicación de los tratamientos (15, 16). Las colmenas fueron tratadas previamente al ensayo con AMIVAR® para el control de la varroosis ocasionada por el ácaro *Varroa destructor*.

### Primer experimento:

#### Evaluación de 3 dosis de tartrato de tilosina en colmenas inoculadas con loque americana

Se efectuaron cuatro tratamientos con cinco repeticiones por tratamiento, aplicados bajo la forma de "paper pack" de 50 gramos (44 g de azúcar impalpable, 5 g de gelatina de cereza como saborizante y la correspondiente dosis de tilosina (Tylan® Laboratorio ELANCO, Eli Lilly Interamérica Inc., Argentina), suministrados por única vez a los 45 días de efectuada la inoculación, sobre los cabezales de la cámara de cría. En el momento de la aplicación se verificó la presencia de síntomas de la enfermedad en todas las colmenas y se probaron 3 dosis de tartrato de tilosina: T1: 800 mg; T2: 1.000 mg T3: 1.200 mg. El tratamiento T4 fue el control sin antibiótico.

### Segundo experimento:

#### Evaluación de la incorporación de saborizante a la dosis de 1.000 mg de tilosina

Adicionalmente, se probó la eficacia de la dosis de 1.000 mg de tartrato de tilosina con y sin el agregado del saborizante, a razón de 5 repeticiones por tratamiento: T5: con saborizante; T6: sin saborizante y T7: Tratamiento control sin antibiótico (azúcar y saborizante). Las proporciones de saborizante y azúcar fueron las mismas que en el experimento anterior.

Para ambos experimentos, a partir de la aplicación de los tratamientos, se efectuaron ocho inspecciones quincenales donde se cuantificó la sintomatología clínica de la enfermedad de acuerdo con la escala de 7 niveles propuesta por Alippi y colaboradores (16) donde: 0: Ausencia de síntomas de loque americana; 1 entre 1 y 10 larvas con síntomas clínicos, 2: entre 11 y 30 larvas con síntomas, 3: entre 31 y 99 larvas con síntomas; 4: más de 100 larvas con síntomas, 5: recambio de reina debido a la enfermedad y 6: muerte de la colmena. Los valores obtenidos se analizaron por el Test de Krüskal-Wallis (ANOVA no paramétrico) con valor de  $p \leq 0,05$  y posteriormente se efectuó el Test de Nemenyi modificado (21) para determinar diferencias entre tratamientos. Adicionalmente, al cabo de un año de efectuada la inoculación, se verificó la presencia/ausencia de síntomas para determinar si hubo recurrencia de la enfermedad.

**RESULTADOS****Primer experimento:****Evaluación de 3 dosis de tartrato de tilosina en colmenas inoculadas con loque americana:**

En la primera inspección todas las colmenas inoculadas presentaron síntomas clínicos de la enfermedad con niveles de infección entre 2 y 4. A partir de la segunda inspección se observó una tendencia de las colmenas control (*T4*) hacia el aumento de los niveles de infección con respecto a las colmenas tratadas con tilosina. En términos generales, las colmenas del tratamiento *T1* mantuvieron los niveles de infección estables durante todo el ensayo, mientras que las colmenas de los tratamientos *T2* y *T3* mostraron una tendencia a disminuir los niveles de infección hasta llegar a una recuperación definitiva al final del ensayo (Tabla 1, Fig.1). En todos los casos las abejas consumieron la totalidad de los "paper packs" en un plazo no mayor a 25 días de la fecha de su colocación.

El Test de Kruskal-Wallis no mostró diferencias estadísticamente significativas en las primeras 5 inspecciones a un valor de  $p \leq 0,05$ , en las últimas tres inspecciones, hubo diferencias significativas entre tratamientos, con valores de  $p = 0,054$  para la sexta inspección,  $p = 0,047$  para la séptima inspección y  $p = 0,0035$  para la octava inspección (Tabla 1). El Test de Nemenyi modificado mostró tres grupos de tratamientos: el primero agrupó a los tratamientos más eficaces,

*T2* (1.000 mg) y *T3* (1.200 mg) dónde se observó una eliminación de los síntomas clínicos de la enfermedad a los 120 días; en el segundo grupo se ubicó el tratamiento *T1* (800 mg) de mediana eficacia con un 20% de mortandad a los 105 días post-inoculación y el tercer grupo incluyó el tratamiento testigo (*T4*), que registró un 80% de mortandad de colmenas entre los 60 y 120 días post-inoculación y las que sobrevivieron presentaron tres episodios de recambio de reinas dentro del periodo de estudio. Adicionalmente, no se observó recambio de reinas ni recurrencia de la enfermedad en las colmenas de los tratamientos *T2* y *T3*, mientras que las colmenas del tratamiento *T1* no presentaron recurrencia pero si un 20% de recambio de reinas (Tabla 1).

**Segundo experimento:****Evaluación de la incorporación de saborizante a la dosis de 1.000 mg de tilosina**

Los tratamientos *T5* y *T6* presentaron una tendencia hacia la recuperación, particularmente las colmenas tratadas con tilosina más saborizante (*T5*) y las colmenas del tratamiento control (*T7*) desarrollaron la enfermedad aumentando sus niveles de infección hacia el final del ensayo. En todos los casos las abejas consumieron la totalidad de los "paper packs" en un plazo no mayor a 25 días de su colocación.

Tabla 1: Niveles de infección de loque americana observados en las colmenas durante el desarrollo del primer experimento, dónde 0: Ausencia de síntomas de loque americana; 1 entre 1 y 10 larvas con síntomas clínicos, 2: entre 11 y 30 larvas con síntomas, 3: entre 31 y 99 larvas con síntomas; 4: más de 100 larvas con síntomas, 5: recambio de reina debido a la enfermedad y 6: muerte de la colmena (Alippi et al., 2004). Los valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos para  $p < 0,05$ .

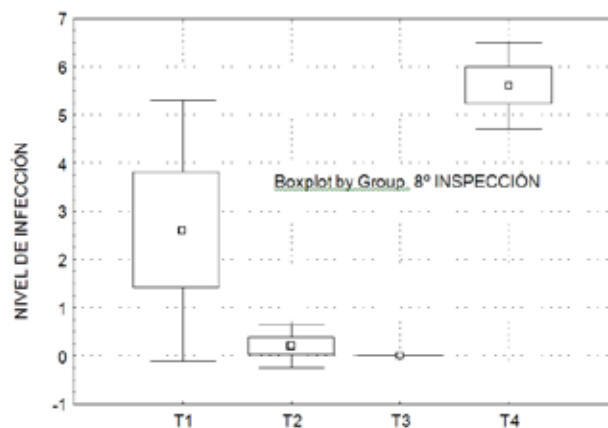
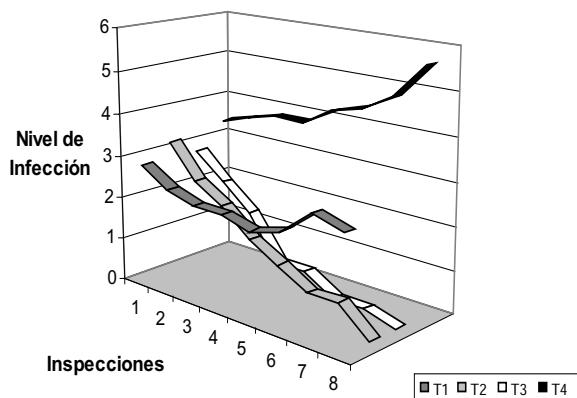
Table 1: AFB infection levels of each colony at 8 inspection dates during the first field trial, where 0 is non-detectable AFB symptoms; 1: between 1 and 10 larvae with clinical signs; 2: between 11 and 30 larvae with clinical signs; 3: between 31 and 99 larvae with clinical signs; 4: more than 100 larvae with clinical signs; 5: queen supersedure due to AFB and 6: colony death, respectively (Alippi et al., 2004). Values followed by the same letter showed no statistical differences ( $p < 0,05$ )

TRATAMIENTOS	COLMENAS	1° INSPECCIÓN	2° INSPECCIÓN	3° INSPECCIÓN	4° INSPECCIÓN	5° INSPECCIÓN	6° INSPECCIÓN	7° INSPECCIÓN	8° INSPECCIÓN
T1	2	3 a	3 a	3 a	5 a	5 a	5 a	5 a	5 a
T1	3	3 a	3 a	2 a	1 a	1 a	1 a	1 a	1 a
T1	5	2 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T1	6	2 a	2 a	3 a	3 a	3 a	3 a	2 a	1 a
T1	9	4 a	4 a	3 a	2 a	1 a	2 a	6 a	6 a
T2	12	4 a	4 a	3 a	2 a	1 a	0 a	0 a	0 a
T2	11	4 a	4 a	4 a	3 a	2 a	2 a	3 a	1 a
T2	10	2 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T2	16	4 a	4 a	3 a	2 a	2 a	1 a	0 a	0 a
T2	15	2 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T3	14	4 a	4 a	3 a	1 a	1 a	0 b	0 b	0 b
T3	21	4 a	4 a	3 a	2 a	2 a	1 b	1 b	0 b
T3	23	2 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 b	0 b	0 b
T3	25	2 a	1 a	1 a	0 a	0 a	0 b	0 b	0 b
T3	26	2 a	2 a	1 a	0 a	0 a	0 b	0 b	0 b
T4	24	4 a	4 a	3 a	3 a	4 a	4 c	4 c	4 c
T4	27	2 a	2 a	3 a	3 a	3 a	4 c	5 c	6 c
T4	29	3 a	3 a	3 a	3 a	4 a	4 c	4 c	5 c
T4	30	4 a	5 a	6 a	6 a	6 a	6 c	6 c	6 c
T4	31	4 a	4 a	4 a	4 a	4 a	4 c	5 c	6 c

Figura 1a: Niveles de infección de loque americana en todas las colmenas del primer experimento en cada fecha de inspección. T1: 800 mg de tilosina, T2: 1.000 mg de tilosina, T3: 1.200 mg de tilosina y T4 control sin antibiótico. Figura 1b: Gráfico de box-whisker que muestra los valores de nivel de infección para los distintos tratamientos luego de 120 días de la inoculación (8° inspección). Las cajas comprenden el 50% de los valores y las líneas exteriores muestran el menor y mayor valor observado.

Figure 1a: AFB infection levels in all the colonies at 8 inspection dates during the first trial. T1: 800 mg of tylosin, T2: 1,000 mg of tylosin, T3: 1,200 mg of tylosin and T4 control. Figure 1b: Box-whisker plot displaying infection levels after 120 days (inspection 8) under different treatments. Boxes include the 50% of data and whiskers extend to minimum and maximum observed values.

### Evolución de la enfermedad en el tiempo



El Test de Kruskal Wallis mostró diferencias significativas entre tratamientos a partir de la quinta inspección ( $p = 0,0029$ ) y hasta el final del ensayo en la octava inspección ( $p = 0,006$ ). El test de Nemenyi mostró a los tres tratamientos diferentes entre sí, el tratamiento T5 (tilosina + saborizante) eliminó los síntomas de la enfermedad entre los 105 y 120 días post-inoculación; el tratamiento T6 (tilosina sin saborizante) presentó un 20% de mortandad entre los 60 y 120 días y, finalmente el tratamiento T7 (control), tuvo el peor comportamiento con un 80% de colmenas muertas entre los 90 y 120 días post-inoculación y con 2 episodios de recambio de reinas en las sobrevivientes (Tabla 2, Fig. 2). No se observó recambio de reinas a lo largo de todo el ensayo ni recurrencia de la enfermedad en las colmenas del tratamiento T5, mientras que las colmenas del tratamiento T6 no presentaron recurrencia pero sí un 20% de recambio de reinas.

Los tratamientos T2 y T3 del primer ensayo y el tratamiento T5 del segundo ensayo eliminaron los síntomas de la enfermedad protegiendo a las colmenas por el término de un año de efectuada la aplicación.

## DISCUSIÓN

La efectividad del tartrato de tilosina observada en nuestro trabajo concuerda con lo puntualizado por otros investigadores usando diferentes formas de aplicación; por ejemplo, Moffet y colaboradores (19) determinaron que una dosis de 1.200 mg de antibiótico administrada bajo la forma de jarabe protegía a las colmenas durante

seis semanas. Pettis y Fedlaufer (22) empleando una dosis de 600 mg de tilosina en jarabe eliminaron los síntomas de la enfermedad, pero no definieron el tiempo de protección de este tratamiento. Hitchcock y colaboradores (18) aplicando 1.000 mg de tilosina por espolvoreo durante tres semanas obtuvieron una protección durante 7 semanas, mientras que Peng y colaboradores (20) empleando dosis de 100 mg, 200 mg, o 400mg por colmena bajo forma de espolvoreo suprimieron los síntomas por 4 semanas. Por otra parte, Elzen y colaboradores observaron que una dosis de 200 mg por espolvoreo en una sola aplicación protegía a las colmenas durante tres semanas (17) y Alippi y colaboradores (15) determinaron que una dosis única de 1.500 mg de tilosina en forma de pattie o paper pack eliminaba los síntomas de la enfermedad por el término de un año.

Los resultados obtenidos en nuestros ensayos demostraron que tanto las dosis de 1.000 mg como de 1.200 mg de tilosina fueron eficaces para el control de loque americana hasta un año después de efectuado el tratamiento. Por esta razón, se considera que la menor dosis (1.000 mg de p.a.) sería la más recomendable para su uso en colmenas disminuyendo el riesgo de contaminación de la miel. También, se determinó que el tratamiento con saborizante resultó más efectivo que el tratamiento sin saborizante, probablemente, debido a la eliminación total o parcial del antibiótico fuera de la colmena debido a una mala palatabilidad para las abejas generando una subdosificación que disminuye su eficacia como ocurre con las dosis más bajas de 750 mg. Un

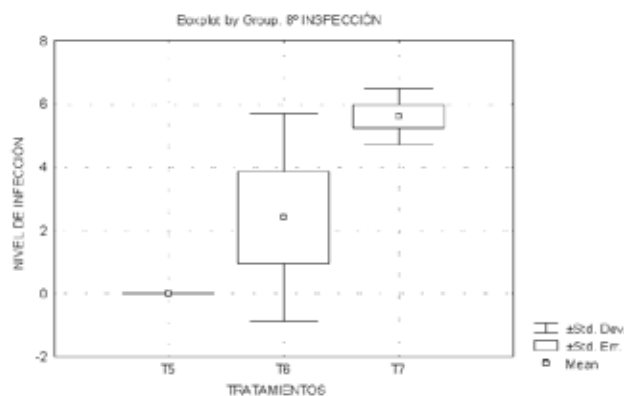
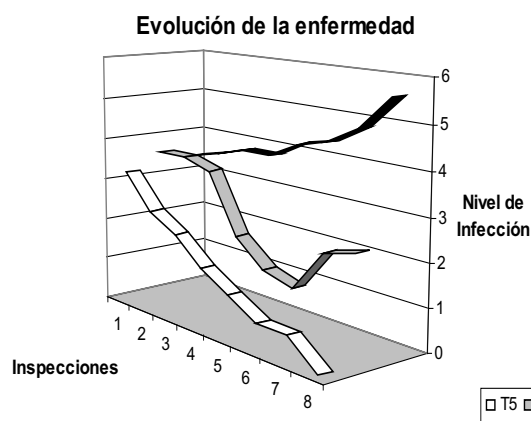
Tabla 2: Niveles de infección de loque americana en las colmenas durante el desarrollo del segundo ensayo a lo largo de las 8 inspecciones realizadas dónde 0: Ausencia de síntomas de loque americana; 1 entre 1 y 10 larvas con síntomas clínicos, 2: entre 11 y 30 larvas con síntomas, 3: entre 31 y 99 larvas con síntomas; 4: más de 100 larvas con síntomas, 5: recambio de reina debido a la enfermedad y 6: muerte de la colmena (Alippi et al., 2004). Los valores seguidos por la misma letra no son estadísticamente significativos para  $p < 0,05$ .

Table 2: AFB infection levels per colony at each inspection date during the second field trial, where 0 is non-detectable AFB symptoms; 1: between 1 and 10 larvae with clinical signs; 2: between 11 and 30 larvae with clinical signs; 3: between 31 and 99 larvae with clinical signs; 4: more than 100 larvae with clinical signs; 5: queen supersedure due to AFB and 6: colony death, respectively. (Alippi et al., 2004) values follow with the same letter show no statistical differences ( $p < 0,05$ )

TRATAMIENTOS	COLMENAS	1°	2°	3°	4°	5°	6°	7°	8°
		INSPECCIÓN	INSPECCIÓN	INSPECCIÓN	INSPECCIÓN	INSPECCIÓN	INSPECCIÓN	INSPECCIÓN	INSPECCIÓN
T5	37	4 a	4 a	3 a	2 a	1 a	0 a	0 a	0 a
T5	38	4 a	4 a	3 a	2 a	2 a	1 a	0 a	0 a
T5	39	2 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T5	41	4 a	4 a	3 a	2 a	2 a	1 a	0 a	0 a
T5	42	2 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a	0 a
T6	41	4 a	4 a	4 a	2 a	1 a	0 a	0 b	0 b
T6	44	4 a	4 a	3 a	1 a	0 a	0 a	0 b	0 b
T6	45	4 a	4 a	3 a	1 a	0 a	0 a	5 b	5 b
T6	46	2 a	2 a	6 a	0 a	0 a	0 a	0 b	0 b
T6	47	4 a	4 a	4 a	6 a	6 a	6 a	6 b	6 b
T7	49	4 a	4 a	3 a	3 a	4 b	4 b	4 c	4 c
T7	51	2 a	2 a	3 a	3 a	3 b	4 b	5 c	6 c
T7	52	3 a	3 a	3 a	3 a	4 b	4 b	4 c	6 c
T7	53	4 a	5 a	6 a	6 a	6 b	6 b	6 c	6 c
T7	54	4 a	4 a	4 a	4 a	4 b	4 b	5 c	6 c

Figura 2a: Niveles de infección de loque americana en todas las colmenas del segundo experimento en cada fecha de inspección. T5: 1000 mg de tilosina + saborizante, T6: 1.000 mg de tilosina sin saborizante y T7 control. Figura 2b: Gráfico de box-whisker que muestra los valores de nivel de infección para los distintos tratamientos luego de 120 días de la inoculación (8° inspección). Las cajas comprenden el 50% de los valores y las líneas exteriores muestran el menor y mayor valor observado.

