



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

# ANALECTA

# VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 31 n° 1, 2011

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

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

## Autoridades

### Decano

Méd.Vet. Eduardo Rafael Pons

### Vicedecano

Dr. Daniel Osvaldo Arias

### Secretario de Asuntos Estudiantiles

Méd.Vet. Fernando Pedro Marino

### Secretaria de Ciencia y Técnica

Dr. Adriana Massone

### Secretario de Extensión

Méd.Vet. Guillermo Broglia

### Secretario de Posgrado

Dr. Eduardo Carlos Mórtola

### Prosecretario Académico de

#### Gestión Curricular

Méd.Vet. César Augusto Savignone

### Prosecretario Académico de

#### Gestión en Enseñanza

Dr. Alejandro Palacios

### Prosecretario de Bienestar Estudiantil

Méd.Vet. Hernán Javier Figueredo

### Prosecretaria de Bienestar Estudiantil

Méd.Vet. María Eugenia Mangialavori

## ANALECTA VETERINARIA

### Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

### Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

### Comité Editorial

#### (Facultad de Ciencias Veterinarias)

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Dr. Florestán Maliandi

Dra. Pilar Peral García

Dr. Carlos Perfumo



*Foto de tapa: Facultad de Veterinaria (Consejo Académico) Medios del siglo XX.*

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.

#### ANALECTA

**Pronunciación:** «a-n&l-'ek-t&

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

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/>

Directory of Open Access Journals

<http://www.doaj.org/>

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**

### **Evaluadores de trabajos de**

#### **ANALECTA VETERINARIA**

ANALECTA VETERINARIA convoca para la evaluación de sus artículos a reconocidos profesionales con amplia trayectoria en las diferentes disciplinas que contemplan las Ciencias Veterinarias.

### **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



# ANALECTA VETERINARIA Vol 31 n° 1, 2011

## Artículos de Investigación/Research articles

**PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA ENCEFALOMIELITIS MURINA DE THEILER EN COLONIAS DE RATONES DE ARGENTINA.** PREVALENCE OF ANTIBODIES AGAINST THEILER MURINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS IN MICE COLONIES OF ARGENTINA. Laborde JM, Cagliada MdelP, Ayala MA, Carriquiriborde M, Milocco SN, Bonzo E, Cid de la Paz V, Galosi CM, Carbone C. **5-9**

**REPORT OF MYCOBACTERIA ISOLATED FROM DOMESTIC AND WILDLIFE SPECIES DURING 2004-2008.** MICOBACTERIAS AISLADAS DE ESPECIES DOMÉSTICAS Y SILVESTRES DURANTE 2004-2008. Traversa MJ, Jorge MC, Garbaccio D, Draghi MG, Abdala A, Tarabla H, Schneider M, Magnano G, Zumárraga M, Rodríguez L, Huertas P, Morsella C, Paolicchi F. **10-14**

**SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS DE CASOS CLÍNICOS DE ORIGEN PORCINO Y AVIAR.** ANTIMICROBIAL SENSIBILITY OF BACTERIAL ISOLATES FROM CLINICAL CASES FROM PORCINE AND AVIAN SOURCE. Vigo G, Moredo F, Pantozzi F, Ibar M, Giacoboni G. **15-21**

**EVALUACIÓN DE SISTEMAS DE ALOJAMIENTO PARA RATONES INMUNODEFICIENTES BAJO EXPERIENCIA.** HOUSING SYSTEMS EVALUATION FOR IMMUNODEFICIENT MICE UNDER EXPERIENCE. Principi G, Maschi F, Laborde JM, Carriquiriborde M, Cagliada P, Carbone C. **22-30**

**ULTRAESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE DEL MACHO CABRÍO ENANO AFRICANO (*Capra hircus*).** SPERMATOZOA ULTRASTRUCTURE OF THE DWARF AFRICAN BUCK (*Capra hircus*). Faisal F, Laplace R, Soto AT, Migliorisi L, Gómez V, Jurado S. **31-35**

## Comunicaciones breves/Short communications

**OBSTRUCCIÓN DE VÍAS AÉREAS INFERIORES POR CUERPO EXTRAÑO EN PERROS: DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO ENDOSCÓPICO.** OBSTRUCTION OF CANINE LOWER AIRWAYS BY FOREIGN BODIES: DIAGNOSIS AND ENDOSCOPIC TREATMENT. Giordano AL, Baschar HA, Aprea AN. **36-39**

## Revisiones/Review

**INFECCIÓN POR *Mycoplasma suis* EN EL CERDO. UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.** *Mycoplasma suis* INFECTION IN PIGS. A REVIEW OF THE LITERATURE. Pintos ME, Scodellaro CF, Perfumo CJ, Posik D, Arauz MS. **40-46**

**PRIONES Y ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES: UN RECORRIDO POR SU HISTORIA.** PRIONS AND TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES: A TOUR AROUND ITS HISTORY. Pena I del C. **47-60**



## PREVALENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS DE LA ENCEFALOMIELITIS MURINA DE THEILER EN COLONIAS DE RATONES DE ARGENTINA

Laborde JM<sup>1</sup>, Cagliada Mdelp<sup>1</sup>, Ayala MA<sup>1</sup>, Carriquiriborde M<sup>1</sup>, Milocco SN<sup>1</sup>, Bonzo E<sup>2</sup>, Cid de la Paz V<sup>3,4</sup>, Galosi CM<sup>3,4</sup>, Carbone C<sup>1</sup>

Cátedras de <sup>1</sup>Animales de Laboratorio y Bioterio, <sup>2</sup> Epidemiología y <sup>3</sup>Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

<sup>4</sup>Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

**RESUMEN:** *En el presente estudio se analizó la prevalencia de anticuerpos contra el virus de la encefalomyelitis de Theiler en colonias de ratones de Argentina. En el primer ensayo se analizaron 352 sueros por ELISA indirecto (iELISA) e inmunofluorescencia indirecta (IFI). La prevalencia establecida fue del 73 y 67 %, respectivamente, siendo los valores de sensibilidad, especificidad y kappa de 100%, 76,2% y 0,8 respectivamente. En un segundo análisis realizado únicamente por iELISA, en 558 sueros provenientes de 53 colonias, se obtuvo una seroprevalencia de 72,6%, entre valores de 0% hasta 100% .La prevalencia más elevada se observó en bioterios sin barreras sanitarias. Las infecciones del virus Theiler en colonias de ratones puede interferir con los resultados experimentales; esto se relaciona con una infraestructura deficiente, falta de entrenamiento del personal y un manejo inadecuado de la colonia.*

**Palabras clave:** Argentina, prevalencia, virus de la encefalomyelitis de Theiler.

## PREVALENCE OF ANTIBODIES AGAINST THEILER MURINE ENCEPHALOMYELITIS VIRUS IN MICE COLONIES OF ARGENTINA

**ABSTRACT:** *This study analyzes the prevalence to antibodies of Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) in mice colonies of Argentina. A first study performed by indirect enzyme-linked immunosorbent assay (iELISA) and indirect fluorescent antibody test (IFI) on 352 sera determined a prevalence of antibodies of 73% and 67% respectively with sensitivity of 100% and 76,2% respectively and 0,8 of kappa value. In a second assay performed only by iELISA on 558 sera from 53 colonies a seroprevalence of 72,6% varying between 0% to 100% was obtained. The higher values were found in those animal facilities without barrier systems. Theiler virus infections in mouse colonies could interfere with experimental results; this may be due to a lack of barriers, and poor staff training and colony management in the facility.*

**Key words:** Argentina, Prevalence, Theiler encephalomyelitis virus.

Fecha de recepción: 16/08/10

Fecha de aprobación: 10/03/11

**Dirección para correspondencia:** Lic. Juan M Laborde, Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio, Universidad Nacional de La Plata. CC 296, CP 1900 La Plata. Tel. / Fax: +54-221-421-1276.

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

## INTRODUCCIÓN

La presencia de agentes infecciosos en colonias de animales de laboratorio representa un serio problema en la investigación biomédica. La mayoría de los microorganismos patógenos en general causan infecciones subclínicas o asintomáticas y eventualmente pueden provocar signos clínicos. La interferencia que causan estos agentes se debe a que producen alteraciones en los parámetros fisiológicos que se comportan como variables significativas en los resultados experimentales (1, 2, 3, 4).

Uno de los virus murinos que afectan a los animales de laboratorio, es el virus de la Encefalomielitis Murina de Theiler (TMEV) que pertenece al género *Cardiovirus* de la familia *Picornaviridae* (5). Infecta naturalmente a ratones y ratas, a diferencia de los hámsters que pueden ser infectados solo experimentalmente. El TMEV produce infecciones asintomáticas en el tracto intestinal y puede llegar al sistema nervioso central (SNC) causando poliomielitis y menos frecuentemente encefalitis (6, 7), luego de la inoculación intracerebral en ratones. El TMEV se clasificó en dos grupos de acuerdo con su actividad biológica. El primer grupo está integrado por dos cepas altamente virulentas (GDVII y FA), las cuales inducen una encefalitis aguda y fatal. El segundo grupo está formado por las cepas originales (TO, WW, DA y BeAn) que son menos virulentas y causan lesiones en el SNC y poliomielitis seguida de inflamación crónica desmielinizante debido a la persistencia viral (8, 9). Su distribución es mundial con niveles de prevalencia variables que pueden llegar hasta el 70 % (10).

La desmielinización producida por el TMEV presenta parámetros inmunes e histopatológicos similares a aquellos que produce la esclerosis inflamatoria múltiple (MS) por lo que la infección experimental por TMEV se utiliza como modelo para el estudio de esta enfermedad (7, 11).

Las dos técnicas serológicas utilizadas corrientemente para el diagnóstico de TMEV son la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el enzimo- inmunoensayo (ELISA). La IFI es el test de elección para ser utilizado en un pequeño número de muestras. El ELISA es reconocido actualmente como una excelente alternativa por su mayor sensibilidad (S) y especificidad (E) y por ser una técnica sencilla y fácil de implementar lo cual facilita el análisis de un gran número de muestras (12).

Actualmente existe escasa información sobre las contaminaciones por TMEV en colonias de ratones en nuestro país. El objetivo de este trabajo fue determinar la prevalencia de anticuerpos (Ac) contra este virus en colonias de ratones de experimentación en Argentina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### TECNICA DE ELISA

Se utilizó un ELISA indirecto (iELISA) previamente estandarizado usando un antígeno elaborado a partir de células de riñón de hamsters lactantes (BHK-21) infectadas con la cepa GDVII, suero antiratón conjugado con peroxidada como Ac secundario y azinodietilbenzotiazol-sulfonato (ABTS) y  $H_2O_2$  como sustrato. La reacción fue leída en un lector de ELISA (Titertek Multiskán Flow Laboratory, USA). Se consideraron positivos aquellos sueros que superaron el punto de corte determinado por el valor correspondiente a 2 valores promedio de absorbancia del suero negativo de referencia (13).