Figure 2a: AFB infection levels in all the colonies at 8 inspection dates during the second trial. T5: 1,000 mg of tylosin + cherry jelly, T6: 1,000 mg of tylosin without cherry jelly and T7 control. Figure 2b: Box-whisker plot displaying infection levels after 120 days (inspection 8) under different treatments. Boxes include 50% of data and whiskers extend to minimum and maximum observed values.



efecto similar fue observado por Peng y colaboradores (20) quienes notaron que las abejas eran renuentes a consumir una dosis de 800 mg de tilosina vehiculizada en 7 g de azúcar.

Se observó recambio de reinas en los tratamientos T1 y T4 del primer ensayo de campo y en los tratamientos T6 y T7 del segundo ensayo. El recambio de reinas está asociado a una tendencia natural de defensa de la colmena frente a esta enfermedad con el objeto de cortar el ciclo de postura de la reina para eliminar la infección (15). Los datos observados en estos experimen-

tos corroboran lo antedicho ya que las colmenas que presentaron recambio de reina mostraron un alto nivel de infección (grado 5 de la escala propuesta).

Con respecto a la residualidad de tilosina en miel, existen pocos antecedentes en la literatura. Feldlaufer y colaboradores (23) trabajando con colmenas en temporada detectaron que luego de 3 semanas de efectuada la aplicación los residuos encontrados no superaban las 0,16 ppm en miel por lo que recomiendan su aprobación por la FDA para su uso en apicultura dado que estos valores

están por debajo del límite aceptado para tilosina en otros alimentos (23). Por el contrario, Kochansky y colaboradores investigaron la residualidad de tilosina en jarabe de maíz (24) y en mieles (25, 26) preparados en forma artificial y mantenidos en condiciones de laboratorio y determinaron que la tilosina presentó una vida media de 75 días en jarabe y estimaron para miel entre 1,5 y 3 años, pero estos resultados no serían un reflejo de la realidad de la colmena.

El empleo del tartrato de tilosina en Argentina sería una herramienta alternativa para el control de la loque americana a campo, principalmente en colmenares en los cuales se haya detectado resistencia a tetraciclina. Un tratamiento otoñal (para maximizar el periodo de carencia del antibiótico) de 1.000 mg de p.a. de tilosina con saborizante, junto con otras pautas de manejo como la selección de abejas de alto comportamiento higiénico (27, 28) o el cepillado de colmenas afectadas (29), facilitaría el control integrado de la enfermedad evitando la difusión de cepas del patógeno resistentes a tetraciclina.

Si bien el empleo de líneas de abejas con alto comportamiento higiénico se considera como una alternativa de manejo del colmenar afectado por enfermedades de la cría (27, 28), el empleo de estas líneas de abejas por sí solo no sería totalmente efectivo para el control de loque americana en particular. Por ejemplo, Palacio y colaboradores (28) concluyen que las abejas de líneas higiénicas limpian el 98% de las celdas infectadas dejando un 2% de celdas con inóculo bacteriano mientras que el tratamiento con dosis de 1.000 mg p.a. de tilosina elimina totalmente los síntomas clínicos como lo demuestran los resultados de este y otros estudios (15, 20). En el caso de apiarios con un alto número de colmenas el uso de líneas con alto comportamiento higiénico no es aplicable, por lo cual el empleo de tilosina sería una alternativa válida de control de esta enfermedad independientemente de la necesidad de efectuar mayores estudios sobre residualidad de tilosina y sus productos metabólicos en mieles bajo condiciones de campo.

## AGRADECIMIENTOS

Esta investigación fue parcialmente financiada por la ANPCyT (Préstamo BID PICT 2411) y el Laboratorio BIOTAY S.A., Buenos Aires, Argentina. FJR es miembro de la Carrera del Investigador Científico del CONICET y AMA es miembro de la Carrera del Investigador Científico de la CIC.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Bailey L, Ball BV. (Eds.). Honey Bee Pathology, Second Edition, Academic Press, London. 1991.
2. Alippi AM. Bacterial Diseases, pp. 31-59. In: Bee Disease Diagnosis. (Eds. Colin ME, Ball BV, Kilani M). Options Méditerranéennes, Serie B: Etudes et Recherches. No. 25. CIHEAM Publications, Zaragoza. España, 182 pp. 1999
3. Matheson A. World bee health update Bee world 1996; 77: 45-51.
4. Genersch E, Forsgren E, Pentikainem J, Ashiralieva A, Rauch S, Kilwiski J, Fries I. Reclassification of *Paenibacillus larvae* subsp. *pulvificiens* and *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* as *Paenibacillus larvae* without subspecies differentiation. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 2006; 56, 501-511.
5. Morse RA, Nowogrodzki R (Eds.) Honey bee pests, predators and diseases. Second Ed., 1990. Cornell University Press, 474pp
6. Alippi AM. Characterization of *Bacillus larvae* White, the causative agent of AFB of honey bees. First record of its occurrence in Argentina. Revista Argentina de Microbiología 1992; 24: 75-80.
7. Alippi AM, Reynaldi FJ, López AC; De Giusti MR, Aguilar OM. Molecular epidemiology of *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae*, the causal agent of American Foulbrood of honeybees in Argentina. Journal of Apicultural Research 2004; 43 (3): 135-143.
8. Evans JD. Diverse origins of tetracycline resistance in the honey bee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae*. Journal of Invertebrate Pathology 2003; 83, 46-50.
9. Alippi AM. Is Terramycin® losing its effectiveness against AFB?. The Argentinean experience. Bee Biz 2000; 11, 27-29.
10. Alippi, A.M., López A.C., Reynaldi F.J., Grasso, D.H., and Aguilar O.M. Evidence for plasmid-mediated tetracycline resistance in *Paenibacillus larvae*, the causal agent of a honey bee larval disease. Veterinary Microbiology 2007; 125: 290-303.
11. Colter D. Antibiotic Resistant American Foul Brood. Alberta Bee News 2000. February :4.
12. Rang HP, Dale MM, Ritter JM. Farmacología 2000. Cuarta edición. Edición Harcourt.
13. Lucas MF, Mestorino N, Errecalde JO. Macrólidos: novedades de un clásico grupo de antimicrobianos. Analecta Veterinaria 2007. 27 (1): 36-45.
14. FDA, 2005. [http://www.fda.gov/cvm/CVM\\_Updates/honeybee.htm](http://www.fda.gov/cvm/CVM_Updates/honeybee.htm) .
15. Alippi AM, Albo GN, Leniz D, Rivera I, Zanelli ML, Roca AE. Comparative study of tylosin, erythromycin and oxytetracycline to control American Foulbrood of honeybees. Journal of Apicultural Research 1999; 38, 149-158.
16. Alippi AM, Albo GN, Reynaldi FJ, D Giusti MR. In vitro and in vivo susceptibility of the honeybee bacterial pathogen *Paenibacillus larvae* subsp. *larvae* to the antibiotic tylosin. Veterinary Microbiology 2005; 109: 47-55.
17. Elzen P, Westervelt D, Causey D, Rivera R, Baxter J, Fedlaufer M. Control of oxytetracycline-resistant American Foulbrood with tylosin and its toxicity to honey bees (*Apis mellifera*). Journal of Apicultural

**F. Reynaldi y col.**

Research 2002; 41, 97–100.

18. Hitchcock JD, Moffett JO, Lackett JJ, Elliot JR. Tylosin for control American Foulbrood disease in honeybees. *Journal of Economic Entomology* 1970; 63, 204–207.

19. Moffett JO, Hitchcock JD, Lackett JJ, Elliot JR. Evaluation of some new compounds in controlling American Foul Brood. *J. Apic. Res.* 1970; 9: 39-44.

20. Peng YS, Mussen E, Fong A, Cheng P, Wong G & Montague MA. Laboratories and field studies on the effects of the antibiotics tylosin on honey bees *Apis mellifera* L. (Hymenoptera: Apidae). Development and prevention of American Foulbrood disease. *Journal of Invertebrate Pathology* 1996; 67: 64-71.

21. Zar JH. *Biostatistical Analysis* 1998; Prentice Hall.

22. Pettis JS, Feldlaufer MF. Efficacy of lincomycin and tylosin in controlling American foulbrood in honey bee colonies. *Journal of Apicultural Research* 2005. 44(3): 106-108.

23. Feldlaufer MF, Pettis JS, Kochansky JP, Kramer M. Residue levels in honey after colony treatment with the antibiotic tylosin. *American Bee Journal* 2004; 144 (2): 143-145.

24. Kochansky JP, Knox D, Shimanuki H. Comparative stability of oxytetracycline and tylosin in sugar syrup. 1999. *Apidologie* 30: 321-326.

25. Kochansky JP. Evaluation of purification schemes in the determination of tylosin in honey using high performance liquid chromatography. *Journal of Apicultural Research* 2004. 43(2): 60-64.

26. Kochansky JP. Degradation of tylosin residues in honey. *Journal of Apicultural Research* 2004. 43(2): 65-68.

27. Spivak M, Reuter GS. Resistance to American Foulbrood disease by honey bee colonies *Apis mellifera* bred for hygienic behavior. *Apidologie* 2001; 32, 555–565.

28. Palacio MA, Figini E, Martínez A, Bedascarrasbure EL. Avances en comportamiento higiénico. Edición Especial Sanidad Apícola, Campo & Abejas 2005. 1: 55-57.

29. Del Hoyo ML, Basualdo M, Lorenzo MA, Palacio A, Rodríguez EM, Bedascarrasbure E. Effect of shaking honey bee colonies affected by American foulbrood on *Paenibacillus larvae larvae* spore loads. *Journal of Apicultural Research* 2001; 40, 65–69.

## EFFECTOS DE LA APLICACIÓN DE KETAMINA-MIDAZOLAM Y KETAMINA-MIDAZOLAM-EPINEFRINA EN EL CANAL EPIDURAL DEL PERRO

Cruz JM<sup>1</sup>, Giraldo CE<sup>1</sup>, Aristizabal W<sup>2</sup>, Fernández EF<sup>3</sup>, Tovar OE<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias,

<sup>2</sup> Departamento de Física. Universidad de Caldas. Manizales-Colombia

<sup>3</sup> Grupo de Investigación en Ciencias Veterinarias (CIENVET)

**Resumen:** El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad anestésica de la mezcla ketamina-midazolam y ketamina-midazolam-epinefrina en el canal epidural del perro. Se estudiaron tres tratamientos: T1 (Ketamina 3mg / kg + midazolam 0.2mg / kg), T2 (ketamina 3mg / kg + midazolam 0.2mg / Kg + epinefrina 1:80000) y T3 (lidocaína 2%). Se emplearon 9 caninos mestizos, entre 3 y 5 años de edad, de diferente sexo (4 machos, 5 hembras), con una longitud de columna entre 68 y 79 cm, y pesos de 17 a 25 kg; provenientes del bioterio de la Universidad de Caldas. El proyecto contó con el aval del comité de ética de la Universidad de Antioquia. Se utilizó un diseño experimental de bloques completos al azar. Asignando tres caninos al azar a cada uno de los tres tratamientos. El experimento se repitió tres veces en el tiempo en un diseño de entrecruzamiento, permitiendo un tiempo de recuperación entre repeticiones de 15 días. Se determinó el grado de relajación muscular, el grado de disociación y la duración analgésica. El análisis estadístico de los datos se realizó con un análisis de varianza no paramétrico. Se observó una duración analgésica diferente entre los tratamientos, para el T1 y T2 la analgesia permaneció 15 y 105 minutos respectivamente, para el T3 185 minutos. Se observó relajación máxima hasta el minuto 15 para T1, hasta el minuto 25 para T2 y hasta el minuto 90 para el T3. A partir del minuto 5 la intensidad del efecto disociativo disminuyó para los T1 y T2. Se pudo constatar que la adición de epinefrina a la mezcla de K-M aumentó la duración analgésica.

**Palabras claves:** anestesia epidural, caninos, epinefrina, ketamina, midazolam.

## EFFECTS OF THE KETAMINE-MIDAZOLAM AND KETAMINE-MIDAZOLAM-EPINEPHRINE APPLICATION IN THE EPIDURAL CHANNEL OF THE DOG

**Abstracts:** The objective of the present work was to evaluate the analgesic capacity of the application of ketamine-midazolam and ketamine-midazolam-epinephrine in the epidural channel of the dog. Three treatments were studied at random: T1 (Ketamine 3mg/kg - midazolam 0.2mg/kg), T2 (ketamine 3mg/kg-midazolam 0.2mg/Kg - epinephrine 1:80000) and T3 (lidocaine 2%). 9 crossbred canines were used, between 3 and 5 years old, both gender (4 males, 5 females), length of column between 68 and 79 cm, and weights from 17 to 25 kg; coming from of (Laboratory Animal Center) of Caldas University and with the authorization of the committee of ethics of Antioquia University. An experimental design of blocks completes at random was utilized. Assigning three canines at random to each of the three treatments. The experiment was repeated three times over time in a design of intersecting allowing a recovery time between repetitions of 15 days. The degree of muscular relaxation, the degree of dissociation and analgesic duration were determined. The statistical analysis of the data was carried out with an analysis of variance (ANOVA) not parametric. A different analgesic duration between the treatments was observed, for T1 and T2 with a duration of 15 and 105 minutes respectively, for the T3 185 minutes. The maximum relaxation was seen until 15 minutes for T1, until 25 minutes for T2 and until 90 minutes for the T3. Since the minute 5 the intensity of the dissociative effect decreased for the T1 and T2. It noted that the addition of epinephrine to the mix of KM increased the analgesic duration.

**Keywords:** anesthesia epidural, dogs, epinephrine, ketamine, midazolam.

Fecha de recepción: 14/07/09

Fecha de aprobación: 10/12/09

**Dirección para correspondencia:** JM Cruz. Departamento de Salud Animal, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad de Caldas. Calle 65 N° 26-10, Manizales-Colombia

**E-mail:** mario.cruz@ucaldas.edu.co



## INTRODUCCIÓN

Existe una variedad limitada de fármacos para realizar anestesia epidural. Tradicionalmente esta técnica se realiza usando anestésicos locales como lidocaína, mepivacaína y bupivacaína, estas sustancias poseen ventajas y desventajas bien descritas (1, 2). De otra parte, fármacos como los agonistas  $\alpha 2$  y los opiodes representan una alternativa adicional para proporcionar analgesia en dicho espacio (3).

La ketamina es un anestésico disociativo ampliamente usado en veterinaria para la inducción y mantenimiento anestésico, si bien, desde hace varios años se experimenta su utilidad por vía epidural (4, 5, 6) y se sabe que produce un efecto analgésico importante cuando se aplica por esta vía sin la acción irritante observada con los anestésicos locales (7).

El mecanismo de acción de la ketamina como anestésico local ya ha sido descrito (8, 9, 10). El fármaco a nivel local estabiliza la membrana axoplásmica y bloquea los canales de sodio y potasio, lo que impide que se genere un potencial de acción, mecanismo que comparten con los anestésicos locales tradicionales (9, 10, 11). Además, la ketamina bloquea los receptores N-metil-D-asparato (NMDA) presentes en el cordón espinal, y este receptor esta asociado con procesos fisiológicos que median las respuestas nociceptivas crónicas y agudas (6).

Diversos trabajos experimentales han demostrado que la ketamina induce un bloqueo sensorial y motor cuando se aplica en el canal epidural de caninos (12) y equinos (6). De otra parte, existe una extensa experiencia en anestesiología humana utilizando la ketamina epidural como analgésico en el período perioperatorio (13, 14, 15).

Otros experimentos han avalado el efecto de la ketamina a nivel local cuando se aplica con la técnica de anestesia venosa regional (16), o cuando se inyecta alrededor de un nervio periférico, mostrándose efectiva para inducir bloqueo sensitivo (17).

El midazolam es una benzodiazepina con propiedades anticonvulsivas, sedantes y relajantes musculares centrales (18). La administración intratecal o epidural de midazolam se asocia con un efecto antinociceptivo (19) y la capacidad de prolongar el efecto analgésico de otras drogas como los anestésicos locales (20).

Estudios en animales (21) y humanos (15) han demostrado que el midazolam puede aumentar el efecto analgésico de la ketamina vía epidural, ya que potencia los efectos analgésicos de los receptores antagonistas NMDA (21).

Se han agregado diversas sustancias a los anestésicos locales en un intento de prolongar la duración de la acción y proporcionar analgesia postoperatoria (22). Éstas incluyen epinefrina

(23), analgésicos opiodes (24), agentes alpha-2-adrenergicos (25) y ketamina (26, 27).

Ha sido bien establecido el valor de los vasoconstrictores para prolongar la acción de la anestesia local. Sustancias como adrenalina, cobefrin, y fenilefreina han sido estudiadas. Si bien, la adrenalina es la preferida (1, 2).

Este trabajo propuso estudiar el efecto anestésico vía epidural de la ketamina asociada con otros fármacos como epinefrina para retardar su absorción y distribución, y midazolam para potenciar la respuesta farmacológica anestésica.

## MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en la sala de experimentación del área de cirugía del Hospital Diego Villegas Toro de la Universidad de Caldas, Manizales, Colombia.

Los animales de experimentación fueron nueve caninos mestizos, con un rango de edades de 3 a 5 años, de diversos sexos (4 machos, 5 hembras), con una longitud de columna entre 68 y 79 cm, y pesos de 17 a 25 kg, procedentes del bioterio de la Universidad de Caldas. El proyecto contó con la autorización por parte del Comité de Ética de la Universidad de Antioquia.

Se diseñó un instrumento de estimulación térmica como estímulo doloroso, que consiste en un cautín comercial de 40 vatios al cual se le adapta un electrodo de cobre con un área superficial de 33.2 mm<sup>2</sup>, este debía alcanzar una temperatura de 80 +/- 2 °C, la que era controlada por una fuente de voltaje regulada (Protek® modelo 3032B), que permite conectar dos fuentes duales en serie y aplicar una tensión DC (corriente directa) de 50 voltios, regulable mediante un interruptor de voltaje en serie con la fuente. Para la cuantificación de esta temperatura se instaló una Termocupla tipo K (Niquel-Cromo, Niquel) conectada a un multímetro digital (Protek® modelo MAS345) provisto de escala de temperatura.

Los animales fueron sometidos a un ayuno de doce horas, previo a la realización del experimento. Se asignó el tratamiento a evaluar en cada una de las sesiones programadas.

Los animales recibieron una de las siguientes mezclas en el canal epidural según la técnica estándar de la anestesia epidural alta:

Tratamiento 1: Ketamina (3 mg/kg) + Midazolam (0,2 mg /kg)

Tratamiento 2: Ketamina (3 mg/kg) + Midazolam (0,2 mg /kg) + Epinefrina (1:80000)

Tratamiento 3: Lidocaína 2%, 1 ml por cada 10 cm de columna.

El día del experimento, a los caninos se les practicó un examen clínico completo, para garantizar su estado de salud. Posteriormente se rasuro el área lumbosacra y se realizó el procedimiento aséptico en la zona de punción; se canuló con un catéter calibre 22 la vena cefálica

y se infundió suero Ringer-lactato a una velocidad de 10 ml/kg/hora.

Se administró un bolo vía endovenosa de propofol en dosis de 4-6 mg/kg, para inmovilizarlo, una vez se alcanzaba la inconsciencia se coloca una aguja calibre 21 de pulgada y media en el canal epidural para inyectar uno de los tratamientos.

El volumen de la mezcla del tratamiento 1 fue ajustado con Ringer-lactato, de tal manera que por cada 10 cm de columna el animal recibe 1 ml de la mezcla ketamina-midazolam-Ringer-lactato. La columna será medida desde la articulación atlanto-occipital a la primera vértebra coccígea. De otro lado el volumen de la mezcla del tratamiento 2 será ajustado con epinefrina diluida en Ringer-lactato en una concentración de 1:80000.

*Técnicas de estimulación y valoración del dolor:* Los estímulos dolorosos (mecánico y térmico) para evaluar el grado de analgesia, se indujeron luego de la aplicación de cada tratamiento en el canal epidural. Cinco minutos después de la inyección epidural se realizaron los estímulos dolorosos y posteriormente cada cinco minutos los estímulos se repitieron en la piel dorsolateral de los metatarsianos (estímulo térmico) y la piel interdigital (estímulo mecánico).

El aspecto dorsolateral de la piel de los metatarsianos se depiló, y se dibujo en el área una cuadrícula, de tal manera que en cada espacio se realizaba un solo estímulo térmico.

Se evaluaron las variables: grado de relajación muscular en los miembros posteriores y grado de disociación (efecto sistémico de la ketamina). Se calificaron de cero a tres, con cero = si el efecto es nulo, uno= si el es leve, dos= si es moderado y tres = si el efecto es máximo. Todas las variables fueron evaluadas por la misma persona en la totalidad de los procedimientos.

*Estímulo térmico:* Inmediatamente después de la inyección epidural el primer estímulo doloroso con el instrumento térmico se realizó en el miembro anterior (donde se suponía no existía analgesia), registrando el tiempo que el animal tarda en retirar la extremidad. Este tiempo se multiplica por 1,8; el resultado de esta multiplicación se considero el tiempo límite para la estimulación térmica en el miembro posterior. Si después de este tiempo de estímulo térmico el animal no retira la extremidad se considera que existe analgesia y se suspende el estímulo.

*Estímulos mecánicos:* Presión interfalángica por pellizcamiento con los dedos y pinchazo con aguja calibre 21 de pulgada y media, en el miembro posterior. Se consideró como positivo para analgesia el no retiro del miembro tras la realización del estímulo y como negativo cualquier indicio de dolor por parte del animal.

Al finalizar cada ensayo se administró

Ketoprofeno 2 mg/kg/IM, agua fría en la zona de estímulos térmicos y si presentaban algún tipo de quemadura se aplicó sulfato de plata tópico en la zona lesionada. Además se realizó un seguimiento del estado general de salud del animal y de las lesiones locales.

*Respuesta integrada:* Para determinar la intensidad y la duración analgésica, se unificaron los estímulos térmico (T), aguja (A) y pellizco (P) en la variable denominada respuesta integrada, cuando las tres variables fueron positivas al estímulo (el animal respondió a todos estos), la variable respuesta integral fue positiva, igual a (0)= dolor, o negativa (1), cuando persistía la analgesia.

Se debe considerar que la respuesta a un solo estímulo, pero la ausencia de respuesta a otro, tal vez es un arco reflejo y no necesariamente una respuesta al dolor. Se tendrá cuidado al evaluar la percepción del dolor en un animal, ya que se puede obtener un reflejo flexor al pinchar o pellizcar el cojinete.

*Diseño experimental:* Se usó un diseño experimental de bloques completos al azar donde la variable de bloqueo fue sexo. Se utilizaron nueve caninos, asignando tres animales al azar a cada uno de los tres tratamientos. El experimento se repitió tres veces en el tiempo en un diseño de entrecruzamiento, permitiendo un tiempo de recuperación entre repeticiones de 15 días.

*Análisis estadístico:* Para las variables categóricas se usó un análisis de varianza no paramétrico. Las variables térmica, aguja, pellizco y respuesta integral se calificaron en escala binaria (0=dolor, 1=analgesia) y se analizaron con métodos no paramétricos. El análisis se estratificó por momentos para aumentar el poder de detección. Los resultados se interpretan como porcentajes o probabilidades de presentación analgésica a un momento y tratamiento específico.

## RESULTADOS

El efecto de edad, sexo, peso y longitud de columna no afectaron significativamente las respuestas de los tratamientos.

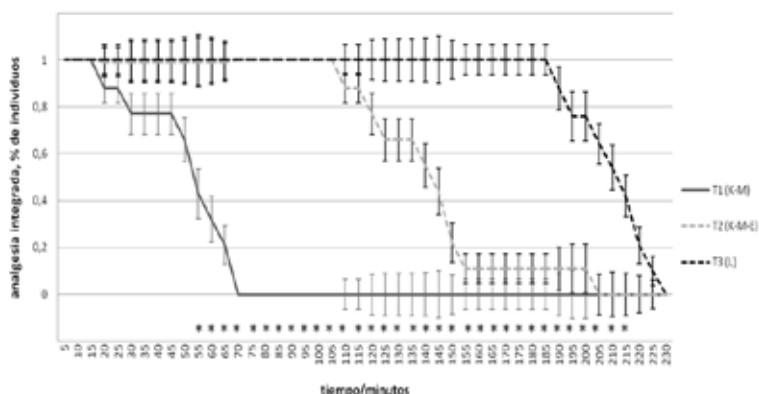
Se observó que los tratamientos mantuvieron un efecto del 100% de diferente duración para la variable analgesia integrada, el T1 hasta el minuto 15, el T2 hasta el minuto 105, y el T3 hasta el minuto 185.

Analgesia integrada no presentó diferencias significativas entre tratamientos hasta el minuto 45. El porcentaje de respuesta de analgesia integrada fue significativamente inferior a partir del minuto 50 para el T1 ( $P < 0,05$ ), el T2 fue significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) al T3 a partir del minuto 125. A partir del minuto 220 no se detectó diferencias significativas de los tratamientos (Figura 1).

La relajación muscular presentó diferentes

Figura 1. Analgesia integrada. Medida con una escala binaria donde 1 = analgesia en la totalidad de los estímulos (térmico, aguja y pellizco) y 0 = pérdida de la analgesia en la totalidad de los estímulos.

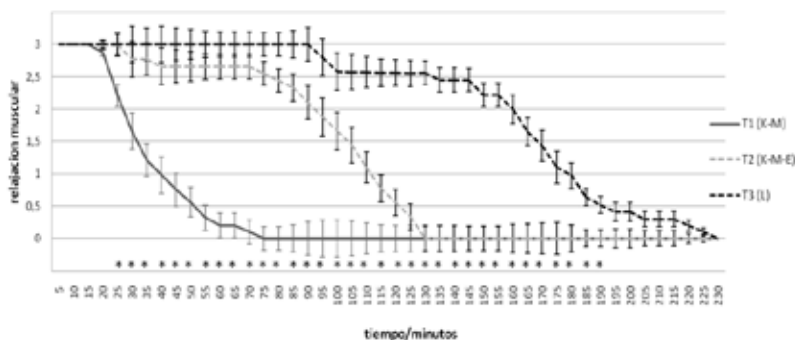
Figure 1. Integrated analgesia. Measured with a binary scale where 1 = analgesia in the totally of the stimulus (thermic, needle and pinch) and 0 = lose of the analgesia in the totally of the stimulus.



Momentos identificados con (\*) Indica un efecto significativo de tratamiento en la prueba de Tukey – Kramer ( $P < 0.05$ ). Moments identified with (\*) indicates a significant effect of treatment in the Tukey – Kramer test. ( $P < 0.05$ ).

Figura 2. Relajación muscular. Medida con una escala categorica donde cero = efecto de relajación nulo, uno = leve, dos = moderado y tres = efecto máximo.

Figure 2. Muscular relaxation. Measured with a categorical scale where zero = absent relaxation effect, one = slight, two= moderate and three = maximum effect.



Momentos identificados con (\*) Indica un efecto significativo de tratamiento en la prueba de Tukey – Kramer ( $P < 0.05$ ). Moments identified with (\*) indicates a significant effect of treatment in the Tukey – Kramer test. ( $P < 0.05$ ).

grados de intensidad en el tiempo; se observó relajación máxima hasta el minuto 15 para el T1, hasta el minuto 25 en el T2 y hasta el minuto 90 el T3.

Relajación muscular no presentó diferencias significativas entre los tratamientos hasta el minuto 25. El grado de relajación muscular en el T1 fue significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) a los otros tratamientos a partir del minuto 30. A partir del minuto 80 el T2 fue significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) al del T3. No se detectó diferencias significativas de tratamientos a partir del minuto 195 (Figura 2).

Hasta el minuto 10, la variable disociación en los tratamientos 1 y 2, no mostró diferencias. En el minuto 15 y 20 el T2 fue significativamente

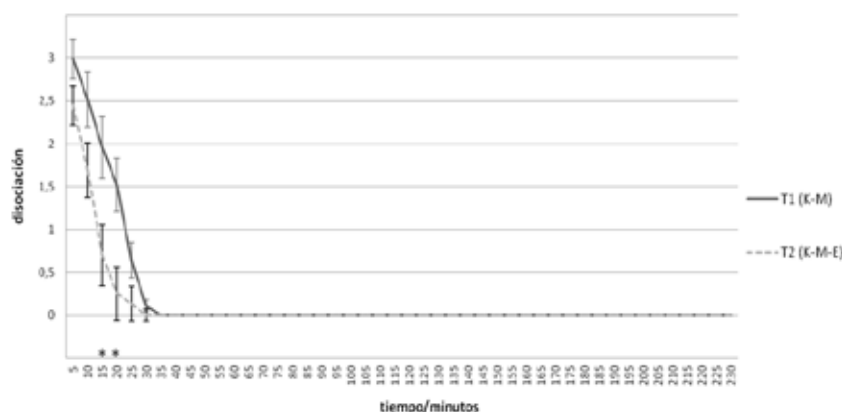
inferior ( $P < 0,05$ ) al T1. A partir del minuto 25 no hay diferencias significativas en los tratamientos (Figura 3).

En el estímulo térmico se observó que el T1 mantuvo una analgesia del 100 % hasta el minuto 10, el T2 hasta el minuto 105, en el T3 hasta el minuto 185. La variable estímulo térmico no presentó diferencias significativas entre los tratamientos hasta el minuto 45. El T1 fue significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) desde el minuto 50, mientras que el T2 al minuto 125. No se detectó diferencias significativas de tratamiento a partir del minuto 220.

En el estímulo con aguja se observó para el T1 analgesia del 100 % hasta el minuto 15, el T2 hasta el minuto 95 y T3 hasta el minuto 180.

Figura 3. Disociación. Medida con una escala categorica donde cero = efecto de disociacion nula, uno = leve, dos = moderado y tres = efecto máximo.

Figure 3. Dissociation. Measured with a categorical scale where zero = absente dissociation effect, one = slight, two = moderate and three = maximum effect.



Momentos identificados con (\*) indica un efecto significativo de tratamiento en la prueba de Tukey – Kramer ( $P < 0.05$ ).

Moments identified with (\*) indicates a significant effect of treatment in the Tukey – Kramer test. ( $P < 0.05$ ).

El estímulo con aguja no presentó diferencias significativas entre los tratamientos hasta el minuto 20. T1 fue significativamente inferior ( $P < 0,05$ ) desde el minuto 25, mientras T2 al minuto 125. No se detectó diferencias significativas de tratamiento desde el minuto 220.

El T2 mantuvo una analgesia del 100 % al estímulo pellizco hasta el minuto 30, el T3 hasta el minuto 165. Esta variable no presentó diferencias significativas hasta el minuto 5 entre tratamientos. El T1 y T2 fueron significativamente inferiores ( $P < 0,05$ ) a partir del minuto 10 y al minuto 110 respectivamente. No se presentó diferencias significativas de tratamiento a partir del minuto 205.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que la mezcla de ketamina (3 mg / kg) + midazolam (0,2 mg /kg) (K-M) y ketamina (3 mg /kg) + midazolam (0,2 mg /kg) + epinefrina (1:80000) (K-M-E), cuando se aplican en el canal epidural del perro producen anestesia con una duración de 15 y 105 minutos respectivamente. Se consideró como anestesia la no respuesta a los tres estímulos dolorosos aplicados en el experimento en el 100% de los individuos.

Los autores no conocen reportes donde se hayan utilizado mezclas de K-M y/o K-M-E en el canal epidural de animales, si bien, la ketamina fue aplicada en el canal epidural de perros (12), equinos (6), cabras (5), ovejas (4) y ratas (28). En todos estos experimentos se observó siempre algún grado de analgesia en la región perineal.

En este trabajo la analgesia inducida por la L tubo una duración de 185 minutos, muy superior a la reportada en la literatura, donde

se describe una duración de acción que ronda los 90 minutos en la anestesia epidural (29). Si bien, algunos investigadores han encontrado una duración de hasta 4 horas para este fármaco cuando se aplica por dicha vía (30).

Los anestésicos locales continúan siendo la primera elección a la hora de realizar una anestesia epidural en animales, algunos estudios demostraron que la combinación de estos fármacos con otras sustancias generan un sinergismo de potenciación en la analgesia, atenuando incluso los efectos adversos. Ejemplos de dichas mezclas incluyen: lidocaína más xilacina, lidocaína más morfina, bupivacaína más morfina y ropivacaína más morfina (3). De otra parte, los anestésicos locales también se han mezclado con ketamina, lo que produce igualmente un sinergismo de potenciación con menos efectos adversos (31).

Se han realizado muchos estudios aplicando ketamina sola o mezclada con otros fármacos por vía epidural en humanos y animales, en estos trabajos se demuestra que la ketamina es eficaz cuando se aplica por esta vía (6, 12). No obstante, en humanos los resultados de estos experimentos no han sido homogéneos. De un lado, en un estudio se encontró que la aplicación de 30 mg de ketamina por vía epidural produjo un potente efecto analgésico, sin depresión respiratoria o disturbios psíquicos (32). Mientras que en otro trabajo, se describió que esta misma dosis, no solo, no produjo analgesia adecuada, sino que se asoció a efectos desagradables en los pacientes (33).

Otros experimentos en animales no han mostrado resultados consistentes con lo hallado en este trabajo, en equinos una dosis de 2 mg / kg aplicada por vía epidural produjo un período

analgésico de 30 minutos (6), mientras que en nuestro trabajo una dosis superior (3 mg/Kg) de ketamina mezclada con midazolam indujo anestesia de 15 minutos de duración. A la luz de los experimentos de Xin et al. (15), la adición de midazolam debería prolongar el efecto de la ketamina, ya que cuando estos investigadores aplicaron juntos estos fármacos en el canal epidural de personas, observaron que el midazolam prolongaba la eliminación de la ketamina.

En este estudio la aplicación de la mezcla K-M produjo un bloqueo sensorial y motor menos consistente que la mezcla K-M-E, algunos investigadores ya habían informado que la aplicación de ketamina sin epinefrina en el canal epidural producía un efecto de corta duración (33).

Cuando la ketamina se aplica cerca de un nervio periférico induce un bloqueo de conducción (17), cuya duración no depende de la dosis, ya que la ketamina se adsorbe rápidamente a la circulación, factor limitante en la duración del efecto, si el fármaco no se aplica con epinefrina.

Luego de la aplicación de K-M, K-M-E y L en el canal epidural de los perros de este estudio, se observó relajación inmediata del esfínter anal y la cola, los estímulos dolorosos no fueron aplicados sino hasta pasados cinco minutos tras la inyección de los fármacos, en este momento pudo constatar que además de un efecto analgésico, existía relajación muscular intensa en todos los tratamientos. Se observó relajación máxima hasta el minuto 15 para K-M, hasta el minuto 25 para K-M-E y hasta el minuto 90 para L. Estos hallazgos sugieren que el periodo patente de los tres tratamientos posiblemente es igual o inferior a cinco minutos. El inicio de acción de otros fármacos aplicados por vía epidural es usualmente largo, 30 minutos para la morfina (34) y 20 minutos para la xilacina (35).

La variable disociación se tomo en cuenta para las mezclas que incluían ketamina ya que este fármaco genera un estado disociativo a nivel sistémico. A partir del minuto 5 los grados de disociación disminuyen para las mezclas K-M y K-M-E; y los signos propios de dicho estado desaparecieron rápidamente.

En este estudio se pudo constatar que la adición de epinefrina a la mezcla de K-M aumento la duración de la analgesia, posiblemente por disminuir la cantidad de fármaco que se adsorbe por vía vascular, permitiendo que una mayor masa molecular alcanzara la membrana del nervio, aumentando la densidad y duración del bloqueo nervioso.