### TÉCNICA DE INMUNOFLUORECENCIA

Se desarrolló con células BHK-21 infectadas y fijadas con acetona fría sobre láminas teflonadas. Cada suero problema fue analizado por duplicado en la dilución 1:5 y como Ac secundario se utilizó un suero antiratón conjugado con fluoresceína. La reacción fue leída en un microscopio de fluorescencia (13).

### EXPERIENCIA A

Se analizaron 352 sueros provenientes de ratones de 18 diferentes bioterios convencionales, por las técnicas de iELISA e IFI. Se calcularon los valores de S, E y el valor de kappa (WinEpiscop 2.0). El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de comparación de proporciones (Epidat 3.1) utilizando un nivel de confianza de 95 %.

### EXPERIENCIA B

De acuerdo a los resultados obtenidos en la Experiencia A, en la segunda experiencia se analizaron 558 sueros representativos de 53 colonias de animales de experimentación, solamente por la técnica de iELISA. Los sueros analizados en la experiencia A fueron también incluidos en este segundo análisis. Se determinó el intervalo de confianza ( $IC_{95\%}$ ) mediante el método exacto basado en la Distribución Binomial (Epidat 3.1) y se aplicó la prueba de chi cuadrado (EpiInfo) para observar diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre establecimientos con o sin barreras sanitarias.

## RESULTADOS

Del total de sueros analizados en la experiencia A, 238 resultaron positivos y 94 negativos por ambas técnicas. Veinte sueros positivos por iELISA fueron negativos por IFI. No se observaron sueros positivos por IFI y negativos por iELISA. La prevalencia establecida calculada por iELISA e IFI fue del 73 y 67 %, respectivamente. Los valores de S y E fueron de 100 % y 76,2 % respectivamente obteniéndose un valor de kappa de 0,8.

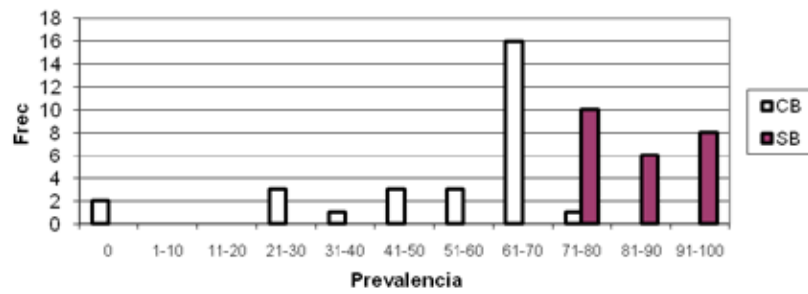


Figura 1. Prevalencia de anticuerpos contra el virus de la encefalomiелitis murina de Theiler en diferentes colonias de ratones convencionales de Argentina con barreras sanitarias (CB) y sin barreras sanitarias (SB)

Del total de 558 sueros analizados en la experiencia B, se obtuvo una seroprevalencia de 72,6 % (405/558), variando entre valores de 0 % hasta 100 %. Se hallaron prevalencias mayores a 70 % en el 100 % en muestras provenientes de bioterios sin barreras sanitarias (SB). En sólo 1 bioterio con barreras sanitarias (CB) se observó una prevalencia mayor de 70 %. Al aplicar la prueba de chi cuadrado se hallaron diferencias significativas ( $p < 0.01$ ) entre ambos grupos.

## DISCUSIÓN

Debido a que con los resultados obtenidos en la experiencia A no se pudo establecer una prevalencia representativa, se incorporaron más muestras de suero al estudio, provenientes de diferentes colonias de ratones en las que se utilizó solamente la prueba de iELISA ya que su S y E habían sido determinadas en trabajos previos (13).

Se determinó que el TMEV se encuentra presente en los bioterios convencionales de Argentina. Se observó que las diferencias entre bioterios CB y SB son significativas, indicando en el primer caso la necesidad de validar la eficiencia de los sistemas de barreras adoptados y en el segundo la instalación de estos sistemas.

La alta prevalencia de este virus se puede asociar o relacionar con una infraestructura deficiente, falta de entrenamiento del personal o con un mal manejo del bioterio ya sea de producción o experimentación (2, 3).

La presencia de este virus en las colonias de animales de experimentación puede estar interfiriendo con investigaciones relacionadas con el SNC en las que se utiliza el ratón como reactivo biológico. Estos resultados indican también que es necesario desarrollar e implementar un método rápido, sensible y específico como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la detección de ARN viral en las colonias.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Hansen AK. Health status and the effects of microbial organisms on animal experiments. In: Svendsen P, Han J. Handbook of laboratory animal science. Vol.

I: Selection and handling of animals in biomedical research, Boca Ratona, Florida. CRC Press, Inc. 1994; p. 125-153.

2. Gilioli R. Controle virológico em animais de laboratório. In: De Lucca RR, Alexandre SR, Marques T, Souza NL, Merusse JLB, Neves SP. Manual para técnicos em bioterismo. 2ª Edición. Sao Paulo: COBEA-FINEP, 1996; p. 139-148.

3. Rehlinger C. Health monitoring. In: Svendsen P, Han J. Handbook of laboratory animal science. Vol. I: Selection and handling of animals in biomedical research, Boca Ratona, Florida. CRC Press, Inc. 1994; p. 155-167.

4. Descoteaux JP, Grignon-Archambault D, Luisier G. Serologic study on the prevalence of murine viruses in five Canadian mouse colonies. Lab. Anim. Sci. 1977; 27(5): 621-626.

5. Theiler M. Spontaneous encephalomyelitis of mice, a new virus disease. J. Exp. Med. 1937; 163: 620-631.

6. Baker DG. Natural pathogens of laboratory mice, rats and rabbits and their effect on research. Clin. Microbiol. Rev. 1998; 11(2): 231-266.

7. Brahic M. Theiler's virus infection of the mouse, or: Of the importance of studying animal models. Virology, 2002; 301: 1-5.

8. Calenoff MA, Faaberg KS, Lipton HL. Genomic regions of neurovirulence and attenuation in Theiler murine encephalomyelitis virus. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 1990; 87: 978-982.

9. Miyata H, Sato H. Theiler's murine encephalomyelitis virus: characterization of newly isolated viruses from Japanese mouse colonies. Jikken Dobutsu 1990; 39:539-548.

10. Gilioli R. Avaliação do perfil sanitario de colonias de camundongos e de ratos em bioterios brasileiros: ocorrência de bacterias, parasitas e virus murinos. Tese de Doutorado em Genética e Biología Molecular, Área de Microbiología. Instituto de Biología, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2003; 138p.

11. Pachner AR, Libin L, Narayan K. Intrathecal antibody production in an animal model of multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2007; 185: 57-63.

12. Waggle K, Kagiya N, Allen A, Nomura T. Manual of microbiologic monitoring of laboratory animals, 2nd ed. (NIH publication no. 94-2498). U.S. Department

Tabla 1: Prevalencia de anticuerpos contra virus de la encefalomiелitis murina de Theiler (TMEV), determinada por iELISA, en Bioterios (muestras) convencionales de Argentina.

ID muestra	Barreras	n	(+)	(-)	% (+)	IC (95%)	
1	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
2	CB	12	9	3	75%	42,8	94,5
3	SB	10	10	0	100%	69,2	100,0
4	CB	15	8	7	53%	26,6	78,7
5	SB	10	9	1	90%	55,5	99,7
6	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
7	SB	10	10	0	100%	69,2	100,0
8	CB	12	8	4	67%	34,8	90,0
9	SB	10	10	0	100%	68,2	100,0
10	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
11	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
12	SB	10	9	1	90%	55,5	99,7
13	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
14	CB	10	7	7	70%	34,7	93,3
15	SB	10	10	0	100%	68,2	100,0
16	CB	20	13	7	65%	40,7	84,6
17	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
18	CB	10	0	10	0%	0,0	30,8
19	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
20	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
21	SB	10	9	9	90%	55,5	99,7
22	SB	15	12	3	80%	51,9	95,6
23	SB	10	10	0	100%	68,2	100,0
24	SB	10	8	8	80%	44,4	97,4
25	SB	10	9	1	90%	55,5	99,7
26	SB	20	17	3	85%	62	96,7
27	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
28	CB	10	4	6	40%	12,15	73,7
29	SB	10	9	1	90%	55,5	99,7
30	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
31	CB	10	3	7	30%	6,7	65,2
32	CB	10	5	5	50%	18,7	81,2
33	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
34	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
35	CB	12	8	4	67%	34,8	90
36	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
37	CB	10	3	7	30%	6,7	65,2
38	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
39	CB	10	5	5	50%	18,7	81,2
40	SB	10	10	0	100%	68,2	100,0
41	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
42	CB	10	0	10	0%	0,0	30,8
43	CB	10	6	4	60%	26,2	87,4
44	CB	12	8	4	67%	34,8	90
45	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
46	SB	10	10	0	100%	68,2	100,0
47	CB	10	3	7	30%	6,7	65,2
48	SB	10	10	0	100%	68,2	100,0
49	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
50	CB	12	6	6	50%	21,0	78,9
51	CB	10	7	3	70%	34,7	93,3
52	SB	10	8	2	80%	44,4	97,4
53	CB	10	6	4	60%	26,2	87,4
TOTAL		558	405	175	73%	67,5	76,1

Se detallan positivos (+), negativos (-) e intervalo de confianza (IC95%) determinado mediante el método exacto basado en la Distribución Binomial



of Health and Human Services, National Institutes of Health, Bethesda MD. 1994.

13. Laborde JM, Carbone C, Corva SG, Galosi CM. Evaluation of an indirect enzyme-linked immunosorbent assay for routine screening of Theiler encephalomyelitis virus antibodies in mice colonies. J.Vet. Diagn. Invest. 2008; 20 (6): 789-791.

## REPORT OF MYCOBACTERIA ISOLATED FROM DOMESTIC AND WILDLIFE SPECIES DURING 2004-2008

Traversa MJ<sup>1</sup>, Jorge MC<sup>1</sup>, Garbaccio D<sup>2</sup>, Draghi MG<sup>3</sup>, Abdala A<sup>4</sup>, Tarabla H<sup>4</sup>, Schneider M<sup>5</sup>, Magnano G<sup>5</sup>, Zumárraga M<sup>6</sup>, Rodríguez L<sup>2</sup>, Huertas P<sup>2</sup>, Morsella C<sup>7</sup> Paolicchi F<sup>7</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Sanidad Animal y Medicina Preventiva. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires.