Una de las condiciones de la anestesia epidural es que el paciente debe estar sedado o anestesiado para soportar la punción en dicho espacio (29), en este trabajo se indujo restricción química con una dosis de propofol de 4-6 mg / kg

/ IV, lo que permitió aplicar las mezclas de K-M y K-M-E y L sin molestias para el animal. Cinco minutos después de la punción epidural se aplicó un estímulo doloroso térmico en el miembro anterior y en todos los animales se obtuvo retirada de la extremidad en 1-2 segundos, lo que se interpretó como ausencia de interferencia del propofol para evaluar el grado de dolor en las extremidades posteriores, aunque el paciente presentara aun cierto grado de sedación.

La ketamina actúa de diferentes formas, se sabe que bloquea los receptores NMDA (33), se une a los receptores opiodes (36), y también se une a receptores del tipo monoaminérgicos (37). De otra parte, la ketamina, bloquea los canales de sodio (11) y potasio (9) en la membrana axoplásmica y de esta manera impide la generación de un impulso nervioso, mecanismo que comparte con los anestésicos locales tradicionales. Con todo, el mecanismo exacto de su efecto a nivel del cordón espinal no está esclarecido, posiblemente es una combinación de la acción sobre todos o parte de estos receptores.

En este trabajo se realizaron tres estímulos nocivos diferentes, que fueron pinchazo, pellizco y aplicación de calor. Se considero que la analgesia que proporciona la mezcla de K-M o K-M-E desaparece cuando el animal respondía a los tres estímulos. Se debe considerar que la respuesta a un solo estímulo, pero la ausencia a los otros tal vez es un arco reflejo y no necesariamente una respuesta integrada al dolor. Según lo explica Santoscoy (2007), se tendrá cuidado al evaluar la percepción del dolor en un animal, ya que se puede obtener un reflejo flexor al pinchar o pellizcar el cojinete, por eso la variable integrada exige que no exista respuesta a ningún estímulo para considerar que existe analgesia.

No se registraron efectos adversos tras la aplicación de las mezclas K-M, K-M-E, lo que puede hacer suponer una seguridad biológica para las mismas cuando se aplican por vía epidural. La biodisponibilidad sistémica de las drogas administradas en el espacio epidural describe una curva de disposición similar a la observada luego de una administración parenteral no intravenosa (29). Como la masa total del fármaco empleado es sustancialmente menor en el bloqueo nervioso, se advierten niveles plasmáticos menores, los cuales rara vez superan los necesarios para provocar efectos adversos (29).

El instrumento de estimulación térmica sirvió para medir objetivamente la percepción del dolor a través del reflejo de retirada. No se presentaron alteraciones de tipo físico o infeccioso en las zonas de aplicación de los estímulos de dolor en el animal.

La lidocaína se mostró como un fármaco superior a K-M y K-M-E, con una relajación muscular y analgesia mayor. En opinión de los

autores seguirá siendo el fármaco de elección en clínica para aplicación epidural.

Se pudo constatar que la adición de epinefrina a la mezcla de K-M aumento la duración analgésica.

Si bien la ketamina a nivel epidural ha sido contradictoria, en este trabajo K-M-E se mostró eficaz y constante en el efecto analgésico; este tratamiento puede llegar a ser utilizado como anestésico en procedimientos quirúrgicos menores a 1 hora.

El instrumento de estimulación térmica utilizado en este trabajo fue confiable para inducir estímulos dolorosos y puede recomendarse en trabajos de valoración del dolor.

## BIBLIOGRAFÍA

- Collins VJ. Anestesiología. 3ª Ed, Mexico: McGraw-Hill; 1996: p743-758.
- Booth NH, McDonald LE. Farmacología y Terapéutica Veterinaria. 5ª ed. Zaragoza: Editorial Acribia; 1988.
- Lumb WV, Jones EW. Spinal anesthesia. In: Veterinary Anesthesia. 2ed. Philadelphia. Lea & Febiger, 1984. P408-415.
- Guedes A, Pluhar E, Daubs B; Rudé E. Effects of preoperative epidural administration of racemic ketamina for analgesia in sheep undergoing surgery. American Journal of Veterinary Research 2006; 67:222-228.
- De Rossi R, Junqueira AL. Analgesic and systemic effects of ketamine, xylazine, and lidocaine after subarachnoid administration in goats. Am J Vet Res. 2003; 64(1):51-6.
- Gomez de Segura I, de Rossi R, Santos M. Epidural injection of ketamine for perineal analgesia in the horse. Veterinary Anesthesiology 2003; 27:384-391.
- Arcusa Mon MJ. Estudio de toxicidad aguda de s(+) ketamina y r(-) ketamina administrada por vía subaracnoidea en conejos. Comparación con lidocaína [tesis doctoral]. Valencia: Universidad de Valencia; 2005.
- Bräu ME, Sander F, Vogel W, et al. Blocking mechanisms of ketamina and its enantiomers in enzymatically demyelinated peripheral nerve as revealed by single-channel experiments. Anesthesiology 1997; 86:394-404.
- Arhem P, Ridqvist B. The mechanism of action of ketamine on the myelinated nerve membrane. European Journal of Pharmacology 1986; 126:245-51.
- Weber WV, Kahama S, Jawaiekar SR. The effect of ketamine on nerve conduction in isolate sciatic nerves of the toad. Neuroscience Letters 1975; 1:115-120.
- Shrivastav BB. Mechanism of ketamina block of nerve conduction. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapy 1977; 201:162-9.
- Dowdy EG, Kaya K, Gocho Y. Some pharmacologic similarities of ketamina, lidocaine, procaine. Anesthesia and Analgesia 1973; 52:839-842.
- Wilson J, Nimmo A, Fleetwood-Walker S, Colvin L. A randomized double blind trial of the effect of pre-emptive epidural ketamina on persistent pain after lower limb amputation. Pain. 135 (1): 108-118.
- Cánovas ML, Barros NC, Gómez P A, González GD, Castro BM, Castro A. Eficacia analgésica de la asociación ketamina más morfina epidural: experiencia en 75 casos. Revista de la Sociedad Española del Dolor 2002; 9:140-145.
- Xin W, Hong x, Guolin W. Improved postoperative analgesia with coadministration of preoperative ketamina and midazolam. Journal of Clinical Anaesthesia. 2006; 18:563-569.
- Reboso JA, Gonzalez F. Ketamina. Revista Española de Anestesiología y Reanimación 1999; 46:111-122.
- López Sanromán F, Cruz JM, Santos M, Manzini R, Tabanera A, Tendillo J. Evaluation of the local analgesic effect of ketamine in the palmar digital nerve block at the base of proximal sesamoid (abaxial sesamoid block) in horses. American Journal of Veterinary Research 2003; 64:475-477.
- Rebuelto M, Montoya L, Ambros L, Waxman S, Grubissich J. Estudio cronobiológico de la respuesta farmacológica de la combinación ketamina midazolam en perros. InVet 2003; 5(1):83-90.
- Nishiyama T, Hanaoka K. Effect of diluent volume on post-operative analgesia and sedation produced by epidurally administered midazolam. European Journal of Anaesthesiology 1998; 15:275- 9.
- Kim MH, Lee YM. Intrathecal midazolam increases the analgesic effect of spinal blockade with bupivacaine in patines undergoing haemorrhoidectomy. British Journal of Anaesthesia 2001; 83:77-79.
- Nishiyama T, Gyermek L, Lee C, Kawasaki-Yatsugi S, Yamaguchi T. Synergistic analgesic effects of intrathecal midazolam and NMDA or AMPA receptor antagonists in rats. Can J Anaesth 2001;48:288- 94.
- Koinig H, Marhofwer P. Analgesic effects of caudal and intramuscular 5 (+) Ketamine in children. Anesthesiology 2000; 93:976-80.
- Warner MA, Kunkel SE, Offord KO, Atchison SR, Dawson B. The effect of age, epinephrine, and operative site on duration of caudal analgesia in pediatric patients. Anesthesia and Analgesia 1987; 66:995-998.
- Wolf AR, Hughes D, Wade A, Mather SJ, Prys-Roberts C. Postoperative analgesia after pediatric orchidopexy: Evaluation of a bupivacaine-morphine mixture. British Journal Anaesthesia 1990; 64:430-435.
- Jamali S, Monin S, Begon C, Dubosset AM, Ecoffey C. Clonidine in pediatric caudal anaesthesia. Anesthesia and Analgesia 1994; 78:663-666.
- Cook B, Grubb DJ, Aldridge LA, Doyle E. Comparison of the effects of adrenaline, clonidine and ketamina on the duration of caudal analgesia produced by bupivacaine in children. British Journal of Anaesthesia 1995; 75:698-701.
- Naguib M, Sharif A, Seraj M, El Gammel M, Dawlaty AA. Ketamine for caudal analgesia in children: Comparison with caudal bupivacaine. British Journal of Anaesthesia 1991; 67:559-564.
- Ahuja B. Analgesic effect of intrathecal ketmanie

**J. Cruz y col.**

in rats. *British Journal of anaesthesia* 1983; 55:991-995.

29. Otero Pablo E. Dolor Evaluación y tratamiento en pequeños animales. In: Intermedica, editores. Administración epidural y espinal de analgésicos. Primera edición Buenos Aires 2004.p 185-204.

30. Jones RS. Epidural analgesia in the dog and cat. *Veterinary J* 2001; 161(2):123-31.

31. Rivera Ordóñez A, Rivera Flores J. Analgesia postoperatoria vía epidural: Ketamina + bupivacaína vs bupivacaína en cirugía de cadera y fémur. *Revista Mexicana de Anestesiología* 2005. 28(1):14-19.

32. Naguid M, Adu-Gyamfi Y, Absood GH, et al. Epidural ketamine for posoperative analgesia. *Canadian Anaesth Soc J* 1985. 64: 16-21.

33. Hirota K, Lambert DG. Ketamine: its mechanism(s) of action and unusual clinical uses *British Journal of Anesthesia* 1996,77(4):441-443.

34. Valverde A, Little CB, Dyson Dh, et al. Use of epidural morphine to relieve pain in a horses. *Can Vet J* 31:211-212, 1990.

35. LeBlanc PH, Caron JP, Pattreson JS, et al. Epidural injection of xilaxine for perineal analgesia in horses. *JAVMA*. 193:389-391, 1998.

36. Smith DJ, Pekoe GM. Ketamine analgesia: meditation by biogenic amine and endogenous opiate processes. *Anaesthesiology* 1980;51:36.

37. Nishimura N, Sato K. Ketamine stereoselectively inhibits rat dopamine transporter. *Neuroscience Letters* 1999; 274:131-134.

38. Santoscoy Mejía EC. Ortopedia, neurología y rehabilitación en pequeñas especies. Perros y gatos. Manual Moderno 1a. Edición 2008; p376.

## CANINE CEREBELLAR CORTICAL ABIOTROPHY IN TWO MIXED BREED LITTERMATES

del Amo AN<sup>1</sup>, Diessler ME<sup>2,3</sup>, Massone AR<sup>2</sup>, Idiart JR<sup>2</sup>, Portiansky EL<sup>2</sup>

1-Small Animal Clinics, 2-Institute of Pathology, 3-Histology and Embriology.  
School of Veterinary Sciences, La Plata Nacional University.

**Abstract:** Neuronal abiotrophy is an inherited premature degeneration of neurons due to an abnormality of the cell metabolism, which often begins in the first months of life. Onset of signs is progressive and occurs weeks or even years later. The aim of the work was to describe 2 cases of canine abiotrophy in mixed breed littermates. Two 45-day-old male and female puppies from a litter of four were examined due to muscle tremors and ataxia. Affected puppies exhibited ataxia, wide based stance, loss of balance, vocalization and head tilt to the left side. Postural reactions were slowed down and there was loss of menance response. When inability to stand worsened, euthanasia and necropsy were performed. Samples were collected for histopathological studies. Number of Purkinje cells was calculated by means of morphometric analysis. Lectin histochemistry was performed in affected and normal tissues. Reduction in cerebellar size was observed. Comparing to control tissues, a marked decrease in Purkinje cells was found. They were eosinophilic and swollen. Differences in cellular count (normal/ death) in normal and affected cerebellum were significant. None of the lectins tested showed affinity for cytoplasmic components. Differential diagnoses were excluded owing to course, clinical, pathological, image analysis and lectin histochemical findings.

**Key words:** ataxia - cerebellum - abiotrophy - Purkinje cells

## ABIOTROFIA CEREBELAR CORTICAL EN DOS CANINOS MESTIZOS HERMANOS

**Resumen:** La abiotrofia neuronal es una degeneración prematura de neuronas debida a una anomalía hereditaria del metabolismo celular, que comienza en los primeros meses de vida. La aparición de los signos ocurre semanas o incluso años más tarde, y el déficit es progresivo. El objetivo del trabajo fue describir 2 casos de abiotrofia en caninos hermanos mestizos. Un macho y una hembra de 45 días de una camada de 4 fueron examinados debido a temblores y ataxia de los 4 miembros. Los cachorros enfermos exhibían ampliación de la base de sustentación, pérdida del equilibrio, vocalización, inclinación de la cabeza hacia la izquierda, reacciones posturales enlentecidas y respuesta a la amenaza disminuida. Cuando fueron incapaces de mantenerse en estación se llevaron a cabo la eutanasia e inmediata necropsia. Se tomaron muestras para estudios histopatológico. Los análisis morfométrico (número de células de Purkinje) y lectinohistoquímico se llevaron a cabo en tejidos afectados y en un control normal. Se observó reducción del tamaño cerebelar y significativa disminución del número de células de Purkinje, que se observaron tumefactas y eosinófilas. Las lectinas no mostraron afinidad por componentes citoplasmáticos. Los diagnósticos diferenciales fueron excluidos debido al curso, examen clínico y análisis histopatológico, lectinohistoquímico y de imágenes.

**Palabras claves:** ataxia - cerebelo- abiotrofia – células de Purkinje

Fecha de recepción: 11/09/08

Fecha de aprobación: 22/09/09

**Dirección para correspondencia:** A del Amo, Cátedra de Clínica de Pequeños Animales. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

**E-mail:** adelamo@fcv.unlp.edu.ar



## INTRODUCTION

“Abiotrophy” means lack of a life-sustaining factor, but it does not refer to the specific nature of the metabolic disturbance. Neuronal abiotrophy is a primary premature degeneration of neurons (1, 2). This disorder is due to an intrinsic inherited development abnormality of the cell metabolism causing its death (3).

Channelopathies followed by exocytotoxicity and apoptosis of neurons has been suggested as a mechanism of disease (4). Nucleotide repeats, an aberration causing spinocerebellar ataxias in humans, might be involved in abiotrophy (5). Nevertheless, the pathogenesis remains obscure (1, 2).

Examples of human abiotrophic diseases (Alzheimer and Parkinson’s diseases) have been considered to reflect accelerated neuronal aging. In the abiotrophies described in animals, neurological deficit is postnatal, progressive and does not result from an acquired injury either, but often begins in the first months of life (1). In dogs, cerebellar ataxia has been described in many breeds (6, 7, 8). Affected dogs present neurological normality at birth or at the time of ambulation. Onset of signs occur weeks, months or even years later (1, 5, 9). Cerebellar deficit is progressive or reaches static periods before worsening. Sometimes the condition stabilizes, but this is not common (1, 2, 6). Clinical manifestations are: cerebellar and truncal ataxia, head tremor, symmetrical hypermetria, spasticity, broad-based stance, loss of balance and dysmetria (10). Symmetric or asymmetric reduced cerebellar size is the main lesion found later in the course of abiotrophy. Microscopically, degeneration and loss of Purkinje neurons in an otherwise normally developed cerebellum is observed (2). The following case describes the cerebellar abiotrophy found in two mixed breed puppies.

## MATERIALS AND METHODS

Two 45-day-old male and female puppies in a litter of four were presented due to muscle tremors while walking and ataxia of 3 days duration. Dogs were evaluated every four days during the following twelve days. When inability to stand worsened, euthanasia and necropsy were performed. Samples were collected for histopathological studies. Control samples from a 2-months-old normal dog were processed. The number of Purkinje cells was calculated by means of morphometric analysis. For this purpose, at least ten histological images were captured from each sample using an analogical video camera connected to the computer containing an image analysis software (ImagePro Plus, v4.5, Media Cybernetics, USA). Data was analyzed using the Student’s t test. Lectin histochemical labeling was performed to demonstrate lysosomal stor-

age products in the neurons or rule out this entity. Affected and normal tissues were labeled using: *Dolichos biflorus* (DBA), *Glycine max* (SBA), *Triticum vulgare* (WGA), Succinyl-WGA (WGAs), *Ulex europaeus*-I (UEA-1), *Concanavalia ensiformis* (Con A), *Arachis hypogaea* (PNA), and *Bandeirea simplicifolia* lectin I (BSL-I) (Lectin kit Biotinylated BK-1000, Vector laboratories, Inc. Burlingame, CA.)

## RESULTS

Affected puppies were normal shortly before the time of consultation. Physical examination revealed an abnormal gait with ataxia of the four limbs, hypermetric steps, muscle tremors which worsened with excitement, wide based stance, loss of balance and vocalization. Ataxia was asymmetric, with periodic falling to the left. Affected animals hardly stand. Postural reactions were slowed down and there was a progressive loss of menace response and head tilt to the left side. Paresis, weakness, circling, alteration of spinal reflexes, vision or mental status were not observed. Eating and drinking were normal.

**1A.** Cerebellum of the male dog. The left lobe is markedly reduced. **B.** Abiotrophic cerebellum showing a marked decrease of Purkinje cells number and degeneration of the remaining cells. HE. Bar = 10µm.

**1A.** Cerebelo del cachorro macho. El lóbulo izquierdo está marcadamente reducido. **B.** Cerebelo con abiotrofia mostrando una marcada disminución del número de las células de Purkinje y degeneración de las restantes. HE. Bar = 10µm.

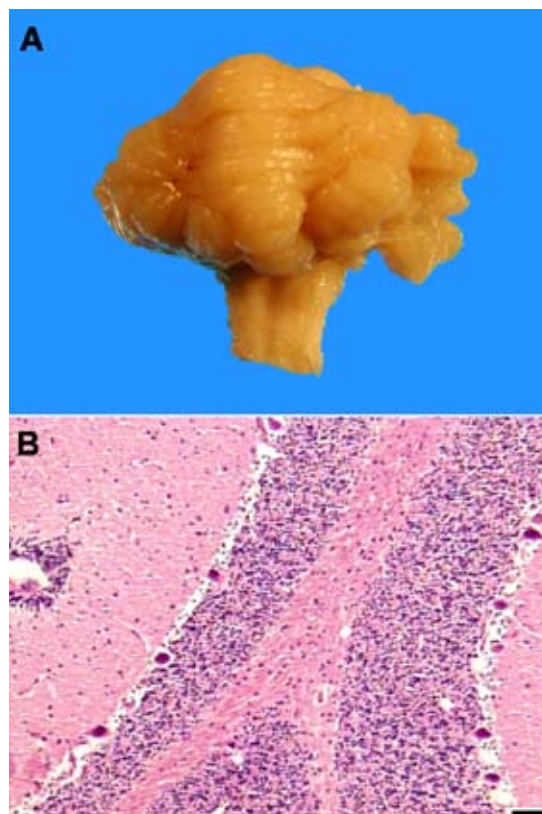


Table 1. Number of alive/dead cells in the cerebellum of a normal puppy and of those suffering abiotrophy.

Tabla 1. Número de células vivas/muertas en el cerebelo de un cachorro normal y de aquellos que padecían abiotrofia.

Puppies	Alive cells	Dead cells	p value (a)
Abiotrophy	83 (41.50)	117 (58.50)	0.1079
Normal	160 (80.00)	40 (20.00)	0.0015 *
p value (b)	0.0028 *	0.0076 *	

Values indicate the amount of dead or alive cells over 200 counted cells. The corresponding percentage is shown in parenthesis. The Student's t test was applied. (a) alive vs. dead cells (b) abiotrophy vs. normal.

\* Significant.

Table 2. Number of alive/dead cells in the cerebellum of a normal puppy and of those suffering abiotrophy per unit length.

Tabla 2. Número de células vivas/muertas en el cerebelo de un cachorro normal y de aquellos que padecían abiotrofia por unidad de longitud.

Puppies	Alive cells	Dead cells	Total count	p value (a)
Abiotrophy	6 (42.86)	8 (57.14)	14	0.0989
Normal	14 (82.35)	3 (17.65)	17	0.0004 *
p value (b)	0.0002 *	0.0138 *		

Values indicate the amount of dead or alive cells over 1000  $\mu$ m length considered. The corresponding percentage is shown in parenthesis. The Student's t test was applied. (a) alive vs. dead cells (b) abiotrophy vs. normal. \* Significant.

At necropsy, reduction in cerebellar size was observed. The vermis, declive and folium were as narrow as the tuber, lateral lobes were small and the folia of the dorsal surface were not very obvious. The cerebellum of the male presented a markedly reduced left lateral lobe (A). Degeneration of Purkinje cells was observed. They were dark, eosinophilic and swollen, and some nuclei were absent (B). Differences in cellular count in normal and affected cerebellum were significant. None of the lectins showed affinity for cytoplasmic components.

## DISCUSSION

Littermates were presented after a 3 days history of a clinical picture consistent with a diffuse cerebellar lesion. Head tilt was a paradoxical central vestibular sign attributed to a damaged flocculonodular lobe. A congenital disorder was suspected due to the age of the animals. These clinical signs raised some differential diagnosis, namely cerebellar hypoplasia, cerebellar abi-

otrophy, multisystem neuronal abiotrophy and storage diseases. Cerebellar hypoplasia usually appears at birth without progression. Conversely, these puppies were normal in appearance until 42 days of age and deteriorated progressively. This supports the diagnosis of a progressive disorder. Furthermore, in both affected cerebella all layers were completely organized, but there were loss or degenerative changes of Purkinje cells, unlike lesions found in typical hypoplasia. Multisystem neuronal abiotrophy was ruled out because of the absence of neurological deficit other than the cerebellar signs. Abnormal storage products were not observed during histopathological and lectin histochemical analysis. Evolution, clinical, gross, histopathological, lectin histochemical, and morphometric findings were indicative of cerebellar abiotrophy.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors thank Mrs C. Aralda and Mrs L. Díaz for their histotechnical support.

## REFERENCES

- 1- Summers BA, Cummings JF, de Lahunta A. Veterinary Neuropathology. Mosby, Missouri (USA), 1995; p. 185-86, 300-306.
- 2- Storts RW, Montgomery DL. The nervous system. In: Mc Gavin MD, WW Carlton, JF Zachary. Thompson's Special Veterinary Pathology. 3<sup>rd</sup> ed. Mosby, Inc., St Louis (USA), 2001; p. 381-450.
- 3- Kent M, Glass E, de Lahunta A. Cerebellar cortical abiotrophy in a beagle. J of Small An Pract 2000; 41: 321-323.
- 4- Sandy JR, Slocombe RE, Mitten RW *et al.* Cerebellar abiotrophy in a family of Border Collie dogs. Vet Pathol 2002; 39 (6): 736-738.
- 5- Olby N, Blot S, Thibaud JL *et al.* Cerebellar cortical degeneration in adult American Staffordshire Terriers. J Vet Intern Med 2004; 18: 201-208.
- 6- de Lahunta A. Abiotrophy in domestic animals: a review. Can J of Vet Res 1990; 54 (1): 65-76.
- 7- Gandini G, Botteron C, Brini E *et al.* Cerebellar cortical degeneration in three English Bulldogs: clinical and neuropathological findings. J Small Animal Practice 2005; 46 (6): 291-294.
- 8- Buijtel JJ, Kroeze EJ, Voorthout G *et al.* Cerebellar cortical degeneration in an American Staffordshire terrier. Tijdschr Diergeneeskde 2006; 131 (14-15): 518-22.
- 9- Taylor SM. Anormalidades en la locomoción. In: Nelson RW, CG Couto. Medicina Interna de Animales Pequeños. 2<sup>nd</sup> ed. Intermédica, Buenos Aires (Argentina), 2000, p. 1032-1042.
- 10- Fenner WR. Diseases of the brain. In: Ettinger SJ, EC Feldman. Textbook of Veterinary Internal Medicine. Diseases of the dog and the cat. 4<sup>th</sup> ed. WB Saunders, Philadelphia (USA), 1995, p. 578-629.

## TRASPLANTE DE UN MELANOMA CANINO EN RATONES INMUNODEFICIENTES DE LA CEPA N:NIH (S)-Fox1<sup>nu</sup>: ESTUDIOS PRELIMINARES

Cuitiño MC<sup>1,3</sup>, Ayala M<sup>2</sup>, Cagliada P<sup>2</sup>, Carriquiriborde M<sup>2</sup>, Idiart JR<sup>1</sup>, Massone AR<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Patología Especial y <sup>2</sup>Cátedra de Animales de Laboratorio, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

<sup>3</sup> Becaria Comisión Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

**Resumen:** Con el objetivo de evaluar la viabilidad del trasplante de un melanoma canino en ratones inmunodeficientes, 3 ratones N:NIH (S)-Fox1<sup>nu</sup> libres de patógenos específicos de 6 semanas de edad se trasplantaron por vía subcutánea con una fracción de un melanoma vulvar canino. Al 5° día se sacrificó uno de estos animales, realizando el pasaje en 8 ratones de la misma cepa y edad, los que se sacrificaron a los 5, 13, 20 y 27 días. En la necropsia, en todos los animales se observaron neoformaciones nodulares negras con áreas amarillentas, de crecimiento rápido, rodeadas por tejido conectivo. El tamaño fue de 0,5 a 1,4 cm de diámetro. En el estudio histopatológico se confirmó la presencia de melanocitos neoplásicos como acúmulos densos, delimitando, en la mayoría de los casos, un centro de necrosis. Estos resultados indican que es viable el trasplante del melanoma canino en ratones inmunodeficientes, lo que posibilitaría el desarrollo de un modelo para su estudio.

**Palabras clave:** melanoma canino, trasplante, ratones inmunodeficientes, modelo murino

## CANINE MELANOMA TRANSPLANTATION IN IMMUNODEFICIENT IN:NIH (S)-Fox1<sup>nu</sup> MICE STRAIN: A PRELIMINARY STUDY

**Abstract:** The aim of this study was to evaluate the viability of canine melanoma transplantation in immunodeficient mice. A piece of a spontaneous canine vulvar melanoma was inoculated subcutaneously into 3 N:NIH (S)-Fox1<sup>nu</sup> specific pathogen free mice. One of those was killed 5 days later. The tumour was re-inoculated into 8 mice, which were killed at 5, 13, 20 and 27 days. At necropsy an encapsulated nodule, black to yellow, varying in size from 0.5 to 1.4 cm in diameter was observed in all of the mice. Histological examination confirmed the presence of neoplastic melanocytes arranged in clusters, surrounding a necrotic area. These preliminary results suggest that canine melanoma transplantation in nude mice is feasible and that the development of a canine melanoma mouse model might be considered.

**Key words:** canine melanoma, transplantation, immunodeficient mice, mouse model

Fecha de recepción: 17/09/08

Fecha de aprobación: 20/04/09

---

**Dirección para correspondencia:** MC Cuitiño, Cátedra Patología Especial. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

**E-mail:** mccuitino@fcv.unlp.edu.ar

---

## INTRODUCCIÓN

Los neoplasias melanocíticas (NM) en caninos son relativamente frecuentes. Los sitios más comúnmente afectados son la piel, la mucosa oral y, en menor medida, el ojo (1). En años recientes se ha observado un continuo aumento en la incidencia de NM en el hombre en todo el mundo (2). Considerando que los animales de compañía se encuentran expuestos a los mismos factores ambientales que sus propietarios, dicho incremento promueve el interés por el estudio de estos tumores en medicina veterinaria (3). Hasta el momento, según nuestro conocimiento, no se han comunicado experiencias concluyentes en la estandarización de un modelo murino de melanoma canino. El desarrollo de un modelo murino para el estudio de las NM permitiría superar algunas de las limitaciones que conlleva el trabajar sólo con los casos espontáneos (4). El objetivo de este trabajo fue evaluar la viabilidad del trasplante de un melanoma canino de aparición espontánea en ratones inmunodeficientes N:NIH (S)-*Fox1<sup>nu</sup>*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 11 ratones hembra N:NIH (S)-*Fox1<sup>nu</sup>*, de 6 semanas de edad, libres de patógenos específicos, producidos bajo barreras sanitarias en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinaria, Universidad Nacional de La Plata. Los animales se alojaron en cajas de acero inoxidable, con cama de viruta, agua de bebida y alimento estéril. Se mantuvieron en una cabina aisladora, con temperatura de 22 +/-1 °C, con 12 horas luz/oscuridad y 15 recambios de aire por hora. Tres ratones se anestesiaron con una mezcla de ketamina/xilacina (80-100 mg/kg + 10 mg/kg) por vía intraperitoneal y se les trasplantó una fracción de un melanoma vulvar canino en el tejido subcutáneo del dorso. Al quinto día se sacrificó un animal y se realizó el pasaje en 8 ratones de la misma cepa y edad mediante el procedimiento antes mencionado. Los animales trasplantados fueron sacrificados a los 5, 13, 20 y 27 días. Para el sacrificio se utilizó una mezcla de CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. Se realizó la necropsia y se obtuvieron muestras para estudios histopatológicos. El presente trabajo se desarrolló de acuerdo con las recomendaciones internacionales para el cuidado y uso de los animales de laboratorio (*Canadian Council on Animal Care, CCAC*) (5, 6).

## RESULTADOS

En todos los animales se constató el crecimiento gradual de una neoformación de color negro en el sitio de inoculación. A la necropsia se observó una masa nodular de color negro con áreas amarillentas, friable, rodeada por una fina cápsula de tejido conectivo (figuras 1 y 2).

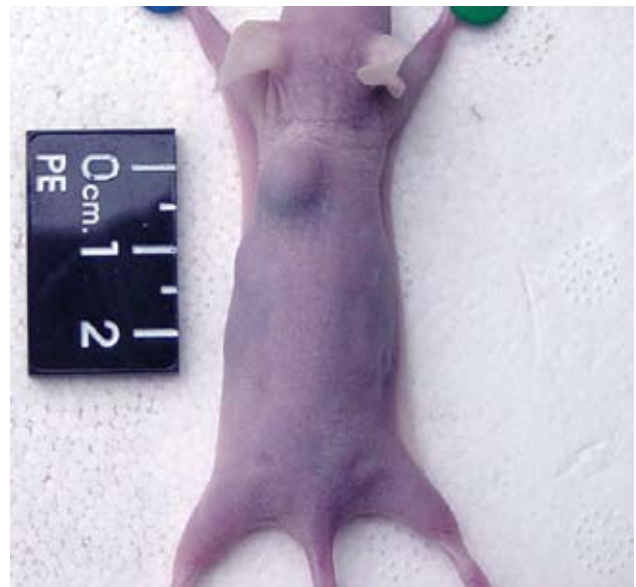


Figura 1. Masa nodular en el tejido subcutáneo del dorso.

Figure 1. Nodular mass in dorsal subcutaneous tissue.

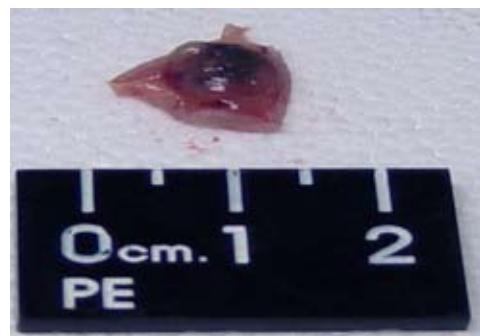


Figura 2. Nódulo subcutáneo, circunscrito, negro con áreas amarillentas.

Figure 2. Black to yellow, circumscribed subcutaneous nodule.

El tamaño de la neoplasia varió desde 0,5 hasta 1,4 centímetros de diámetro. En algunos casos se apreciaron vasos sanguíneos en el tejido circundante. No se observaron lesiones en otras localizaciones. En el estudio histopatológico se confirmó la presencia de melanocitos neoplásicos. Estas células se presentaron como acúmulos densos en el tejido subcutáneo del sitio de inoculación, delimitando, en la mayoría de los casos, un centro de necrosis caseosa (figuras 3 y 4). Ocasionalmente se apreció invasión a los planos musculares y al pániculo adiposo.

## DISCUSIÓN

El desarrollo de modelos animales para el estudio del melanoma humano ha favorecido la comprensión de aspectos relacionados con la génesis y progresión de esta neoplasia (7). Según nuestro conocimiento, esta es una de

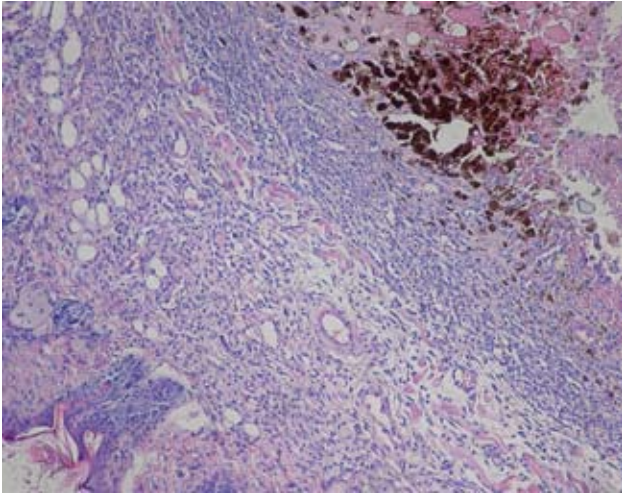


Figura 3. Melanocitos neoplásicos delimitando un centro de necrosis. H&E (obj. 20x).

Figure 3. Neoplastic melanocytes surrounding a necrotic area. H&E (obj. 20x).

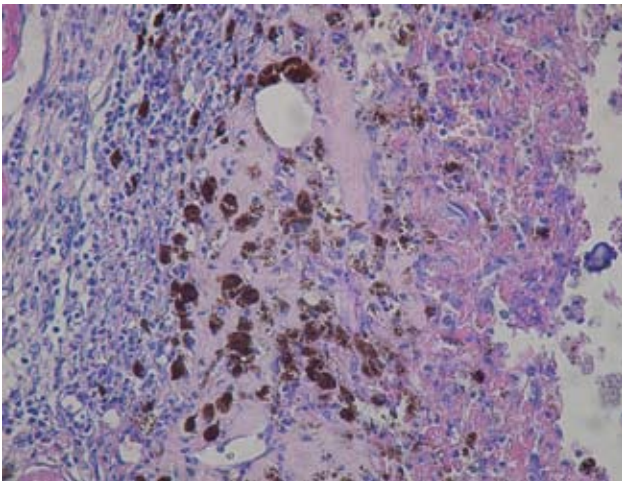


Figura 4. Detalle de la figura 3. H&E (obj. 40x).