<sup>2</sup>Instituto de Patobiología. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

<sup>3</sup>Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Mercedes. INTA.

<sup>5</sup>Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto. Córdoba.

<sup>6</sup>Instituto de Biotecnología. INTA. <sup>7</sup> Estación Experimental Agropecuaria (EEA) Balcarce. INTA.

**ABSTRACT:** *Detection and identification of bovine tuberculosis and its differentiation from micobacteriosis is fundamental during diagnoses. That is why mycobacteria laboratories improvement becomes essential in public health and veterinary medicine services. The objective of the present research is to differentiate Mycobacterium bovis and nontuberculous mycobacterias in isolates cultured from domestic and wildlife species from seven Argentinean provinces during 2004-2008. Differentiation was based on biochemical tests, phenotypic characteristics and M. bovis spoligotyping. Biochemical and phenotypic identification resulted in 20 M. bovis strains, 18 of them were confirmed by spoligotyping, and 34 nontuberculous mycobacteria strains. Thirteen species were characterized and all of them were grouped considering biological risk and pathogenic potential reported in humans and/or animals. Here we have reached advances in tuberculosis and micobacteriosis diagnoses in veterinary medicine. In this area diagnoses are often based on micro and macroscopic observation of the tubercles and skin test results. These advances are not minor as zoonotic tuberculosis is still a public health problem in Latin America.*

**Keywords:** *Mycobacterium*, report, animals, wildlife, domestic

## MICOBACTERIAS AISLADAS DE ESPECIES DOMÉSTICAS Y SILVESTRES DURANTE 2004-2008

**RESUMEN:** *La identificación de la tuberculosis bovina y su diferenciación de las micobacteriosis es fundamental durante el diagnóstico. Es por eso que los laboratorios especializados en micobacterias son de suma importancia en los servicios de salud pública y salud animal. El objetivo de la presente investigación es diferenciar Mycobacterium bovis de micobacterias no tuberculosas en cepas cultivadas a partir de especies domésticas y silvestres de siete provincias de Argentina durante 2004-2008. La diferenciación se basó sobre las pruebas bioquímicas, las características fenotípicas y el "spoligotyping" de M. bovis. Con la identificación bioquímica y fenotípica se detectaron 20 cepas de M. bovis, 18 de las cuales fueron confirmadas mediante "spoligotyping", y 34 cepas de micobacterias no tuberculosas. Trece especies fueron caracterizadas y todas ellas fueron agrupadas considerando el riesgo biológico y el potencial patógeno notificado en seres humanos y/o animales. En este trabajo se han logrado avances en el diagnóstico de tuberculosis y micobacteriosis en medicina veterinaria. En este área el diagnóstico habitualmente se basa sobre la observación micro y macroscópica de los tubérculos y los resultados de la intradermorreacción. Estos avances son importantes porque la tuberculosis zoonótica aún es un problema de salud pública en América Latina.*

**Palabras clave:** *Mycobacterium*, notificación, animales, silvestres, domésticos

Fecha de recepción: 13/09/10

Fecha de aprobación: 20/05/11

**Dirección para correspondencia:** M. Julia Traversa. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. Paraje Arroyo Seco s/n. 7000 Tandil. Buenos Aires. Argentina. . Tel/Fax: +54-2293-439850 E-mail: [mjt@vet.unicen.edu.ar](mailto:mjt@vet.unicen.edu.ar)

## INTRODUCTION

Mycobacteria are causative microorganisms of tuberculosis in human beings and animals, they also cause the disease called micobacteriosis (1, 2). The genus *Mycobacterium* can be divided into three groups based on clinical implications, the first one includes strict pathogens as the members of the *M. tuberculosis* complex. The second group consists of mycobacteria potentially pathogens and the third is composed by non-pathogenic or exceptionally pathogenic species also known as saprophytic mycobacteria. Second and third group species are often literary referred to as nontuberculous mycobacteria (NTM), paratuberculous mycobacteria, anonymous mycobacteria, mycobacteria other than tuberculosis or atypical mycobacteria (1, 2, 3).

Identification of *Mycobacterium* strains to species level has been traditionally based on the results of biochemical tests and phenotypic characteristics like growth rate and pigmentation. Although most of these tests are simple to perform and do not require sophisticated equipment, their results are often delayed because mycobacteria present low replication rate. These can be a serious trouble in the clinical field of public health (2), but it is not the same in animal health wherein samples often come from dead animals (4). Nevertheless traditional methods constitute the main procedure for mycobacteria identification, especially in countries with low economic resources (2, 4).

During last years methods that analyse microbial genetics have been improved, they often detect highly conserved regions within the genome that harbour hypervariable sequences in which species-specific events are present (2). Mycolic acids profiles obtained with chromatographic techniques are also used as genera chemotaxonomic traits (1). Moreover mycobacteriophages are employed as diagnostic markers to improve and expedite the recognition of pathogenic mycobacteria as well as their drug resistance (5).

Even though some mycobacteria laboratories in veterinary medicine have improved *M. bovis* and NTM detection and identification, bovine tuberculosis is still a health problem in non-industrialized regions and its differentiation from micobacteriosis is fundamental during differential diagnosis. The objective of the present research is to identify *M. bovis* and NTM in isolates cultured from domestic and wildlife species from seven Argentinean provinces during 2004-2008.

## MATERIALS AND METHODS

### SAMPLES AND BACTERIAL ISOLATION

During this study acid fast bacilli (AFB) were isolated in seven animal health research

centres. Samples were obtained from dairy and beef cattle farms that presented positive reactors to the tuberculin skin test and consisted of nasal swabs, milk and tissue from necropsy material. Samples from wildlife species were tissue from necropsy material taken following animal welfare protocols. Sampled animals shared the habitat with the animal population of selected farms.

To obtain mycobacteria strains samples were processed and decontaminated using Petroff protocol. Culture was performed at 37 °C in Löwenstein-Jensen and Stonebrink solid media and speed of growth was registered weekly (6, 7, 8).

Bacterial primary isolations obtained in each research centre were transported to identification laboratory properly stored following biosecurity recommendations (8, 9).

### PHENOTYPIC IDENTIFICATION

To confirm the presence of AFB in purity smears were stained with Ziehl-Neelsen method and were observed with optic microscope oil immersion objective (10). Then colonies aspect and pigment production were verified, when colonies were not pigmented it was registered if eugonic growth was present in Stonebrink or Löwenstein-Jensen media. This practice focused *M. bovis* search because it presents eugonic growth only in Stonebrink media (6, 7, 8, 9).

Pigment production and optimal temperature of growth tests were done in all strains under study. The information obtained in those tests was used to include each strain in a Runyon group.

### BIOCHEMICAL IDENTIFICATION

To verify the presence of *M. bovis* differentiation protocol proposed by de Kantor and Bernardelli in 1987 (11) was employed and NTM were characterized with the biochemical tests sequences suggested by de Kantor (6, 7), Thorel *et al.* (12) and Lévy-Frébault & Portaels (13). Since 2005 flow charts and interactive tables developed by Leao *et al.* had been implemented (2).

### SPOLIGOTYPING

To genotype 18 *M. bovis* isolates the cultures were subjected to spoligotyping as Kamerbeek *et al.* (14) has described. Briefly a loopfull of bacteria was suspended in distilled water and boiled for 30 minutes. After centrifugation supernatant was used for PCR to perform spoligotyping (Ocimum Biosolutions B. V.). Clusters of isolates were defined as two or more *M. bovis* strains with identical spoligotypes. Each spoligotype was allocated with a number according to data base of Biotechnology Institute, INTA-Castelar.



Table 1. Phenotypic and fundamental characteristics of Mycobacterium species under study

MYCOBACTERIUM SPECIE	RISK LEVEL	HUMAN BEINGS REPORTED INFECTION	ANIMALS REPORTED INFECTION	SPEED OF GROWTH	PIGMENT PRODUCTION	RUNYON GROUP
<i>M. bovis</i>	III	Yes	Yes	Slow	Not pigmented	III
<i>M. avium/ intracellulare</i>	II	Yes	Yes	Slow	Not pigmented	III
<i>M. flavescens</i>	I	No	No	Slow	Schotochromogen	II
<i>M. gastri</i>	II	Yes	No	Slow	Not pigmented	III
<i>M. malmoense</i>	II	Yes	No	Slow	Not pigmented	III
<i>M. nonchromogenicum</i>	I	No	No	Slow	Not pigmented	III
<i>M. shimoidei</i>	II	Yes	No	Slow	Not pigmented	III
<i>M. szulgai</i>	II	Yes	No	Slow	Schotochromogen/ Photochromogen*	I / II
<i>M. terrae</i>	I	No	No	Slow	Not pigmented	III
<i>M. chelonae</i>	II	Yes	Yes	Fast	Not pigmented	IV
<i>M. chitae</i>	I	No	No	Fast	Not pigmented	IV
<i>M. phlei</i>	I	No	Yes	Fast	Schotochromogen	IV
<i>M. smegmatis</i>	I	Yes	Yes	Fast	Not pigmented	IV
<i>M. thermoresistibile</i>	I	Yes	Yes	Fast	Schotochromogen	IV

\*Schotochromogen at 37°C and photochromogen at 25 °C

Although NTM were isolated from tubercle like lesions we are not able to induce that those animals were mycobacteria infected or diseased because pseudoinfection during collection of samples may occur. Moreover in animal health it is a real possibility because bovine necropsies are performed by veterinary surgeons in the field so samples in aseptic conditions are not easy to obtain. Pseudocontamination can occur during the course of analysis in the laboratory, and is more frequent if the strains are processed in batches (2). We made laboratory work in batches, but including in the biosecurity cabinet open plates with micobacteria specific media to detect cross contamination. Those plates were incubated and followed with each batch of strains.

In veterinary medicine it is difficult to deepen in pathological studies because samples often come from *post mortem* lesions so it is not easy to perform repeated isolation. This is one necessary requirement to corroborate a NTM as the cause of disease (26) that is why research in experimental models reproducing mycobacteriosis are needed as is the case of the *M. fortuitum* infection model (21).

Diagnoses of tuberculosis and micobacteriosis in animal populations are often based on micro and macroscopic observation of the tubercles and tuberculosis skin test results. In the present research advances have been reached because primary isolations and species level differentiation were done. These are not minor goals because zoonotic tuberculosis is still a health problem in some Latin American countries (16) wherein the majority of the economies are emerging or developing ones with scarce access to the technologies currently used by mycobacteriologists in high income countries.

## REFERENCES

1. Rastogi N, Legrand E, Sola C. The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis. Rev sci tech Off int Epiz 2000; 20 (1): 21-54.

2. Leao SC, Martin A, Mejia GI, Palomino JC, Robledo J, Telles MAS, Portaels F, 2005; Practical handbook for the phenotypic and genotypic identification of mycobacteria. Available: <http://www.esmycobacteriology.eu/Inco.htm>. Accessed 16<sup>th</sup> October 2008.

3. Good RC, Shinnick TM. *Mycobacterium*. In: Topley & Wilson's. Microbiology and microbial infections. Volume 2. Systematic bacteriology. Arnold Ed. Great Britain, 1998; p. 549-574.

4. de Kantor IN. Micobacterias. In: Microbiología Veterinaria. Ed. Stanchi et. al. Editorial Intermédica. Buenos Aires (Argentina), 2007; p. 300-306.

5. Rybniker J, Kramme S, Small PL. Host range of 14 mycobacteriophages in *Mycobacterium ulcerans* and seven other mycobacteria including *Mycobacterium tuberculosis* – application for identification and susceptibility testing. J Med Microbiol 2005; 55: 37-42.

6. de Kantor IN. Tuberculosis: Aislamiento e Identificación de Micobacterias. Centro Panamericano de Zoonosis-OPS-OMS. Buenos Aires (Argentina), 1973; p. 1-48.

7. de Kantor IN. Tuberculosis: Bacteriología de la Tuberculosis. Centro Panamericano de Zoonosis-OPS-OMS. Buenos Aires (Argentina), 1979; p. 1-63.

8. Jorge MC, Alito A, Bernardelli A, Canal A M, Cataldi A, Cicuta ME, Gentile F, Kistermann JC, Magnano G, Martínez Vivot ME, Oriani DS, Paolicchi FA, Pérez AM, Romano MI, Schneider M, Torres P, Zumárraga MJ. Manual de Diagnóstico de Micobacterias de importancia en Medicina Veterinaria. Comisión Científica de Micobacterias Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico. Santa Fe (Argentina), 2005; p. 1-132.

9. de Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval PY, Rieder H, Valenzuela P, Weyer K. Laboratory services in tuberculosis control. Culture. Part III. WHO. Biella (Italy), 1998; p. 1-95.

10. de Kantor IN, Kim SJ, Frieden T, Laszlo A, Luelmo F, Norval PY, Rieder H, Valenzuela P, Weyer K. Laboratory services in tuberculosis control. Microscopy. Part II. WHO. Biella (Italy), 1998; p. 1-61.

11. de Kantor IN, Bernardelli A. Identificación preliminar de micobacterias aisladas en muestras de origen humano y animal. Rev Med Vet 1987; 68 (2): 86-90.

**M.J. Traversa y col.**

12. Thorel MF, Krichevsky M, Lévy-Frébault VV. Numerical taxonomy of mycobactin-dependent mycobacteria, emended description of *Mycobacterium avium* subsp. *avium* subsp. nov., *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* subsp. nov. and *Mycobacterium avium* subsp. *silvaticum* subsp. nov. Int J Syst Bacteriol 1990; 40 (3): 254-260.
13. Lévy Frébault VV, Portaels F. Proposed minimal standards for the Genus *Mycobacterium* and description of new slowly growing *Mycobacterium* species. Int J of Syst Bacteriol 1992; 42 (2): 315-323.
14. Kamerbeek J, Schouls L, Kolk A, van Agterveld M, van Soolingen D, Kuijper S, Bunschoten A, Molhuizen H, Shaw R, Goyal M, van Embden J. Simultaneous detection and strain differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* for diagnosis and epidemiology. J Clin Microbiol 1997; 35: 907-914.
15. Torres PM. Situación de la tuberculosis bovina en la Argentina. In: Temas de zoonosis II. Asociación Argentina de Zoonosis. Buenos Aires (Argentina), 2004; p. 235-242.
16. de Kantor IN, Ambroggi M, Poggi S, Morcillo N, Da Silva Telles MA, Osório Ribeiro M, Garzón Torres MC, Llerena Polo C, Ribón W, García V, Kuffo D, Asencios L, Vásquez Campos LM, Rivas C, de Waard JH. Human *Mycobacterium bovis* infection in ten Latin American countries. Tuberculosis 2008; 88: 358-365.
17. de Lisle GW, Mackintosh CG, Bengins RG. *Mycobacterium bovis* in free-living and captive wildlife, including farmed deer. Rev sci tech Off int Epiz 2001; 20 (1): 86-111.
18. Wilkins MJ, Meyerson J, Bartlett PC, Spieldenner SL, Berry DE, Mosher LB, Kaneene JB, Robinson-Dunn B, Stobierski MG, Boulton ML. Human *Mycobacterium bovis* Infection and Bovine Tuberculosis Outbreak, Michigan, 1994-2007. Emerg Infect Dis 2008; 14 (4): 657-660.
19. Zumárraga M J, Martín C, Samper S, Alito A, Latini O, Bigi F, Roxo E, Cicuta M E, Errico F, Castro Ramos M, Cataldi A, van Soolingen D, Romano MI. Usefulness of spoligotyping in the molecular epidemiology of *Mycobacterium bovis* related infections in South American countries. J Clin Microbiol 1999; 37 (2): 296-303.
20. Cousins DV. *Mycobacterium bovis* infection and control in domestic livestock. Rev sci tech Off int Epiz 2001; 20 (1): 71-85.
21. Bercovier H, Vincen V. Mycobacterial infections in domestic and wild animals due to *Mycobacterium marinum*, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, *M. porcinum*, *M. farcinogenes*, *M. smegmatis*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. kansasii*, *M. simiae* and *M. genavense*. Rev sci tech Off int Epiz 2001; 20 (1): 265-290.
22. Hines ME II, Kreeger JM, Herron AJ. Mycobacterial infections of animals: pathology and pathogenesis. Lab Anim Sci 1995; 45 (4): 334-350.
23. Schultze WD, Stroud BH, Brasso WB. Dairy herd problem with mastitis caused by a rapidly growing *Mycobacterium* species. Am J Vet Res 1985; 46 (1): 42-47.
24. Kazda J, Cook BR. Mycobacteria in pond waters as a source of non-specific reactions to bovine tuberculin in New Zealand. N Z Vet J 1988; 36: 184-188.
25. Cooney R, Kazda J, Quinn J, Cook B, Müller K, Monaghan M. Environmental mycobacteria in Ireland as a source of non-specific sensitisation to tuberculin. Ir Vet J 1997; 50: 370-373.
26. Falkinham JO III. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin Microbiol Rev 1996; 9 (2): 177-215 .

## SENSIBILIDAD ANTIMICROBIANA DE AISLAMIENTOS BACTERIANOS DE CASOS CLÍNICOS DE ORIGEN PORCINO Y AVIAR

Vigo G<sup>1</sup>, Moredo F<sup>1</sup>, Pantozzi F<sup>2</sup>, Ibar M<sup>2</sup>, Giacoboni G<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Cátedra de Microbiología

<sup>2</sup> Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas  
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

**RESUMEN:** Se estudiaron los patrones de sensibilidad antimicrobiana frente a fosfomicina, difloxacina, gentamicina, amoxicilina/ ácido clavulánico, enrofloxacina y tetraciclina de cinco géneros bacterianos, de origen porcino y aviar, aislados a partir de casos clínicos. La metodología utilizada fue la de difusión en agar. Se encontró un alto porcentaje de cepas sensibles a gentamicina, con la excepción del género *Streptococcus* que tuvo un alto porcentaje de cepas con sensibilidad intermedia. Todos los aislamientos fueron sensibles a amoxicilina-ácido clavulánico, salvo una cepa de *Salmonella Infantis* de origen aviar que fue resistente. Un alto porcentaje de aislamientos resistentes se encontró para tetraciclina. Los resultados obtenidos para las dos quinolonas ensayadas (enrofloxacina y difloxacina) fueron similares; se obtuvo un alto porcentaje de cepas sensibles con la excepción de algunos aislamientos de *Escherichia coli* de origen porcino y aviar y de algunas cepas de *Staphylococcus aureus* de origen aviar, que presentaron un alto porcentaje de resistencia. Todos los aislamientos fueron sensibles a la fosfomicina. Es de suma importancia conocer la situación y la evolución de la resistencia bacteriana a los diferentes antimicrobianos utilizados en medicina veterinaria.

**Palabras clave:** bacterias, antimicrobianos, antibiograma.

## ANTIMICROBIAL SENSIBILITY OF BACTERIAL ISOLATES FROM CLINICAL CASES FROM PORCINE AND AVIAN SOURCE

**Abstract:** The antimicrobial resistance sensibility profiles against fosfomycin, difloxacin, gentamicin, amoxicillin-clavulanic acid, enrofloxacin and tetracycline of five bacterial genera of porcine and avian source isolated from clinical cases were studied. The diffusion agar was the methodology used. A high percentage of sensible strains to gentamicin was found, with the exception of *Streptococcus* generum that had a high percentage of intermediate sensibility strains. All the isolates were sensible to amoxicillin-clavulanic acid, excepting one *Salmonella Infantis* strain from avian source that was resistant. A high percentage of resistant isolates to tetracycline was found. The results obtained for the two quinolones tested (enrofloxacin and difloxacin) were similar, a high percentage of sensible strains was obtained with the exception of some *Escherichia coli* isolates from porcine and avian source and some *Staphylococcus aureus* strains from avian source that showed a high percentage of resistance. All the isolates were sensible to fosfomycin. It is very important to know the situation and the evolution of the bacterial resistance to different antimicrobials used in veterinary medicine.

**Key words:** (bacteria), (antimicrobials), (antibiogram).

Fecha de recepción: 10/11/10

Fecha de aprobación: 20/05/11

**Dirección para correspondencia:** Germán Vigo, Cátedra de Microbiología. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

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

## INTRODUCCIÓN

Si bien, los antimicrobianos son utilizados en el tratamiento de las infecciones bacterianas, éstas cuentan con diferentes mecanismos para adquirir resistencia frente a ellos. Considerándose a la resistencia antimicrobiana un grave problema a nivel mundial, muchos países implementaron sistemas de monitoreo tanto en bacterias de origen humano como animal.

En la actualidad, por el uso inadecuado y el abuso en la utilización de antibióticos, se detectan con mayor frecuencia, aislamientos bacterianos multirresistentes, lo que implica un grave problema ya que en estas cepas es muy limitado el espectro de antimicrobianos a utilizar para el tratamiento terapéutico.