Figure 4. Higher magnification of figure 3. H&E (obj. 40x).

las primeras experiencias en el trasplante de NM caninas en animales de laboratorio (8). El desarrollo de un modelo murino para el estudio de dichas neoplasias significaría un aporte para la investigación en el tema. En este estudio se realizó el trasplante de un melanoma canino en ratones inmunodeficientes N:NIH (S)-*Fox1<sup>nu</sup>* y se confirmó, mediante el estudio histopatológico, el crecimiento de melanocitos neoplásicos en el tejido subcutáneo del dorso de todos los animales. Si bien las células tumorales se observaron claramente, la ocurrencia de necrosis dificulta la realización de estudios posteriores. Este hallazgo podría deberse al rápido crecimiento del tumor en los animales trasplantados, dado que la neoplasia utilizada exhibió un comportamiento extremadamente agresivo en el paciente donante, causando amplias metástasis en un corto tiempo. En conclusión, estos resultados preliminares indican la viabilidad del trasplante del melanoma canino en ratones inmunodeficientes, lo que posibilitaría el desarrollo de un modelo para su estudio.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Cuitiño MC, Massone AR, Idiart JR. Estudio retrospectivo en neoplasias melanocíticas caninas: aspectos epidemiológicos. *Analecta Veterinaria (VE)* 2006; 26 (2): 18-24 (7 pantallas). Recuperable de <http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta>.
2. Homsí J, Kashani-Sabet M, Messina JL, Daud A. Cutaneous melanoma: prognostic factors. *Cancer Control* 2005; 12:223-229
3. Vail DM, MacEwen EG. Spontaneously occurring tumors of companion animals as models for human cancer. *Cancer Invest.* 2000; 18(8):781-92.
4. Dithmar S, Albert DM, Grossniklaus HE. Animal models of uveal melanoma. *Melanoma Res.* 2000; 10(3):195-211.
5. Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. CCPA, Manual Vol. 1 (2<sup>da</sup> edición), 1998.
6. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. 1999. Copyright National Academy Press, Washington, D.C. 1996.
7. Pons M, Mancheño-Corvo P, Martín-Duque P, Quintanilla M. Molecular biology of malignant melanoma. *Adv Exp Med Biol.* 2008; 624:252-64.
8. Inoue K, Ohashi E, Kadosawa T, Hong SH, Matsunaga S, Mochizuki M, Nishimura R, Sasaki N. Establishment and characterization of four canine melanoma cell lines. *J Vet Med Sci.* 2004; 66(11):1437-40.

## SINDROME ULCEROSO GASTRICO EN EQUINOS DEL HIPODROMO NACIONAL "LA RINCONADA" CARACAS VENEZUELA

Morales A<sup>1</sup>, Perdigón M<sup>1</sup>, Leal L<sup>2</sup>, García F<sup>1</sup>, Bermúdez V<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Departamento de Patología Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Central de Venezuela Maracay, Estado Aragua Venezuela.

<sup>2</sup>Departamento de Patología Instituto Nacional de Hipódromos "La Rinconada".  
Caracas, Distrito Capital Venezuela.

**Resumen:** El objetivo fue caracterizar mediante un estudio anatomopatológico el síndrome ulceroso gástrico equino en el Hipódromo La Rinconada, Caracas, Venezuela. Se estudiaron 50 estómagos de equinos Pura Sangre de Carrera. Se tomaron secciones de tejido gástrico las cuales fueron fijadas en formalina al 10% y procesadas por los métodos convencionales de procesamiento histológico. Adicionalmente se empleó la coloración especial Warthin-Starry. Se realizó el análisis morfológico de la mucosa gástrica. La historia clínica mostró 40% (20/50) con signología gastrointestinal y 60% (30/50) asintomáticos. Los hallazgos macroscópicos fueron: gastritis aguda superficial 2/50, gastritis crónica erosiva 28/50, gastritis crónica ulcerosa 18/50 y solo dos ejemplares (2/50) sin lesiones aparentes. Los cortes histológicos evidenciaron infiltrado mononuclear linfocitario con pérdida de la continuidad de la mucosa gástrica. La coloración especial Warthin-Starry evidenció bacterias tipo espirales, bacilos y cocobacilos en la mucosa, glándulas fúndicas y pilóricas 18/50. El estudio morfológico reveló pérdida significativa de epitelio gástrico 46/50 equinos, con gastritis crónica erosiva 28/46 y gastritis crónica ulcerosa 18/46, el promedio de daño fue de 351,39± 41.43 micras. En conclusión cambios morfológicos en la mucosa gástrica gastritis, erosión y úlceras con grados variables de severidad en los equinos estudiados, características compatibles con el síndrome ulceroso gástrico equino.

**Palabras claves:** equinos-EGUS-gastritis-úlceras.

## EQUINE GASTRIC ULCER SYNDROME IN THE NATIONAL RACE TRACK "LA RINCONADA" CARACAS-VENEZUELA

**Abstract:** The aim was characterized by a pathological study on equine gastric ulcer syndrome in the Hipodrome La Rinconada, Caracas, Venezuela. Were studied 50 stomachs of Thoroughbred Race Horses. Were recollected gastric tissue sections which were fixed in 10% formalin and processed by conventional methods of histological processing. Additionally, use the special Warthin-Starry staining. We performed morphometric analysis of gastric mucosa. The clinical history was 40% (20/50) with gastrointestinal signology and 60% (30/50) asymptomatic. The macroscopic findings were: superficial gastritis 2/50, chronic erosive gastritis 28/50, 18/50 chronic gastritis, colitis, and only two copies (2/50) without apparent injury. The histological sections showed mononuclear lymphocytic infiltrate with loss of continuity of the gastric mucosa. The Warthin-Starry staining showed special type spiral bacteria, bacilli and coccobacilli in the mucosa, fundic and pyloric glands 18/50. The morphometric study revealed significant loss of equine gastric epithelium 46/50, 28/46 chronic gastritis and chronic gastritis erosive colitis 18/46 harm the average was 351.39 ± 41.43 microns. In conclusion, morphological changes in the gastric mucosa gastritis, erosion and ulcers with varying degrees of severity in the horses studied features consistent with equine gastric ulcer syndrome.

**Key words:** equine-EGUS-gastritis-ulcer.

Fecha de recepción: 01/03/09

Fecha de aprobación: 10/12/09

**Dirección para correspondencia:** Abelardo Morales departamento de Patología Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Central de Venezuela Maracay, Estado Aragua Venezuela.

**E-mail:** aamorales13@gmail.com

## INTRODUCCIÓN

El síndrome ulceroso gástrico equino (SUGE: Síndrome Ulceroso Gástrico Equino, GEUS: gastric equine ulcer syndrome) incluye inflamación y ulceración de la mucosa gástrica (gastritis aguda, gastritis crónica, erosión, ulceración péptica y gastropatía (1, 2, 3). La etiología del SUGE se considera multifactorial y esta asociada a factores de estrés (liberación de catecolaminas, cortisol), ejercicio intenso (acidosis metabólica no compensada), manejo, dietas y calidad nutricional (disposición de nutrientes y requerimientos), enfermedades subyacentes (enfermedades infecciosas), farmacológico (antiinflamatorios no esteroideos AINES, tales como fenilbutazona, y corticoides como la dexametasona) (4).

En recientes estudios han evidenciado seroconversión y detección de ADN del género *Helicobacter* en caballos (5). Se ha logrado el aislamiento de *Helicobacter equorum* una nueva especie de este género a partir de heces de equinos (6). SUGE ha sido bien documentado en varias disciplinas y grupos etarios (1, 3). La incidencia de úlceras gástricas en caballos de carrera en entrenamiento (actividad atlética) excede el 90% en muchas circunstancias (3). La presentación clínica varía de acuerdo a la magnitud de la lesión, los signos clínicos son: anorexia, bruxismo, ptialismo, diarrea, perforación gástrica, peritonitis, síndrome de emaciación, cólicos recurrentes, disminución del rendimiento atlético, entre otros. Existe una presentación clínica asintomática que a pesar de observar lesiones, no muestra signología clínica. En virtud de esta importante área de estudio planteamos como objetivo: caracterizar mediante estudio anatomopatológico el Síndrome Ulceroso Gástrico Equino en el Hipódromo La Rinconada, Caracas, Venezuela.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se estudiaron 50 estómagos de equinos (*Equus caballus*) de raza Pura Sangre de Carrera (PSC) con edades comprendidas entre 2 a 6 años, pertenecientes al Hipódromo La Rinconada de Caracas (20 machos y 30 hembras), a los cuales se le practicó necropsia por diversa causas. Se tomaron dos secciones de tejido gástrico de la mucosa escamosa y glandular (región fúndica). Una sección de cada región de la mucosa se fijó en formalina al 10% y se procesaron por los métodos convencionales de procesamiento histológico. Adicionalmente se empleó la coloración especial por impregnación de sales de plata Warthin-Starry (WS). Se realizó el análisis morfométrico de la mucosa gástrica mediante los programas informáticos para análisis de imágenes y el "Image tool" (7).

## RESULTADOS

La historia clínica mostró 40% (20/50) de equinos con signología clínica gastrointestinal y 60% (30/50) asintomáticos. Los hallazgos macroscópicos fueron: gastritis aguda superficial 2/50, gastritis crónica erosiva 28/50, gastritis crónica ulcerosa 18/50 y solo dos ejemplares (2/50) sin lesiones aparentes. Los cortes histológicos evidenciaron importante respuesta inflamatoria por infiltrado mixto predominantemente mononuclear linfocitario, con edema, pérdida de la continuidad de la mucosa gástrica con necrosis de coagulación del epitelio gástrico y exposición de los estratos inferiores lamina propia. La presentación morfológica de las lesiones gástricas fue: gastritis aguda superficial 2/50, gastritis crónica erosiva 28/50, gastritis crónica ulcerosa 18/50. La coloración especial Warthin-Starry evidenció bacterias con morfología tipo espiral, bacilos cortos y cocobacilos, con apariencia de cubierta externa y algunos con estructuras flagelares a nivel de la superficie de la mucosa y en la las glándulas fúndicas y pilóricas en 18/50. El estudio morfométrico reveló una pérdida significativa de epitelio gástrico en 46/50 equinos, con gastritis crónica erosiva 28/46 y gastritis crónica ulcerosa 18/46, observándose que el promedio de daño fue de  $351,39 \pm 41.43$  micrómetros.

## DISCUSIÓN

El síndrome ulceroso gástrico equino en caballos del Hipódromo "La Rinconada" presentó una alta prevalencia de gastritis y úlceras gástricas 96%. Estos resultados son consistentes con los reportados en otros estudios donde la prevalencia del SUGE es de 80-90% en caballos Pura Sangre de Carrera (3,4,5). En todas las regiones de la mucosa gástrica (región escamosa, región fúndica y región pilórica) se observaron lesiones inflamatorias crónicas. Coincidiendo con los reportados en potros de 6 meses post destete (n=12) en Venezuela donde se observaron úlceras en la región escamosa y glandular (8). Solo el 40% de los equinos estudiados presentaron signos clínicos de enfermedad gastrointestinal y el 60% fueron asintomáticos, lo cual es similar a lo reportado en la literatura (8) de la presencia de úlceras gástricas sin signos clínicos como cólicos recurrentes, diarrea, bruxismo y tialismo. La coloración especial Warthin-Starry evidenció la presencia de bacterias con morfología de tipo espiral, bacilos cortos y cocobacilos. En conclusión cambios morfológicos en la mucosa gástrica tales como: gastritis, erosión y úlceras con grados variables de severidad en los equinos estudiados, características compatibles con el síndrome ulceroso gástrico equino.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Dwyer R, Powell, D. The Third Report of the Lloyd's Foal Disease Project. 1989. Department of Veterinary Science, Gluck Research Center, College of Agriculture, University of Kentucky. Lexington.
2. Murray MJ. Gastric ulcers in adult horses. The Compendium. 1994;16, 792-797.
3. Merritt A. The equine stomach: A personal perspective (1963-2003). In 49 Annual Convention of the American Association of Equine Practitioners. 2003. New Orleans, Louisiana.
4. Andrews FM, Buchanan BR, Elliot SB, Clariday NA, Edwards LH. Gastric ulcers in horses. J Anim Sci 2005; 83, 18-21.
5. Hepburn RJ. Investigation into the Presence of Helicobacter in the Equine Stomach by Urease Testing and Polymerase Chain Reaction and Further Investigation into the Application of the <sup>13</sup>C-Urea Blood Test to the Horse. 2004. Master of Science in Veterinary Medical Science. State University, Leesburg, 296, 297, 298 y 299. Virginia, USA.
6. Moyaert H, Decostere A, Vandamme P, Debruyne L, Mast J, Baele M, Ceelen L, Haesebrouck F. *Helicobacter equorum* sp. nov., a urease-negative Helicobacter species isolated from horse faeces. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 2007; 57, 213-218.
7. Karent P, Kubinova L, Krekule I. STESYS software for computer-assisted stereology. Physiol. Res. 1998, 47; 271-278.
8. Chacón T. Hallazgos clínicos y gastroscópicos en potros Pura Sangre de Carrera sometidos a dos tipos de destete. Trabajo de grado para la categoría de asistente. 2005. Facultad de Ciencias Veterinarias Universidad Central de Venezuela.



## RINITIS NO SUPURATIVAS EN EL PERRO. HALLAZGOS ENDOSCÓPICOS. PRESENTACIÓN DE CASOS.

Giordano A<sup>1</sup>, Crespo M<sup>1</sup>, Giacomone J<sup>1</sup>, Bonzo E<sup>2</sup>, Baschar H<sup>1</sup>, Aprea A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Endoscopia- Hospital Escuela. <sup>2</sup>Epidemiología Básica.  
Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de La Plata

**Resumen:** *Las rinitis no supurativas son causa relativamente frecuente de descarga nasal en caninos. Su diagnóstico definitivo se establece a partir de muestras histopatológicas obtenidas mediante rinoscopia. Debido a que su tratamiento es específico, es indispensable considerar esta enfermedad ante cualquier caso de descarga nasal. El objetivo de este artículo es describir el presente de esta enfermedad, documentar los hallazgos endoscópicos en 6 casos clínicos diagnosticados por histopatología, cotejando estos datos con los obtenidos por otros autores y estableciendo la prevalencia de la rinitis no supurativa en nuestro medio.*

**Palabras Claves:** rinitis no supurativa – caninos- endoscopia

## ENDOSCOPIC FINDINGS OF CANINE NON-SUPPURATIVE RHINITIS: A CASE SERIES

**Abstract:** *Non-suppurative rhinitis is a quite frequent cause of canine nasal discharge. The definitive diagnosis is based on histopathological samples obtained by rinoscopy. As its treatment is specific any case of nasal discharge should be investigated for this. The aim of this article was to describe the disease, to report the endoscopic findings in six clinical cases comparing our data with those of other authors and to establish the local prevalence of the disease.*

**Key Words:** canine- endoscopy- non supuratives rhinitis

Fecha de recepción: 20/04/09

Fecha de aprobación: 15/06/09

**Dirección para correspondencia:** A. Giordano, 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](mailto:endoscopia@fcv.unlp.edu.ar)

## INTRODUCCIÓN

Las rinitis inflamatorias crónicas no infecciosas se pueden clasificar de acuerdo al predominio de sus células y a la presencia o ausencia de hiperplasia en: linfoplasmocíticas, eosinofílicas e hiperplásicas (1).

Su causa no está establecida, aunque se la puede atribuir a una respuesta crónica inflamatoria, a un proceso inmunomediado, o a agentes inhalados (irritantes o alérgicos). En humanos esto es bien reconocido y está asociado a conjuntivitis, rinitis estacional recurrente, asma y pólipos nasales (1). Se ha demostrado que puede tratarse de un proceso alérgico ya que la exposición al humo de cigarrillo por largo tiempo, causa rinitis crónica en perros, los cuales también han sido positivos a pruebas intradérmicas contra alérgenos inhalatorios, y muestran altos títulos de inmunoglobulinas IgM e IgG (1). Rinitis linfoplasmocítica: es una enfermedad inflamatoria nasal relativamente común en perros y menos común en gatos (2). Afecta principalmente razas grandes dolicocefalas y mesocefalas, whippets y dachshunds, de edad joven a mediana (3).

## FISIOPATOLOGÍA

Se produce una infiltración de la mucosa nasal con células inflamatorias de origen linfoide, y un variable número de neutrófilos y eosinófilos. Esta inflamación de la mucosa provoca una vasodilatación con incremento de la permeabilidad capilar asociado a congestión y edema del tejido nasal. La exudación de fluido de los vasos lleva al edema de la mucosa y a la acumulación de fluido seroso en el lumen nasal. En el animal sano la capa de mucus que cubre la mucosa nasal es empujada caudalmente por los movimientos coordinados de las cilias del epitelio respiratorio. Este mecanismo de clarificación mucociliar empuja las secreciones nasales con partículas inhaladas y microorganismos, hacia la orofaringe en donde el moco y los detritus son deglutidos (1). La inflamación crónica nasal destruye las cilias y produce metaplasia escamosa del epitelio respiratorio, esto interfiere en el mecanismo de clarificación mucociliar lo que produce acumulación de secreción nasal. Así estrecha y obstruye el lumen de las vías nasales, asociado a la congestión, edema e hiperplasia creándose un ambiente favorable para la proliferación de bacterias. La infección secundaria en pacientes con rinitis linfoplasmocítica lleva a un aumento de neutrófilos y a la producción de exudado purulento. Generalmente los gérmenes involucrados son residentes normales de la cavidad nasal u oral y de la piel (por ejemplo *Staphylococcus intermedius*) (1).

## CUADRO CLÍNICO

En la reseña vemos que hay una larga historia de signos sutiles de enfermedad nasal.

La signología inicialmente es intermitente y no muy evidente: estornudos, estornudo inverso, resoplido, epifora (5), ruidos excesivos a la respiración, respiración con boca abierta, epistaxis (6) y una descarga serosa no muy abundante, que a medida que se cronifica tiende a hacerse persistente y mucoide. La infección secundaria puede transformarla en purulenta o sanguínea. Aunque la enfermedad es comúnmente bilateral, algunos perros presentan descarga unilateral (2). Esta descarga puede pasar inadvertida, ya que es rápidamente deglutida o lamada de las narinas. El goteo postnasal puede producir tos.

Como complicación puede haber sinusitis y agrandamiento de ganglios submaxilares en los pacientes con infección secundaria (1).

## DIAGNÓSTICOS DIFERENCIALES

Rinitis micóticas, por ejemplo aspergillosis o penicilliosis (5), neoplasias, enfermedad dental, cuerpos extraños, parásitos nasales (*linguistula serrata*, *capillaria aerophila*, *pneumonyssoides caninum*) (4), disquinesia mucociliar. Otros disturbios extra nasales también pueden presentar descarga nasal, como por ejemplo coagulopatías, vasculitis, hipertensión, síndrome de hiperviscosidad y neumonía (3).

## DIAGNÓSTICO

El único test diagnóstico definitivo es la histopatología de la mucosa nasal obtenida por biopsia endoscópica (1). Se observa: infiltrado inflamatorio compuesto de células mononucleares (linfocitos y plasmocitos), neutrófilos (cuando hay una sobre infección) y eosinófilos que pueden hacer sospechar de un proceso alérgico, aunque no está probado en el perro que exista una verdadera rinitis alérgica (4, 7).