En medicina veterinaria, los antimicrobianos son utilizados con diferentes finalidades: terapéutica, profiláctica y como promotores de crecimiento. En nuestro país, no se realizaron suficientes investigaciones sobre sensibilidad antimicrobiana en animales como para conocer y contar con datos fidedignos sobre esta problemática. Como consecuencia, el objetivo del trabajo fue determinar el perfil de sensibilidad de cinco géneros bacterianos frecuentemente aislados de casos clínicos en porcinos y aves, frente a fosfomicina, gentamicina, enrofloxacin, difloxacin, amoxicilina/ácido clavulánico y tetraciclina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron en el ensayo un total de 119 aislamientos bacterianos pertenecientes a la colección de cepas del Laboratorio de Diagnóstico e Investigaciones Bacteriológicas de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata.

### CEPAS DE ORIGEN PORCINO (68):

*Streptococcus dysgalactiae* subespecie *equisimilis* (3), *Streptococcus suis* (2).

*Staphylococcus aureus* (18), *St. hyicus* (2), *St. intermedius* (1).

*Pasteurella multocida* subespecie *multocida* (12).

*Salmonella enterica* subespecie *enterica* (2), *S. Infantis* (1), *S. Derby* (1), *S. Heidelberg* (1), *S. Cholerasuis* (2), *S. Kottbus* (1), *S. Typhimurium* (7).

*Escherichia coli* (15).

### CEPAS DE ORIGEN AVIAR (51):

*Staphylococcus aureus* (4).

*Pasteurella multocida* (2), *P. multocida* subespecie *septica* (1), *P. multocida* subespecie *multocida* (15).

*Salmonella* (15): *Infantis* (1), *Livingstone* (1), *Corvallis* (1), *Agona* (2), *Enteritidis* (3), *Gallinarum* (7).

*Escherichia coli* (14).

Las cepas de los géneros *Staphylococcus*, *Salmonella* y *Escherichia coli* se sembraron en agar tripticasa soya (Britania, Bs. As., Argentina) y las cepas de los géneros *Streptococcus* y *Pasteurella* en agar sangre (Britania). Se comprobó su pureza y luego se realizó el antibiograma. La determinación de la sensibilidad a los antimicrobianos se realizó por el método de difusión en agar de acuerdo a las normas del Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>2</sup>.

En el estudio se utilizaron los siguientes antimicrobianos: fosfomicina 50 µg (FOS) (FOSBAC, Bedson S.A., Bs As, Argentina), difloxacin 10 µg (DFN) (Difloxacin Bedson, Bedson S.A.), gentamicina 10 µg (GEN) (Britania, Bs As, Argentina), amoxicilina-ácido clavulánico 20/10 µg (AMC) (Britania), tetraciclina 30 µg (TET) (Britania) y enrofloxacin 5 µg (ENR) (Oxoid Laboratory, England).

La interpretación de los resultados se realizó sobre la base de los documentos M-100 S 16 del Clinical and Laboratory Standards Institute<sup>2</sup> y M 31 A2 del National Committee for Clinical Laboratory Standards<sup>12</sup>.

Como cepas control se utilizaron *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

## RESULTADOS

En la tabla 1 se muestran los resultados obtenidos a partir de los cinco géneros bacterianos de origen porcino.

Los resultados de las tres cepas de *Streptococcus dysgalactiae* subespecie *equisimilis* fueron: una cepa con sensibilidad intermedia a gentamicina, las tres resistentes a tetraciclina, dos con sensibilidad intermedia a enrofloxacin, una con sensibilidad intermedia y una resistente a difloxacin. En *Streptococcus suis* una cepa presentó sensibilidad intermedia a gentamicina, una resistente a tetraciclina y una sensibilidad intermedia a enrofloxacin.

De las cepas de *Staphylococcus aureus*, 14 fueron ¿RESISTENTES? a tetraciclina, tres a enrofloxacin y tres a difloxacin. De las cepas de *Staphylococcus hyicus*, una presentó resistencia a tetraciclina. El aislamiento de *Staphylococcus intermedius* fue resistente a tetraciclina. *Salmonella* serovariedad *Infantis* fue resistente a amoxicilina-ácido clavulánico. Todas las serovariedades presentaron resistencia a la tetraciclina.

En la tabla 2 se muestran los resultados obtenidos a partir de los cinco géneros bacterianos de origen aviar. De las 15 cepas de *Pasteurella multocida* subespecie *multocida*, una fue resistente y seis presentaron sensibilidad intermedia a gentamicina, cuatro fueron resistentes a tetraciclina. *Pasteurella multocida*, un aislamiento fue resistente a gentamicina, enrofloxacin y difloxacin. *Pasteurella multocida* subespecie *septica*,



Tabla 1: Sensibilidad a seis antimicrobianos de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Salmonella* y *Escherichia* de origen porcino (n: 68)

ATB	Gén. Bact. (n)	Sensible n (%)	Intermedio n (%)	Resistente n (%)
GEN	<i>Streptococcus</i> (5)	3 (60)	2 (40)	0 (0)
	<i>Staphylococcus</i> (21)	21 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Pasteurella</i> (12)	10 (84)	1 (8)	1 (8)
	<i>Salmonella</i> (15)	15 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Escherichia</i> (15)	13 (87)	0 (0)	2 (13)
AMC	<i>Streptococcus</i> (5)	5 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Staphylococcus</i> (21)	21 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Pasteurella</i> (12)	12 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Salmonella</i> (15)	15 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Escherichia</i> (15)	15 (100)	0 (0)	0 (0)
TET	<i>Streptococcus</i> (5)	1 (20)	0 (0)	4 (80)
	<i>Staphylococcus</i> (21)	7 (33)	0 (0)	14 (67)
	<i>Pasteurella</i> (12)	10 (84)	0 (0)	2 (16)
	<i>Salmonella</i> (15)	0 (0)	0 (0)	15 (100)
	<i>Escherichia</i> (15)	5 (33)	0 (0)	10 (67)
ENR	<i>Streptococcus</i> (5)	2 (40)	3 (60)	0 (0)
	<i>Staphylococcus</i> (21)	19 (90)	0 (0)	2 (10)
	<i>Pasteurella</i> (12)	12 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Salmonella</i> (15)	15 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Escherichia</i> (15)	9 (60)	0 (0)	6 (40)
FOS	<i>Streptococcus</i> (5)	5 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Staphylococcus</i> (21)	21 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Pasteurella</i> (12)	12 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Salmonella</i> (15)	15 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Escherichia</i> (15)	15 (100)	0 (0)	0 (0)
DIF	<i>Streptococcus</i> (5)	2 (40)	2 (40)	1 (20)
	<i>Staphylococcus</i> (21)	19 (90)	0 (0)	2 (10)
	<i>Pasteurella</i> (12)	12 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Salmonella</i> (15)	15 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Escherichia</i> (15)	9 (60)	0 (0)	6 (40)

Gén. Bact.: género bacteriano; ATB: antimicrobiano; GEN: gentamicina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; TET: tetraciclina; ENR: enrofloxacin; FOS: fosfomicina; DIF: difloxacin

Tabla 2: Sensibilidad a seis antimicrobianos de los géneros *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Salmonella* y *Escherichia* de origen aviar (n: 51)

ATB	Gén. Bact. (n)	Sensible n (%)	Intermedio n (%)	Resistente n (%)
GEN	<i>Staphylococcus</i> (4)	4 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Pasteurella</i> (18)	12 (67)	5 (28)	1 (5)
	<i>Salmonella</i> (15)	14 (93)	0 (0)	1 (7)
	<i>Escherichia</i> (14)	12 (86)	0 (0)	2 (14)
AMC	<i>Staphylococcus</i> (4)	4 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Pasteurella</i> (18)	18 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Salmonella</i> (15)	14 (93)	0 (0)	1 (7)
	<i>Escherichia</i> (14)	14 (100)	0 (0)	0 (0)
TET	<i>Staphylococcus</i> (4)	2 (50)	0 (0)	2 (50)
	<i>Pasteurella</i> (18)	16 (89)	0 (0)	2 (11)
	<i>Salmonella</i> (15)	14 (93)	0 (0)	1 (7)
	<i>Escherichia</i> (14)	0 (0)	0 (0)	14 (100)
ENR	<i>Staphylococcus</i> (4)	2 (50)	0 (0)	2 (50)
	<i>Pasteurella</i> (18)	17 (94)	0 (0)	1 (6)
	<i>Salmonella</i> (15)	15 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Escherichia</i> (14)	6 (43)	3 (21)	5 (36)
FOS	<i>Staphylococcus</i> (4)	4 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Pasteurella</i> (18)	18 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Salmonella</i> (15)	15 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Escherichia</i> (14)	14 (100)	0 (0)	0 (0)
DIF	<i>Staphylococcus</i> (4)	2 (50)	0 (0)	2 (50)
	<i>Pasteurella</i> (18)	17 (94)	0 (0)	1 (6)
	<i>Salmonella</i> (15)	13 (87)	0 (0)	2 (13)
	<i>Escherichia</i> (14)	5 (36)	3 (31)	6 (43)

Gén. Bact.: género bacteriano; ATB: antimicrobiano; GEN: gentamicina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; TET: tetraciclina; ENR: enrofloxacin; FOS: fosfomicina; DIF: difloxacin

Tabla 3: Sensibilidad a seis antimicrobianos de los géneros *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Pasteurella*, *Salmonella* y *Escherichia* (n: 119)

ATB	Gén. Bact. (n)	Sensible n (%)	Intermedio n (%)	Resistente n (%)
GEN	<i>Streptococcus</i> (5)	3 (60)	2 (40)	0 (0)
	<i>Staphylococcus</i> (25)	25 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Pasteurella</i> (30)	22 (73)	6 (20)	2 (7)
	<i>Escherichia</i> (29)	25 (86)	0 (0)	4 (14)
	<i>Salmonella</i> (30)	29 (97)	0 (0)	1 (3)
AMC	<i>Streptococcus</i> (5)	5 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Staphylococcus</i> (25)	25 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Pasteurella</i> (30)	30 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Escherichia</i> (29)	29 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Salmonella</i> (30)	29 (97)	0 (0)	1 (3)
TET	<i>Streptococcus</i> (5)	1 (20)	0 (0)	4 (80)
	<i>Staphylococcus</i> (25)	9 (36)	0 (0)	16 (64)
	<i>Pasteurella</i> (30)	26 (87)	0 (0)	4 (13)
	<i>Escherichia</i> (29)	5 (17)	0 (0)	24 (83)
	<i>Salmonella</i> (30)	14 (47)	0 (0)	16 (53)
ENR	<i>Streptococcus</i> (5)	2 (40)	3 (60)	0 (0)
	<i>Staphylococcus</i> (25)	21 (84)	0 (0)	4 (16)
	<i>Pasteurella</i> (30)	26 (87)	0 (0)	4 (13)
	<i>Escherichia</i> (29)	15 (52)	3 (10)	11 (38)
	<i>Salmonella</i> (30)	30 (100)	0 (0)	0 (0)
FOS	<i>Streptococcus</i> (5)	5 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Staphylococcus</i> (25)	25 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Pasteurella</i> (30)	30 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Escherichia</i> (29)	29 (100)	0 (0)	0 (0)
	<i>Salmonella</i> (30)	30 (100)	0 (0)	0 (0)
DIF	<i>Streptococcus</i> (5)	2 (40)	2 (40)	1 (20)
	<i>Staphylococcus</i> (25)	21 (84)	0 (0)	4 (16)
	<i>Pasteurella</i> (30)	29 (97)	0 (0)	1 (3)
	<i>Escherichia</i> (29)	14 (48)	3 (10)	12 (42)

Gén. Bact.: género bacteriano; ATB: antimicrobiano; GEN: gentamicina; AMC: amoxicilina/ácido clavulánico; TET: tetraciclina; ENR: enrofloxacin; FOS: fosfomicina; DIF: difloxacin

presentó sensibilidad intermedia a gentamicina. *Salmonella* serovariedad Infantis fue resistente a gentamicina y amoxicilina-ácido clavulánico, *Salmonella* Livingstone, Corvallis, Agona y Enteritidis fueron sensibles a los seis antimicrobianos utilizados. De las siete cepas de la serovariedad Gallinarum, una fue resistente a tetraciclina y dos a difloxacin.

En la tabla 3 se muestran los resultados de la sensibilidad del total de los aislamientos a los seis antimicrobianos utilizados en el estudio.

## DISCUSIÓN

Un alto porcentaje de los aislamientos bacterianos utilizados en el ensayo fueron sensibles a gentamicina, encontrándose un bajo porcentaje de cepas intermedias y resistentes. Sin embargo, el género *Streptococcus* presentó un alto porcentaje de cepas intermedias a gentamicina, lo cual contrasta con los resultados obtenidos por Zielinski<sup>17</sup> que encontró 100 % de cepas sensibles a este antibiótico. Todos los aislamientos del género *Staphylococcus* fueron sensibles a gentamicina, lo que concuerda con la bibliografía consultada<sup>6</sup>. Se obtuvo un bajo porcentaje de resistencia a gentamicina en aislamientos del género *Pasteurella*,

el mismo resultado que obtuvo Leotta<sup>8</sup>. La misma conclusión es válida para *Escherichia coli*<sup>10</sup>. Respecto a los resultados de *Salmonella enterica enterica*, se obtuvo un bajo nivel de resistencia tanto para las cepas de origen porcino como aviar. Los resultados de los aislamientos de aves concuerdan con la bibliografía consultada<sup>3, 13</sup>, pero en el caso de las cepas porcinas, el resultado coincide con un estudio previo<sup>16</sup> y difiere del obtenido por Kich<sup>7</sup>. Entre las cepas de origen aviar y porcino los resultados de la susceptibilidad a gentamicina fueron similares.

Con respecto a los resultados de la sensibilidad encontrada a la amoxicilina-ácido clavulánico, todas las cepas de los cinco géneros bacterianos utilizados en el ensayo fueron sensibles, este resultado concuerda con la bibliografía consultada<sup>1, 6</sup>, con excepción de una cepa de *Salmonella* Infantis de origen aviar que presentó resistencia a este antimicrobiano. Esta resistencia está descrita en diferentes serovariedades de *Salmonella*<sup>4</sup>.

Tetraciclina presentó una alta resistencia. Este antimicrobiano es frecuente y ampliamente utilizado en medicina veterinaria, lo cual explicaría el alto porcentaje de resistencia de

los aislamientos bacterianos implicados en el estudio. Las cepas de *Escherichia coli* de origen aviar fueron todas resistentes, el mismo resultado obtenido por Sackey<sup>14</sup>. Las cepas de origen porcino también tuvieron una alta resistencia, en concordancia con lo hallado por Moredo<sup>10</sup>. Tanto el género *Streptococcus* como *Staphylococcus* presentaron una alta resistencia, el mismo resultado encontrado por Kérouanton<sup>6</sup>. Todas las cepas de *Salmonella enterica enterica* de origen porcino fueron resistentes, Huang<sup>5</sup> y Kich<sup>7</sup>, también obtuvieron altos porcentajes de resistencia. Por el contrario, las cepas de origen aviar tuvieron una baja resistencia a este antimicrobiano, lo que concuerda con lo hallado por Parimal<sup>13</sup> y contrasta con los resultados obtenidos por Cortez<sup>3</sup>. El género *Pasteurella* fue el único que presentó una baja resistencia a tetraciclina, el mismo resultado obtenido por Leotta<sup>8</sup>.

Las dos quinolonas utilizadas en medicina veterinaria como son la enrofloxacin y difloxacin arrojaron resultados muy similares entre sí. *Escherichia coli* presentó una alta resistencia a las dos quinolonas, tanto los aislamientos de origen aviar como los de origen porcino, un resultado diferente al encontrado por Moredo<sup>10</sup> en cepas de origen porcino y en concordancia con van den Bogaard<sup>15</sup> en cepas de origen aviar. El género *Streptococcus* presentó un porcentaje elevado de cepas intermedias y resistentes a las dos quinolonas, este resultado se contrapone con el obtenido por Morioka<sup>11</sup> que en su estudio no halló resistencia. En cuanto al género *Staphylococcus*, las cepas de origen porcino tuvieron una baja resistencia a las dos quinolonas, lo que concuerda con el estudio realizado por Morioka<sup>11</sup>. Por el contrario, las cepas de origen aviar presentaron una alta resistencia, lo que difiere con el resultado obtenido por este mismo investigador, en el cual todas las cepas fueron susceptibles.

Con respecto al género *Pasteurella*, las cepas de origen porcino fueron todas sensibles a las quinolonas, mientras que las cepas de origen aviar presentaron una baja resistencia, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Leotta<sup>8</sup>. Los aislamientos de origen porcino pertenecientes al género *Salmonella* fueron todos sensibles a las dos quinolonas utilizadas, el mismo resultado obtuvo en su ensayo Huang<sup>5</sup>, las de origen aviar, fueron todas sensibles a la enrofloxacin y presentaron una baja resistencia a la difloxacin, esto concuerda con lo hallado por Huang<sup>4</sup>.

Todas las cepas pertenecientes a los cinco géneros bacterianos ensayados en el trabajo fueron sensibles a la fosfomicina, lo que concuerda con numerosos trabajos publicados sobre este tema<sup>6, 9, 14</sup>.

Consideramos muy importante desarrollar estudios de monitoreo de sensibilidad antimicro-

biana en bacterias de origen animal en nuestro país para conocer la situación y la evolución de la resistencia bacteriana a los diferentes antimicrobianos utilizados en medicina veterinaria.

## AGRADECIMIENTOS

A la empresa Bedson S.A. por su colaboración en el desarrollo de este trabajo.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Antunes P, Réu C, Sousa JC, Peixe L, Pestana N. Incidence of *Salmonella* from poultry products and their susceptibility to antimicrobial agents. *Int. J. Food. Microbiol.* 2003; 82:97-103.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Disk difusión. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; nineteenth informational supplement; 2009; M-100-S 19. Wayne, Pa, USA.
3. Cortez ALL, de Carvalho AC, Ikuno AA, Bürger KP, Vidal-Martins AMC. Resistencia antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. aisladas de abatedouros de aves. *Arq Inst Biol* 2006; 73:157-163.
4. Huang TM, Lin TL, Wu CC. Antimicrobial susceptibility and resistance of chicken *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Pasteurella multocida* isolates. *Avian Dis.* 2008; 53:89-93.
5. Huang TM, Lin TL, Wu CC. Serovar distribution and antimicrobial susceptibility of swine *Salmonella* isolates from clinically ill pigs in diagnostic submissions from Indiana in the United States. *Lett Appl Microbiol.* 2009; 48:331-6.
6. Kérouanton A, Hennekinne JA, Letertre C. *et al.* Characterization of *Staphylococcus aureus* strains associated with food poisoning outbreaks in France. *Int J Food Microbiol.* 2006; 115:369-375.
7. Kich JD, Coldebella A, Fratamico P, Call J, Luchansky J, Cray P. Prevalence and antibiotics resistance of *Salmonella* isolates recovered from finishing pig herds and slaughter facilities in Southern Brazil. *Int Assoc Food Protect.* 2006; P-2-10 p. 117.
8. Leotta GA, Vigo GB, Chinen I, Prieto M, Callejo R, Rivas M. Identificación, biotipificación y caracterización de cepas de *Pasteurella multocida* aisladas en la Argentina. *Rev Arg Microbiol.* 2006; 38:125-9.
9. Lion C, Mory F, Conroy MC, Weber M, Burdin JC. Antibiotic sensitivity of *Pasteurella multocida* and related bacteria (bacterial groups M5 and EF4). Studies of minimal inhibitory concentrations by agar dilution. *Pathol Biol.* 1986; 34:1061-6.
10. Moredo FA, Vigo GB, Cappuccio JA, Piñeyro P, Perfumo CJ, Giacoboni GI. Resistencia a los antimicrobianos de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos de la República Argentina. *Rev Arg Microbiol.* 2007; 39:227- 9.
11. Morioka A, Asai T, Ishihara K, Kojima A, Tamura Y, Takahashi T. *In vitro* activity of 24 antimicrobial agents against *Staphylococcus* and *Streptococcus* isolated from diseased animals in Japan. *J Vet Med Sci.* 2005; 67:207-10.