**Radiología:** se realiza antes de la endoscopia. Los cambios radiológicos son sutiles (1): radiodensidad levemente aumentada (5) debido a la acumulación de secreciones e hipertrofia de los cornetes (4), y pérdida de contraste aire-hueso en los senos frontales, con pérdida de detalle de las trabéculas óseas, lo que no significa que exista lisis (1) o destrucción de cornetes (4). Se pueden realizar radiografía de tórax a fin de descartar otras enfermedades y en algunos casos de rinitis linfoplasmocítica crónica existe una demarcación a patrón mixto bronquial e intersticial lineal que pueden indicar agentes irritantes o alérgicos involucrados (1).

**Tomografía Axial Computada:** se puede observar destrucción de los cornetes, opacidad del seno frontal y acumulación de fluidos (2)

**Rinoscopia:** los hallazgos endoscópicos suelen ser sutiles (4) y no específicos. Si el exu-

dado es abundante se deben realizar lavajes de la cavidad nasal. Puede existir hiperemia difusa de la mucosa, más marcada si existe infección secundaria y en algunos casos proliferación o engrosamiento de la misma. En otros la superficie mucosa puede ser friable y tener una apariencia granular (1). En rinitis severas se pueden observar úlceras, y en casos de rinitis atrófica los cornetes pueden aparecer dentellados, con una vascularización submucosa visible (4). Además la endoscopia nos permite descartar otras enfermedades nasales. Durante el procedimiento, posteriormente a la inspección, se deben tomar muestras para histopatología en varios puntos ya que las lesiones son difusas.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizó un estudio retrospectivo sobre 177 fichas de caninos atendidos en el Servicio de Endoscopia de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata durante los años 2007-2008. Se seleccionaron todas las rinoscopias realizadas en pacientes con signos clínicos de enfermedad nasal y dentro de estos, los diagnosticados de rinitis no supurativa, por histopatología. Se tuvieron en cuenta los datos relacionados con sexo, raza, signos, tiempo transcurrido desde la aparición de los signos hasta la realización de la endoscopia, y los hallazgos endoscópicos. Los estudios se realizaron con un fibrogastroscopio pediátrico GIF/30 de 5 mm de diámetro externo y 100 cm de largo. 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).

## RESULTADOS

Durante el período 2007-2008 se realizaron 177 endoscopias en caninos, de las cuales 26 %

(47/177) correspondieron a rinoscopias realizadas en pacientes con signos clínicos de enfermedad nasal. Seis de los mismos fueron diagnosticados de rinitis no supurativa, por histopatología. En la muestra analizada, la prevalencia de rinitis no supurativa correspondió a 12,7%, pudiéndose considerar a partir de esta información que la prevalencia de esta enfermedad en la población oscilaría entre 3% a 22%. Los pacientes tenían una edad promedio de 10 años (3,5-13 años), con predominio en hembras, y una evolución clínica variada, de 7 días a 10 meses. El signo común en todos fue la descarga unilateral, en la mayoría de los casos hemorrágica. Algunos presentaban otros signos clínicos como tos, estornudos, secreción espesa amarillenta, deformación del hueso nasal, y/o ronquidos. Se hallaron masas en el 50% de los estudios. En uno de los pacientes se observó deformación del hueso nasal, y en otro destrucción de cornetes.

## PRESENTACIÓN DE CASOS HALLAZGOS ENDOSCÓPICOS

### CASO N° 1

Viejo pastor inglés – macho - 11 años: destrucción de cornetes en fosa derecha, mucosa eritematosa abundante exudado amarillo claro de consistencia casi sólida. Zonas de atrofia mucosa (Fig. 1y 2).

### CASO N° 2

Mestizo - hembra -13 años: mucosa eritematosa. Exudado abundante blanquecino. (Fig.3)

### CASO N° 3

Dachsund - hembra - 13 años: presencia de abundante exudado, mucosa congestiva, masas múltiples de aspecto gelatinoso blandas y otras rosadas ocupando toda la cavidad nasal. (Fig. 4).



Fig.1 Viejo Pastor Inglés. Exudado abundante, de consistencia sólida.  
Old English Sheepdog. Great amount of solid material.

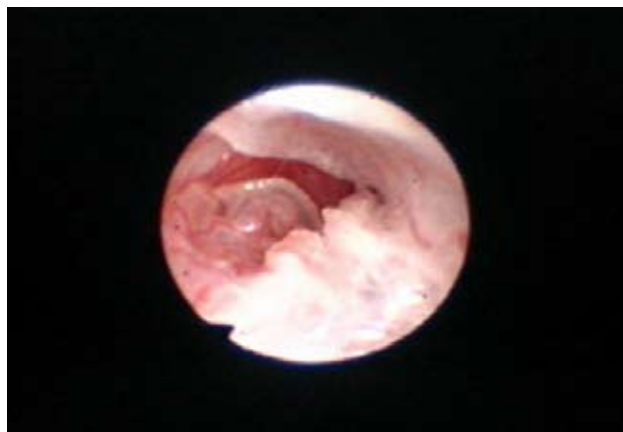


Fig.2 Viejo Pastor Inglés. Destrucción de cornetes.  
Old English Sheepdog. Destruction of nasal turbinates.

**CASO Nº 4**

Canino – Siberian Husky - hembra - 12 años: mucosa eritematosa. Presencia de masa de superficie lisa, color rosado, consistencia blanda en cavidad nasal derecha. Abundante cantidad de exudado. En cavidad izquierda masas semejantes de menor tamaño.(Fig. 5).

**CASO Nº 5**

Canino - San Bernardo- hembra - 3 años y medio: úlcera medial de la trufa. Mucosa severamente eritematosa. Bordes de cornetes irregulares en forma dentellada blanquecinos (Fig. 6).

**CASO Nº 6**

Canino- Bretón – macho - 7 años : masa en meato ventral lisa de consistencia blanda.

**DISCUSIÓN**

La presentación clínica de la enfermedad nasal es un reto para el diagnóstico. Por lo general los pacientes son sometidos a tratamientos empíricos sin diagnóstico previo, lo que atrasa la resolución del problema. En nuestros hallazgos la mitad de los pacientes presentaban una masa,

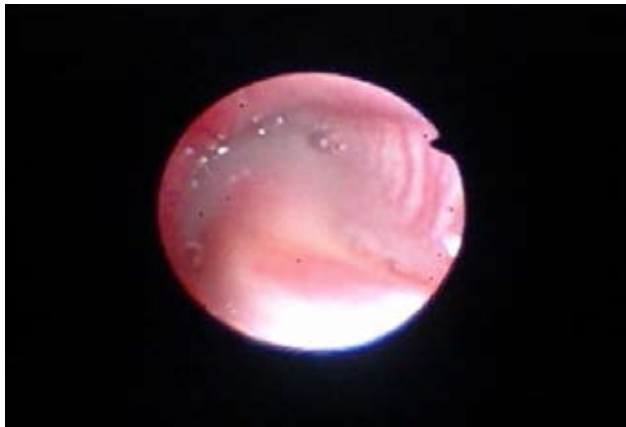


Fig.3. Mestizo. Exudado abundante blanquecino. Mucosa eritematosa.  
Mixed Breed. Great amount of white material. Mucosal erythema.

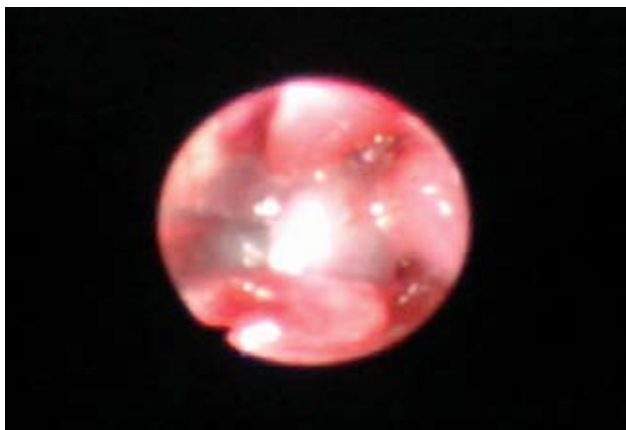


Fig.4 Dachshund. Masas múltiples de aspecto gelatinoso. Mucosa eritematosa.  
Gelatinous tissue masses. Mucosal erythema



Fig.5. Siberian Husky. Mucosa eritematosa. Masa de consistencia blanda.  
Mucosal erythema. Soft tissue mass.



Fig.6 San Bernardo. Bordes de cornetes dentellados.  
St. Bernard Dog. Serrated turbinates edges.

en uno observamos destrucción de los cornetes y en otro deformación del hueso nasal, lesiones consideradas infrecuentes en la bibliografía. Muchos de estos pacientes añosos con descarga crónica nasal y deformidades de los huesos nasales, pudieron ser presumidos de padecer tumores nasales. Uno de los casos clínicos se presentó con tos como único signo, siendo realizada la rinoscopia al no haber encontrado alteraciones en la traqueobroncoscopia. La endoscopia nos permite llegar, vía biopsia endoscópica, al diagnóstico definitivo. La rinitis no supurativa es una enfermedad cuya presentación se ha demostrado en los últimos años como relativamente frecuente debido a la introducción de esta nueva tecnología. Con el diagnóstico de certeza, el tratamiento es fácilmente accesible, aplicable y con resultados clínicos óptimos.

**BIBLIOGRAFÍA**

1.Mackin A. Lymphoplasmacytic rhinitis, in: King, L. Respiratory disease in dogs and cats, Ed 2004 Saun-

**A. Giordano y col.**

ders Ed, St Louis, Missouri (united states of america), p 305-309.

2. Windsor RC, Johnson LR, Herrgesell EJ, De cock HE. Idiopathic lymphoplasmacytic rhinitis in dogs: 37 cases (1997-2002), J Am Vet Med Assoc 2004 Jun 15; 224(12):1952-7

3. Kuehn ND. Chronic Canine Rhinitis, DVM, MS, DACVIM (SAIM), 2009 <http://www.michvma.org/documents/MVC%20Proceedings/Kuehn1.pdf>.

4. Lecoindre P. Atlas D'endoscopie Chez les carnivores domestiques. Ed 2001, editions Med'com, Paris (France), p.133-147

5. Hawkins EC. Enfermedades de la cavidad nasal, in: Nelson RW, Couto CG. Medicina interna de los animales pequeños. Ed 2003 Inter-Médica S.A.I.C.I.

6. Ciudad autónoma de Buenos Aires (República Argentina), p 243-259.

7. Windsor RC, Johnson LR. Canine Chronic Inflammatory rhinitis, DVM, PhD, DACVIM, 2009. <http://www.journals.elsevierhealth.com/periodicals/ysvms/article/PIIS1096286705000903/fulltext>.

8. Davies C, Shell L. Respiratory disorders, In: Common small animal diagnosis, Ed 2002 Saunders, p 214-218.

## PRIMER AISLAMIENTO DE *Ornithobacterium rhinotracheale* EN ARGENTINA

Uriarte J, Piscopo M, Origlia J, Gornatti D, Cerda R, Herrero M, Petruccelli M

Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades de las Aves y los Pilíferos.  
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

**Resumen:** *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) es una bacteria gram negativa, cocobacilar, pleomórfica que fue aislada de parvadas de pavos y pollos parrilleros en muchos países del mundo y de América Latina como México, Brasil y Perú. Las aves afectadas con ORT presentan signología respiratoria, acompañada con un incremento en la mortalidad y disminución en la ganancia de peso. Pollos parrilleros con signos respiratorios fueron enviados desde una granja ubicada en la Provincia de Buenos Aires, Argentina. Muestras de tráquea y pulmones fueron seleccionadas, homogeneizadas e inoculadas en Agar Sangre. Los aislamientos sospechosos de ORT tipificados bioquímicamente fueron confirmados por PCR en tiempo real. Este es el primer aislamiento de ORT en la República Argentina.

**Palabras clave:** *Ornithobacterium rhinotracheale*, Aislamiento, Pollos, PCR en tiempo real

## FIRST ISOLATION OF *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) IN ARGENTINA

**Abstract:** *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) is a gram negative, pleomorphic, rod shaped bacterium that has been isolated around the world and in Latin America from flocks of turkeys and broilers in countries like Mexico, Brazil and Peru. ORT causes a respiratory disease with increase of mortality and reduced weight gains. Broilers with respiratory signs were submitted from a farm located in Buenos Aires Province, Argentina. Tissue samples from trachea and lungs were selected, homogenized and inoculated in sheep blood agar. The suspected colonies that fulfill the biochemical test were confirmed using Real Time PCR. This is the first report of ORT isolation in Argentina.

**Key Words:** *Ornithobacterium rhinotracheale*, Isolation, Poultry, Real Time PCR

Fecha de recepción: 22/05/09

Fecha de aprobación: 10/12/09

**Dirección para correspondencia:** M. Pretuccelli, Laboratorio de Diagnóstico de Enfermedades de las Aves y los Pilíferos. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina. E-mail: [petru@fcv.unlp.edu.ar](mailto:petru@fcv.unlp.edu.ar)

## INTRODUCCIÓN

La bacteria *Ornithobacterium rhinotracheale* (ORT) ha sido asociada a enfermedad respiratoria en avicultura. Al principio fue descrita como un organismo similar a *Pasteurella* ssp. (*Pasterurella-like*) o también como una bacteria pleomórfica, cocobacilar gram negativa. En el año 1991 se realizó el primer aislamiento en una granja de parrilleros en la República de Sud África (1). En el año 1994, Vandamme et al. propusieron el nuevo género y especie *Ornithobacterium rhinotracheale* (2, 4). ORT ha sido aislado en varios países alrededor del mundo como Sud Africa, España, Italia, Israel, Canadá, Perú, México y Brasil.

En el presente estudio se describe el primer aislamiento de *Ornithobacterium rhinotracheale* en la República Argentina, confirmado por medios bioquímicos, fenotípicos y genéticos utilizando la técnica clásica de PCR y la de PCR en tiempo real.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Aves con signos respiratorios fueron remitidas en septiembre del 2008 al laboratorio por el propietario de una granja de pollos parrilleros ubicada en la provincia de Buenos Aires, Argentina. La misma estaba compuesta por dos galpones que albergaban aproximadamente 500 aves cada uno. Separadas por edades, en uno de ellos, pollitos de aproximadamente 10 días y en el otro, aves de 2 meses de edad. El establecimiento constaba de una inadecuada ventilación, escasa higiene y como consecuencia un alto nivel de amoníaco en el aire. El alimento suministrado a las aves era elaborado por el propietario sin ningún tipo de control sobre la calidad de la materia prima, su composición proteica, energética o mineral. A la mezcla se le adicionaba núcleo mineral de marca comercial reconocida.

Las aves comenzaron a mostrar signos respiratorios como disnea, descarga nasal y estornudos que en algunos casos llevaban a una dificultad respiratoria marcada con postración y boqueo. Algunos de los pollos presentaban problemas de locomoción y edema abdominal. El porcentaje de mortalidad fue en ascenso llegando a un 3 % a 4 % diario acompañada de una notable desuniformidad de la parvada.

Se realizaron necropsias de aves con y sin signos clínicos. Los hallazgos anatomopatológicos fueron neumonía, aerosaculitis y un incremento en el mucus traqueal, más notorio en las aves con trastornos respiratorios severos. En algunos ejemplares se observó edema abdominal, hepatomegalia y sinovitis.

Se seleccionaron muestras de tráquea, pulmones y sacos aéreos, las cuales fueron sembradas en placas de agar sangre de cabra al 5 % con 10 µg/ml de gentamicina, y se incubaron por 48 h a 37 °C en microaerofilia. Las colonias

sospechosas de ORT se identificaron por sus características morfológicas y tintoriales mediante la coloración de GRAM. Para diferenciarlos de otras bacterias patógenas del tracto respiratorio de las aves se inocularon en agar Mac Conkey y se realizaron pruebas bioquímicas como la producción de oxidasa, catalasa, indol, ONPG y la fermentación de azúcares como maltosa, galactosa y lactosa. (3).

La confirmación de los aislamientos se realizó mediante la técnica clásica de PCR y la técnica de PCR en tiempo real. Para la misma se utilizó como patrón positivo la cepa CCUG 23171 de *Ornithobacterium rhinotracheale* (2, 4). El DNA fue extraído utilizando el kit DNEASY BLOOD & TISSUE KIT de QUIAGEN® y los primers utilizados fueron el OR16S-F1 (5´-GAGAATTA-ATTTACGGATTAG) y el OR16S-R1 (5´-TTCGCTT-GGCTCCGAAGAT) (5). El volumen final de la reacción fue de 25 µl compuesto por 3µl de DNA bacteriano, 1 µl de cada primer, 12,5 µl de Biorad iQ™ SYBR GREEN Supermix® y 7,5 µl de agua destilada (5,6).

## RESULTADOS

Las colonias sospechosas de ORT, blanco grisáceas circulares de aproximadamente 1 a 2 milímetros de diámetro, fueron repicadas nuevamente en agar sangre de cabra al 5 % para lograr su crecimiento en pureza y de ellas se tomaron muestras para ser coloreadas con la tinción de Gram en las que se observaron bacterias pleomórficas cocobacilares pequeñas gram negativas (3).

Los resultados de las pruebas bioquímicas fueron: crecimiento en Mac Conkey negativo, oxidasa positiva, catalasa e indol negativo y ONPG positivo. La fermentación de los azúcares maltosa, galactosa y lactosa fueron todas positivas.

El resultado de la técnica de PCR en tiempo real fue positivo corroborado por la técnica clásica de PCR que mostró una amplificación de 784 pb al igual que el control positivo, (cepa ATCC 51463), confirmando de esta manera el aislamiento de *Ornithobacterium rhinotracheale*.