#### G. Vigo y col.

12. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 2008; M31-A3. Wayne, Pa, USA.
13. Parimal R, Dhillon AS, Lauerman LH, Schaberg DM, Bandli D, Jonson S. Results of *Salmonella* isolation from poultry products, poultry, poultry environment, and other characteristics. Avian Dis. 2001; 46:17-24.
14. Sackey BA, Mensah P, Collison E, Sakyi-Dawson E. *Campylobacter*, *Salmonella*, *Shigella* and *Escherichia coli* in live and dressed poultry from metropolitan Accra. Int J Food Microbiol. 2001; 71:21-8.
15. van den Boogard AE, London N, Driessen C, Stobberingh EE. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. J Antimicrob Chemother. 2001; 47:763-71.
16. Vigo GB, Cappuccio JA, Piñeyro PE, et al. *Salmonella enterica* subclinical infection: bacteriological, serological, pulsed-field gel electrophoresis, and antimicrobial resistance profiles. Longitudinal study in a three-site farrow-to-finish farm. Foodborne Pathog Dis. 2009; 6:965-72.
17. Zielinski GC. Enfermedades re-emergentes: infecciones por *Streptococcus suis* y *Haemophilus parasuis*. V Congreso de Producción del Mercosur, 2006, p. 91-100, Río Cuarto, Argentina.



## EVALUACIÓN DE SISTEMAS DE ALOJAMIENTO PARA RATONES INMUNODEFICIENTES BAJO EXPERIENCIA

Principi G, Maschi F, Laborde JM, Carriquiriborde M, Cagliada P, Carbone C

Cátedra de Animales de Laboratorio.  
Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de La Plata

**Resumen:** Las investigaciones que utilizan ratones inmunodeficientes requieren el uso de una infraestructura adecuada y estandarizada, que debe garantizar el mantenimiento correcto de estas cepas y asegurar la obtención de resultados confiables. El desarrollo y uso de equipamientos con tecnología destinada a controlar el macro y microambiente permite mantener pequeños grupos de animales en instalaciones en las que no se cuenta con barreras sanitarias absolutas. Uno es el aislador flexible (AF); y otro las estanterías con cajas individualmente ventiladas (CIV), ambos equipos independizan el microambiente del macroambiente. El objetivo de este trabajo fue evaluar las ventajas y desventajas de cada uno de estos sistemas de alojamiento para ratones inmunodeficientes. Durante un año se mantuvieron dos grupos de ratones de la cepa CBA/N-xid libres de patógenos específicos en un AF y en una ECIV respectivamente. Se realizaron controles microbiológicos del ambiente y de los animales. Se evaluó comparativamente el costo del equipamiento, montaje, mantenimiento, procedimientos de manejo, cuidados, capacidad, controles, durabilidad y espacio requerido. Los resultados demostraron que si bien existen diferencias entre los sistemas y en ambos se puede mantener adecuadamente roedores inmunodeficientes, las ECIV son más ventajosas a pesar de su costo elevado.

**Palabras Clave:** Aislador flexible, cajas individuales ventiladas (CIV)

## HOUSING SYSTEMS EVALUATION FOR IMMUNODEFICIENT MICE UNDER EXPERIENCE

**Abstract:** Immunodeficient mice strains maintenance requires special and standardized equipments in order to assure their quality and to obtain reliable experimental results. The development of new technologies and equipments used to control the animal macro and microenvironment in facilities with no barrier systems allow to house small number of rodents along the experiment. Flexible isolators (FI) and individual ventilated cages (IVC) represents two equipments that are able to control environmental factors. The aim of this study was to evaluate FI and IVC efficiency when they are used to keep immunodeficient mice. Two SPF CBA/N-xid mice groups were housed one year in a FI and in an IVC respectively. Environmental and animals microbiological monitoring was performed. The cost, construction, durability, space requirements, maintenance processes, monitoring and technical procedures were evaluated and compared. The results show that although differences among these equipments, both are suitable for the maintenance of immunodeficient mice. However, the results also show that the IVC, though expensive, have advantages over flexible isolators.

**Key Words:** Flexible film isolators, Individual ventilated cage (IVC)

Fecha de recepción: 10/03/11

Fecha de aprobación: 20/05/11

**Dirección para correspondencia:** G. Principi, Cátedra de Animales de Laboratorio. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina. Tel: +54-221-4211276  
**E-mail:** gmprincipi@fcv.unlp.edu.ar

## INTRODUCCIÓN

En los trabajos de investigación en los que se utilizan como modelo animal ratones inmunodeficientes, se menciona la necesidad de contar con una infraestructura adecuada, estandarizada y bajo ciertas normas que permita garantizar el mantenimiento correcto de estas cepas, libres de sus patógenos específicos (specific pathogen free SPF), con el fin de obtener resultados confiables y reproducibles (3, 4).

En la última década el desarrollo y uso de equipamientos con tecnología destinada a controlar el macro y microambiente, ha permitido mantener pequeños grupos de animales en instalaciones en las que no se cuenta con barreras sanitarias absolutas (1, 2, 3, 4). Uno de estos equipamientos lo constituye el aislador flexible (AF); formado por un receptáculo de PVC cerrado, a modo de burbuja, en el cual pueden mantenerse las cajas de los animales, aislados del ambiente exterior a través de la filtración absoluta del aire (5). Otra opción, son las estanterías ventiladas también llamados rack ventilados integrado por cajas con ventilación individual (ECIV), que a través de la filtración del aire del macroambiente, independiza a cada una de ellas creando un microambiente estéril. Ambos equipos no sólo sirven para alojar animales de experimentación inmunodeficientes sino también para mantener animales genéticamente modificados, libres de gérmenes o inoculados con microorganismos patógenos (11, 12, 13). En todos los casos el aislamiento, las condiciones de esterilidad, el control del ambiente y la capacitación del personal son requisitos fundamentales para el desarrollo de investigaciones en las que se emplean alguno de estos equipos (6, 8). En nuestro país no se cuenta con estudios en los que se comparen ambos sistemas.

El objetivo de este trabajo fue evaluar comparativamente las ventajas y desventajas de cada uno de estos equipamientos para el alojamiento de cepas de ratones inmunodeficientes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Animales:** Se utilizaron ratones de la cepa CBA/N-*xid*, SPF, provenientes del CEMIB, Universidad Estatal de Campinas, Brasil. Estos animales se caracterizan por poseer un sistema inmunológico en el cual las células B muestran defectos en su maduración y se encuentran en baja proporción en la sangre periférica. Esta condición hace que sirvan como modelo para realizar estudios sobre inmunología e inflamación (1). Para su mantenimiento es necesario proporcionarles alimento y agua de bebida estéril, temperatura ambiente en un rango entre 23 +/- 1 °C, humedad relativa entre el 40 y el 60 %, una ventilación entre 10 y 15 recambios de aire por hora y un fotoperiodo uniforme luz/oscuridad de

14/ 10 horas (6, 7, 8).

Se emplearon dos grupos de ratones reproductores, de 12 animales cada uno, 6 machos y 6 hembras de 8 semanas de edad que se mantuvieron en el aislador y en el rack ventilado respectivamente.

Todos se aparearon en forma monogámica utilizando un sistema de manejo para endocria. A lo largo del año en cada uno de los equipos se alojaron entre 8 y 10 cajas.

**Aislador Flexible (AF):** tiene un volumen interior de 0,54 m<sup>3</sup>, en el cual se pueden alojar entre 8 y 10 cajas de ratones de 13 x 13 x 30 cm, cuenta con cinco componentes principales: a) un cuerpo de PVC flexible transparente de 0,4 µm de espesor, dentro del cual se alojan los animales; b) un túnel de acceso de PVC rígido con dos tapas de cierre que se utilizan para ingresar los insumos, los animales y descontaminar los materiales. c) Un par de guantes de goma de mangas largas a través de los cuales se manejan los animales desde el exterior; d) dos motores eléctricos de 1/10 HP, 220 V que proveen ventilación y presurización positiva a la unidad, cuyo consumo es de 1061 watts por hora; conectados a los filtros y e) dos portafiltros cilíndricos de acero inoxidable con filtros absolutos (HEPA) a través de los cuales ingresa y egresa el aire (2).

Esta unidad se monta sobre una base metálica de 2 m de largo por 1,5 metros de ancho a 80 cm del piso. Como anexos se necesitan: un compresor con mangueras, una pistola para pulverización con desinfectantes, una manga de transferencia de insumos y un cilindro de acero inoxidable destinado a la esterilización de insumos en autoclave.

**Estantería ventilada (ECIV):** este equipo está compuesto por un armazón de 2,10 m de largo x 2,00 m de alto x 0,65 m de ancho, tiene una capacidad para alojar 72 cajas de 30 x 16 x 14 cm c/u ó 36 cajas de 30 x 30 x 14 cm c/u. Cada caja se comporta como un microaislador, tiene una tapa con filtro y se conecta a través de un conducto al sistema de ventilación con filtración absoluta, equipado con filtros absolutos HEPA (filtración del 99,9 % de partículas), tanto en la entrada como en la salida del aire (9, 10, 11). La presión puede modificarse permitiendo trabajar en condiciones de bioseguridad (12, 13). La estantería cuenta con un panel de control que permite registrar la temperatura, la humedad, los recambios de aire, y el estado de los filtros. El motor tiene un consumo menor de 25 watts por hora. Este equipo permite alojar diferentes tamaños de cajas y utilizarlo parcialmente en cuanto a su capacidad sin alterar la filtración en cada una de ellas.

## G. Principi y col.

**Estudio comparativo:** Para realizar el presente estudio se evaluaron en ambos equipos los parámetros que se consideraron más relevantes: montaje y puesta en marcha; desinfección y limpieza; procedimientos de manejo; controles microbiológicos; capacidad y espacio requerido, y consumo energético y durabilidad.

En la tabla 1 se comparan los procedimientos comunes en ambos sistemas: el montaje y puesta en marcha, la necesidad de accesorios, la desinfección y limpieza, los controles microbiológicos y los procedimientos de manejo, consumo energético, durabilidad y superficie que ocupa.