## DISCUSIÓN

Quien trabaja en avicultura conoce perfectamente que la presencia de cuadros respiratorios en aves criadas de manera intensiva es común, sin embargo no se realizan diagnósticos precisos sobre la causa de los mismos ya que generalmente se medica por presencia de signos clínicos y mediante antibióticos estos cuadros revierten. Durante cierto tiempo se sospechó en la República Argentina de la existencia de *Ornithobacterium rhinotracheale*, el cual es un patógeno emergente en la avicultura mundial, causando signología respiratoria, disminución

del crecimiento y aumento de mortandad. Este trabajo confirma la presencia de ORT en el país. De todas maneras creemos que es necesario ahondar más en la investigación sobre este patógeno para conocer los serotipos actuantes en el país así como su sensibilidad a los diferentes antibióticos usados en avicultura y su interacción con otros patógenos.

## **AGRADECIMIENTOS**

El presente trabajo fue financiado parcialmente a través del proyecto PROVETSUR. JICA

## **BIBLIOGRAFÍA**

1. van Empel PCM, Hafez HM. *Ornithobacterium rhinotracheale*: a review, Avian Pathology 1999, 28, 217 - 227
2. Vandamme P, Hafez HM, Hinz H. Capnophilic Bird Pathogens in the Family Flavobacteriaceae: *Riemerella*, *Ornithobacterium* and *Coenonia* Prokaryotes 7:695-708 Chapter 6.14, 2006.
3. Hafez Mohamed Hafez. Diagnosis of *Ornithobacterium rhinotracheale*. International Journal of Poultry Science 2002, 1(5): 114-118.
4. Vandamme P, Segers P, Vancanneyt M, van Hove K, Mitters R, Hommez J, Dewhirst F, Paster B, Kersters K, Falsen E, Devriese LA, Bisgaard M, Hinz KH, Manheim W. "*Ornithobacterium rhinotracheale* gen. nov., sp. nov., isolated from the avian respiratory tract." Int. J. Syst. Bacteriol. 1994, 44:24-37
5. Alongkorn A, Wellehan JFX, Ling-Ling Li, Vandamme P, Lindeman C, Edman M, Robinson RA, Kapur V. Molecular Epidemiology of *Ornithobacterium rhinotracheale* Journal of Clinical Microbiology 1997, 35 (11): 2894-2898.
6. Ruud Jansen, Niwat Chansiripornchai, Wim Gaastra, Jos PM van Putten. Characterization of Plasmid pOR1 from *Ornithobacterium rhinotracheale* and Construction of a Shuttle Plasmid Applied and Environmental Microbiology, 2004, p. 5853-5858.



## ACUTE BULLOUS KERATOPATHY IN CATS

Vecchio NE

Department of Surgery, MedVet Memphis  
Department of Surgery, MedVet Memphis, LLC, Cordova

**Abstract:** Bullous Keratopathy, a severe edema of the corneal stroma and epithelium with a characteristic bulla formation on the corneal surface, is a rare ophthalmological emergency in cats. Rapidly progressive and uncontrollable by medical means, this condition will result in corneal perforation hours after initial presentation if left unattended. Its pathophysiology and treatment options are reviewed in this article.

**Key words:** acute, bullous, keratopathy, cat

## QUERATOPATIA AMPOLLAR AGUDA DE LOS GATOS

**Resumen:** Queratopatía ampollar felina aguda define el edema corneal agudo severo con la formación de una característica ampolla subepitelial y es una rara emergencia oftalmológica en gatos. Es de progreso rápido y no responde satisfactoriamente a terapias médicas. Esta condición resulta en perforación corneal pocas horas después de ser diagnosticada si no es tratada de inmediato. Su patofisiología y las opciones terapéuticas son discutidas en este artículo.

**Palabras clave:** queratopatía ampollar, felina

Fecha de recepción: 13/03/09

Fecha de aprobación: 15/06/09

---

**Dirección para correspondencia:** Nicolas Vecchio. Department of Surgery, MedVet Memphis 830 N Germantown Parkway, Cordova, TN, USA – 38018 ph 1-901-624-9002 – fax 1-901-624-9014

**e-mail:** [nvecchio@medvetmemphis.com](mailto:nvecchio@medvetmemphis.com)

---

## INTRODUCTION

Bullous keratopathy describes severe edema of the corneal stroma and epithelium with a characteristic bulla formation on the corneal surface. Corneal edema results from excessive accumulation of fluid within the corneal parenchyma. It has been established that corneal thickness is linearly related to its fluid content (2). Edema is a common sign of corneal disease and is typically caused by loss or dysfunction of the anterior or posterior epithelium (endothelium) (1, 3, 15). The etiology of acute bullous keratopathy has not yet been identified, but affected cats have several common characteristics: they are young adults (range 1.5 to 3 years); have no significant hematologic or serum chemistry abnormalities; and tend to be affected bilaterally. Recurrence after initially successful therapy is common. No sex or breed predisposition has been reported.

## HISTOLOGICAL STRUCTURE OF THE CORNEA

The cornea forms the anterior segment of the fibrous tunic of the eye (6) and is sturdy and clear. To maintain these properties, this avascular collagenous tissue must remain metabolically active in a state of relative deturgescence (7). The cornea is composed of five layers; the outermost epithelium, then the subepithelial basement membrane, stroma, Decement's membrane, and endothelium (8). The corneal epithelium is a nonkeratinized stratified squamous, between 4 and 12 layers in thickness. The subepithelial basement membrane is predominantly formed by reticular fibers. The substantia propria or stroma accounts for 90 % of the total corneal thickness and is composed of some 100 lamellae in the cat. These layers are mainly collagen fibers arranged in a precise parallel fashion. Keratocytes are the predominant cell population and lay between the collagen fibers. The specific architecture of the stroma allows for 99 % of light permeability without scattering (8, 9). The Decement's membrane is the posterior limiting membrane that gives support to the corneal endothelium. It consists of tightly organized collagen fibers. Decement's membrane is constantly produced by the posterior epithelium so it grows thicker as the animal ages. The endothelium is the innermost layer of the cornea and consists of a single layer of flat, hexagonal cells. These cells interdigitate heavily and the high number of mitochondria and pinocytotic vesicles suggest a high metabolism (8) (figures 1a & b).

## CORNEAL PHYSIOLOGY

The cornea is an extremely specialized tissue despite a relatively simple structure. The ultimate goal of the cornea is to remain transparent and to provide the major refractive function

of the eye (9). To do so, about 10 % of the total corneal tissue must keep a very delicate water balance by working against the remaining 90% highly hydrophilic corneal stroma. This phenomenon depends on the continuous pumping out of interstitial fluids, a process that has been localized mainly in the posterior epithelium (9, 11). The ideal physiologic level of hydration in the human cornea is approximately 78 %. An increase or decrease from this ideal level can result in corneal opacity (9). This level is maintained by active pumping of ions (Na, K-ATPase pump) from the stroma to the aqueous humor (12-13). The endothelial cells are able to sustain this function and maintain corneal deturgescence and clarity even if their number is decreased by 80 % (7).

## PHYSIOPATHOLOGY OF BULLOUS KERATOPATHY

The primary etiology of bullous keratopathy has not been elucidated, however, there is evidence that bullous keratopathy occurs when the pumping capability of the endothelial layer is overwhelmed. This allows water to passively diffuse across the endothelium from the aqueous humor to the corneal stroma. The passage occurs following a concentration gradient. The highly hydrophilic proteoglycans located in the substantia propria, their distribution within the stroma, and the ratio between the various proteoglycan (dermatan sulfate, keratan sulfate, etc [14]) will finally determine the water distribution (9). With chronic or severe edema, formation of subepithelial and intraepithelial fluids-filled pockets, referred to as bullae, may occur. The bullae accumulate beneath or within the corneal epithelium and may spontaneously rupture causing corneal erosion or ulceration (15). Bullae formation is associated with several primary keratopathies in both people and animals. In the cat, bullous keratopathy is also reported as a sole entity (1, 16). In these cats, a profound, rapidly progressive corneal edema follows soon after a small corneal bulla is identified. The edema worsens despite aggressive topical therapy (figures 2 & 3). Glover et al. (1) tried unsuccessfully to link this syndrome with viral (FIV, FeLV, FIP, Feline Hepes Virus), bacterial, and mycoplasmal infections.

## TREATMENT

The treatment must be aggressive and timely to avoid corneal perforation. Several medical treatments have been proposed for people; however, it is crucial to realize that the presentation and origin of bullous keratopathy in humans is very different from the acute and rapidly progressive syndrome observed in the cat. In people bullous keratopathy is a chronic problem associated with intractable glaucoma and lens implantation which does not usually

progress to affect the entire surface of the cornea, but remains as a sole lesion. Similar behavior has it in the dog (17). Medical treatments such as topical hyperosmolar agents (5, 18, 19, 21) and chondroitin sulfate containing solutions (20) have been described, but their efficacy is poor and controversial. Surgical treatments appear more promising. The selection and execution of a surgical procedure depends on the animal's needs and the extent of the injury. The surgical procedures fall into two categories. The first category includes those procedures that aim to replace the deficient endothelium and/or epithelium and reestablish control of the water content in the stroma. Examples are penetrating keratoplasty (corneal transplant) (22) and fresh and frozen lamellar grafting (23). The second category includes tech-

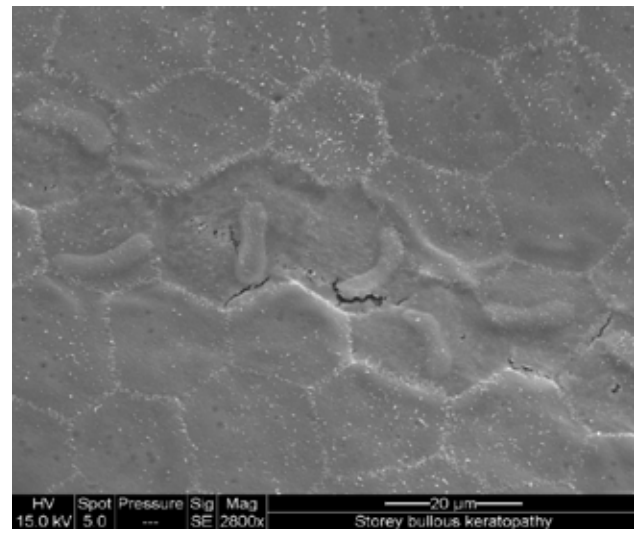
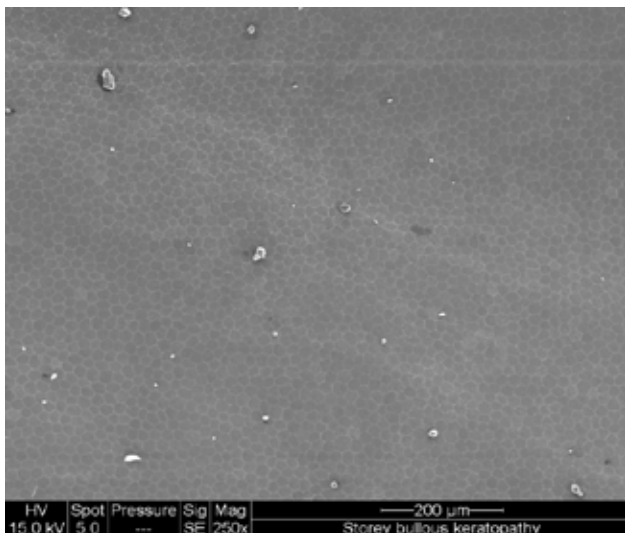
niques that provide a prompt vasculature supply for fluid drainage. Examples are conjunctival flaps (1, 16), and application of amniotic membrane (4, 24). The newest and most promising techniques, require further development, but aim to replace the endothelium by an in-vitro mass production and injection in the anterior chamber of endothelial stem cells (25, 26).

**PROGNOSIS AND COMPLICATIONS**

Bullous keratopathy in cats is uncommon, and the lack of understanding of its pathogenesis, and the sporadic reports in scientific literature make an assessment of its prognosis very difficult. Most reports cite bilaterally compromise at some point despite the size of the bulla or the extent of the consequent edema. The bulla recurred after

Figure 1 – Electron microscopy view of: a) the normal endothelium. b) Detailed view of intercellular junctions. Note the apoptotic cells in the center of the picture.

Figura 1. Fotomicrografia electronica de barrido. Epitelio corneal normal; a) Dertalle de las uniones intercelulares. Note las celulas apoptoticas en el centro de la figura.



Figures 2 & 3 – Severe edema corneal with corneal protrusion. Picture taken 12 hours after initial presentation of a 3 mm corneal ulcer. The patient was administered topical antiinflammatories every other hour. *Edema corneal severo con protrusion de cornea. La foto fue tomada 12 despues de la presentacion inicial de una ulcera de 3 mm de diametro. El paciente fue tratad con antiinflamatorios topicos aplicados cada dos horas.*



initial response to neovascularization techniques or quickly progressed with eye perforation. There are no reports of corneal allografting as a treatment of acute bullous keratopathy in the cat. Replacing the endothelium may reestablish the capability of the eye of controlling the water balance in the corneal stroma, the same principle that governs the endothelial cell replacement with stem cells. Further investigation is warrant.

## CONCLUSION

Acute bullous keratopathy in cats is a rare condition; however its prompt identification is crucial in saving the eye. Aggressive surgical treatment must be pursued as soon as the condition is identified. Intensive medical treatment will fail and corneal perforation will follow few hours after the initial presentation of clinical signs. In our clinic, as well as in previous reports, an infectious component has not been linked to the problem.

## REFERENCES

- Glover TL, Nasisse MP, Davidson MG: Acute bullous keratopathy in the cat. *Vet Comp Ophthalmol* 4:66, 1994
- Pepose JS, Ubels JL: The Cornea. In: *Adler's Physiology of the Eye*. Ed by WM Hart. St Louis. Mosby Year Book, 1992, pp 29-70.
- Hogan MJ, Zimmerman LE: *Ophthalmic Pathology*, 2<sup>nd</sup> ed. WB Saunders, Philadelphia, Pa. 1969.
- Lee HI, Ha SW, Kim JC: A novel application of amniotic membrane in patients with bullous keratopathy. *J Korean Med Sci*. 2006 Apr;21(2):324-8.
- Ohguro N, Matsuda M, Kinoshita S: The effects of denatured sodium hyaluronate on the corneal endothelium in cats. *Am J Ophthalmol*. 1991 Oct 15;112(4):424-30.
- Pollock RV: The Eye, in Evans HE, Christensen GC: *Miller's Anatomy of the dog*. W.B. Saunders Company, 1979, pp1073-1127
- Bourne WM: Functional measurements on the enlarged endothelial cells of corneal transplants. *Trans Am Ophthalmol Soc*. 1995;93:65-79;
- Hamor RE, Ehrhart EJ: Eye, in Eurell JA and Frappier BL (Editors 6<sup>th</sup> Edition): *Dellmann's Textbook of veterinary histology*. Blackwell Publishing, 2006, pp 350-363.
- Edelhauser HF: The balance between corneal transparency and edema: The Proctor Lecture. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2006 May;47(5):1754-67
- Dyce KM, Sack WO, Wensing CJ: *Textbook of veterinary anatomy*. Saunders, Pennsylvania, 2002. pp 325-326.
- Edelhauser HF, Geroski DH, Stern ME. Glucose metabolism in the cornea and lens is elasmobranch, teleosts and mammals response to thiol oxidation. *Fed Res*. 1980;39:3219-3221.
- Bonanno JA. Identity and regulation of ION transport mechanisms in the corneal endothelium. *Prog Retinal Eye Res*. 2003;22:69-93.
- Fischbarg J. Active and passive properties of the rabbit corneal endothelium. *Exp Eye Res*. 1973;15:615-638.
- Banks WJ. *Applied Veterinary Histology*. Saint Louis. Mosby Year Book. 1993
- Michau TM, Gilger BC, Maggio F, Davidson MG: Use of thermokeratoplasty for treatment of ulcerative keratitis and bullous keratopathy secondary to corneal endothelial disease in dogs: 13 cases (1994-2001). *J Am Vet Med Assoc*. 2003 Mar 1;222(5):607-12
- Moore PA: Feline corneal disease. *Clin Tech Small Anim Pract* 20:83-93, 2005
- Rosenthal JJ: Bullous keratopathy: a latent complication of chronic corneal disease. *Vet Med Small Anim Clin*. 1974 Feb;69(2):181-2
- Whitley RD, Gilger BC. Diseases of the canine corneal and sclera. In: Gelatt KN, ed. *Veterinary Ophthalmology*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999;635-673
- Insler MS, Benefield DW, Ross EV. Topical hyperosmolar solutions in the reduction of corneal edema. *CLAO J* 1987;13:149-151
- Ledbetter EC, Munger RJ, Ring RD, Scarlett JM. Efficacy of two chondroitin sulfate ophthalmic solutions in the therapy of spontaneous chronic corneal epithelial defects and ulcerative keratitis associated with bullous keratopathy in dogs. *Vet Ophthalmol*. 2006 Mar-Apr; 9 (2):77-87.
- Knezovic I, Dekaris I, Gabric N, Cerovski J, Barisic A, Bosnar D, Rastegorac P, Parac A. Therapeutic efficacy of 5% NaCl hypertonic solution in patients with bullous keratopathy. *Coll Antropol*. 2006 Jun;30(2):405-8.
- Gilger BC, Whitley RD. Surgery of the cornea and sclera. In: Gelatt KN, ed. *Veterinary Ophthalmology*. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1999;675-700
- Hansen PA, Guandalini A. A retrospective study of 30 cases of frozen lamellar corneal graft in dogs and cats. *Vet Ophthalmol*. 1999;2(4):233-241.
- Chansanti O, Horatanaruang O. The results of amniotic membrane transplantation for symptomatic bullous keratopathy. *J Med Assoc Thai*. 2005 Nov;88 Suppl 9:S57-62.
- Amano S. Transplantation of corneal endothelial cells. *Nippon Ganka Gakkai Zasshi*. 2002 Dec;106(12):805-35. Review
- Mimura T, Yokoo S, Araie M, Amano S, Yamagami S. Treatment of rabbit bullous keratopathy with precursors derived from cultured human corneal endothelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2005 Oct;46(10):3637-44.

# 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) o en planillas de cálculo (excel).

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](mailto:analecta@fcv.unlp.edu.ar)

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