PARAMETROS	PROCEDIMIENTO EN AISLADOR FLEXIBLE (AF)	PROCEDIMIENTO EN ESTANTERIA VENTILADA (Rack -ECIV)
Montaje y puesta en marcha, pasos:	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Armado de base metálica a una altura de 80 cm.</li> <li>2) Colocación de motores de insuflación sincronizados para que funcionen alternadamente.</li> <li>3) Armado de 2 filtros de acero inoxidable con malla filtrante.</li> <li>3) Esterilización de los filtros.</li> <li>4) Conexión de tuberías de PVC entre motores, filtro de ingreso, cuerpo de aislador, filtro de salida y exterior.</li> <li>5) Sellado de las conexiones.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1) Instalación de filtros</li> <li>2) Conexión al panel de control.</li> </ol>
Accesorios necesarios para el funcionamiento	<p><b>Desinfectantes:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Acido peracético: Se lo utiliza por su fuerte acción biocida, se prepara al 2% en agua destilada, se usa y se descarta el sobrante de cada uso como residuo líquido peligroso. Hay que tener precaución en el manejo y emplear máscara para su fumigación. Se utiliza tanto para desinfectar el equipo antes de la puesta en marcha como para esterilizar el túnel de acceso para ingreso de materiales al aislador.</li> <li>-Alcohol 70 %: se coloca un rociador dentro del aislador para hacer la limpieza interna de paredes, también se utiliza para la limpieza externa.</li> </ul> <p><b>Otros accesorios:</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Máscara filtrante para fumigación.</li> <li>-Cilindro porta insumos estériles: para esterilizar insumos de 90 litros de capacidad.</li> <li>-Film de polietileno autoclavable para sellar el cilindro porta insumos.</li> <li>-Manga de transferencia: para conectar el cilindro al túnel de acceso al aislador.</li> <li>-Compresor y pistola de fumigación para pulverizar acido peracético.</li> <li>-Cinta adhesiva de 5 cm de ancho para sellado hermético de túnel y manga de transferencia</li> </ul>	<p>Desinfectantes:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Niesser (amonio cuaternario) al 4% en agua destilada: para desinfección de pinzas, mesadas y superficie externa de la estantería</li> <li>-Alcohol 70 %: para desinfección de mesadas, paredes y superficie externa de la estantería.</li> </ul> <p>Otros accesorios:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>-Bolsas autoclavables para cajas, alimento y agua de bebida.</li> <li>-Flujo laminar para cambio de cajas.</li> <li>-Guantes descartables para trabajar bajo flujo laminar.</li> <li>-Pinza de manejo de animales para cambio de cajas.</li> </ul>
Pasos para la desinfección y limpieza	<ol style="list-style-type: none"> <li>1- Preparación de acido peracético y pistola de fumigación.</li> <li>2- Fumigar todo el interior del aislador vacío con ácido peracético</li> <li>3- Sellar túnel.</li> <li>4 -Dejar actuar durante 24 horas.</li> <li>5- Ruptura del sellado del ingreso y egreso de aire, encender motores y ventilar durante 24 horas.</li> <li>6- Control microbiológico.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1- Limpieza exterior con alcohol 70% o amonio cuaternario 4%.</li> <li>2- Dejar actuar 1 hora.</li> <li>3-Encender equipo.</li> <li>4- Control microbiológico</li> </ol>
Control microbiológico	<ol style="list-style-type: none"> <li>1-Abrir el túnel de acceso.</li> <li>2-Colocar las placas de monitoreo.</li> <li>3-Cerrar el túnel.</li> <li>4-Fumigar con ácido peracético.</li> <li>5-Dejar actuar 30 minutos.</li> <li>6-Ingresa placa al aislador.</li> <li>7-Abrir las placas y dejar actuar 30 minutos.</li> <li>8-Retirar placas hacia el túnel.</li> <li>9 Abrir puerta externa del túnel.</li> <li>10-Sacar las placas y enviar al laboratorio.</li> <li>11-Cerrar el túnel de acceso.</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1-Encender el flujo laminar.</li> <li>2-Tomar una caja del rack.</li> <li>3- Colocar las placas.</li> <li>4-Volver la caja al rack dejar actuar media hora.</li> <li>6-Volver la caja al flujo laminar.</li> <li>7-Retirar placa y enviar al laboratorio.</li> <li>8-Volver la caja al rack.</li> </ol>



<p>Procedimientos de manejo</p>	<p><b>Ingreso de animales libres de patógenos específicos</b> Estos llegan en microaisladores o cajas de transporte.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Cada caja de transporte se fumiga externamente con alcohol bajo un flujo laminar.</li> <li>2. Se prepara dentro de una doble bolsa una caja de ratón estéril para recibir los animales.</li> <li>3. Bajo el flujo laminar se abren la caja de transporte con los animales y la doble bolsa con la caja estéril.</li> <li>4. Se pasan con pinzas los animales de la caja de transporte a la caja estéril.</li> <li>5. Se cierra la doble bolsa con la caja con los animales.</li> <li>6. Se abre el túnel de acceso y se coloca la doble bolsa con la caja con los animales.</li> <li>7. Se cierra el túnel de acceso.</li> <li>8. Se fumiga con ácido peracético.</li> <li>9. Se deja actuar 20 minutos.</li> <li>10. Se abre la puerta interna del túnel de acceso para introducir la doble bolsa al aislador.</li> <li>11. Se cierra la puerta interna del túnel.</li> <li>12. Dentro del aislador se abre la doble bolsa y se ubica la caja dentro del mismo.</li> </ol> <p>• <b>Preparación y esterilización de insumos:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1- El alimento y la viruta se colocan en bolsas de tela de 20 x 35 cm.</li> <li>2- Se introducen en el cilindro porta insumos.</li> <li>3- Este se sella con film de polietileno autoclavable y cinta de papel a modo de tapa.</li> <li>4- Se autoclava el cilindro.</li> <li>5- Se abre de la puerta externa del túnel de acceso al aislador.</li> <li>6- Se ingresa el agua en botellas estériles en el túnel.</li> <li>7- Se conecta la manga de transferencia al túnel del aislador.</li> <li>8- Se conecta el cilindro porta insumos a la manga de transferencia y se sella con cinta.</li> <li>9- Se prepara ácido peracético y se fumiga con la pistola.</li> <li>10- Se deja actuar un mínimo de 2 horas.</li> <li>11- Se rompe el film de polietileno del cilindro para descargar los insumos dentro del túnel del aislador.</li> <li>12- Se ingresa el agua, la viruta y el alimento al aislador.</li> <li>13- Se desacopla la manga de transferencia del túnel del aislador.</li> <li>14- Se cierra el túnel de ingreso.</li> </ol> <p>• <b>Cambio de cajas:</b> (Se realiza dentro del aislador a través de las mangas con guantes).</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1- Los animales se sacan de la caja.</li> <li>2- Se saca la viruta sucia y se coloca en una bolsa.</li> <li>3- Luego se rellena cada caja con viruta limpia.</li> <li>4- Se suministra agua y alimento.</li> <li>5- Se colocan nuevamente los animales en la caja.</li> <li>6- Colocar bolsas con viruta sucia, botellas vacías y bolsas de alimento vacías en el túnel del aislador.</li> <li>7- Se abre la puerta externa del túnel.</li> <li>8- Se retiran las bolsas con viruta sucia, botellas y bolsas de alimento vacías.</li> <li>9- Se cierra el túnel del aislador.</li> </ol>	<p><b>Ingreso de animales libres de patógenos específicos:</b> Estos llegan en microaisladores o cajas de transporte.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Se llevan a un flujo laminar donde se trabaja con guantes.</li> <li>2. Se pulveriza con alcohol por fuera la caja de transporte con los animales.</li> <li>3. Se toma una caja estéril.</li> <li>4. Se abre la caja de transporte con los animales.</li> <li>5. Los animales se transfieren de la caja de transporte a una definitiva con pinzas.</li> <li>6. Se coloca la caja en la estantería ventilada.</li> </ol> <p>• <b>Preparación y esterilización de insumos:</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 La viruta se coloca en cajas limpias de recambio, el alimento en bolsa de tela y el agua en botellones.</li> <li>2 Cada insumo se autoclava en el ciclo de esterilización correspondiente.</li> <li>3 Luego, se los coloca en doble bolsa autoclavable.</li> <li>4 Se sella cada bolsa con atadura de hilo.</li> <li>5 Se esteriliza.</li> <li>6 Se almacena en la sala de la estantería ventilada.</li> </ol> <p>• <b>Cambio de cajas:</b> (Se realiza bajo un flujo laminar clase I. con guantes )</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1 Encendido y desinfección de flujo laminar.</li> <li>2 Cada caja del rack se lleva al flujo laminar.</li> <li>3 Se abre la bolsa con cajas limpias.</li> <li>4 Los animales se cambian de caja.</li> <li>5 Se llena con agua y alimento la tolva.</li> <li>6 Llevar la caja nuevamente al rack.</li> <li>7 Al finalizar se envían las cajas sucias para lavado, relleno y autoclavado.</li> </ol>
---------------------------------	---	---

**G. Principi y col.**

Controles Microbiológicos periódicos	<p>Ambiente:</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1- Apertura de la puerta externa del túnel de acceso</li> <li>2- Se colocan en bolsas, las placas e hisopos estériles en el túnel de ingreso.</li> <li>3- Se tapa y sella el túnel.</li> <li>4- Se fumiga con ácido peracético y se deja actuar 30 min.</li> <li>5- Luego se ingresan las placas al aislador.</li> <li>6- Se abren las placas durante 30 minutos.</li> <li>7- Luego se retiran las placas a través del túnel.</li> <li>8- Se cierra la puerta externa del túnel de acceso.</li> </ol> <p>Animales: cada 3 meses se envían al laboratorio una muestra representativa del aislador.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1- Se toma una caja con los animales seleccionados y se la envuelve en una bolsa PVC.</li> <li>2- Se abre la puerta interna del túnel de acceso, se introduce la caja envuelta y se cierra.</li> <li>3- Se abre la puerta externa y se retira la caja.</li> <li>4- Se cierra la puerta externa.</li> <li>5- Se envían animales al laboratorio para su control.</li> </ol> <p><b>Sistema de Centinelas:</b> se coloca una caja dentro del aislador con animales centinelas (inmunodeficientes). Luego de 2 meses estos ratones se enviarán al laboratorio para control, en reemplazo de la población del aislador.</p>	<p>Ambiente:</p> <p>En este caso, como cada caja es una unidad individual, lo que se controla es la eficiencia de filtración de aire con una caja vacía, de la misma manera que en el armado del equipo.</p> <p>Animales: cada 3 meses se envían al laboratorio una muestra representativa de la estantería ventilada.</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1- Se llevan las cajas de animales seleccionadas al flujo laminar.</li> <li>2- Se pasan a una caja limpia estéril con tapa filtro.</li> <li>3- Se envían al laboratorio para su control.</li> </ol> <p><b>Sistema de Centinelas:</b> se coloca una caja en el rack con animales centinelas (animales inmunodeficientes).</p> <p>Estos ratones se enviarán para control al laboratorio en reemplazo de la población del rack.</p>
Consumo de energía	Entre 1061 y 2000 watts	Menos de 25 watts
Limpieza	Debe realizarse periódicamente limpieza externa e interna de la unidad flexible de PVC con alcohol 70%.	Requiere solo limpieza exterior con alcohol o amonio cuaternario.
Área que ocupa	2,00 m de largo x 1,5 m de ancho por 1,3 m de altura 3,9 m <sup>3</sup>	2,10 m de largo x 2,00 m de alto x 0,65 m de ancho 2,73 m <sup>3</sup>
Duración	< de 2 años	Larga vida útil

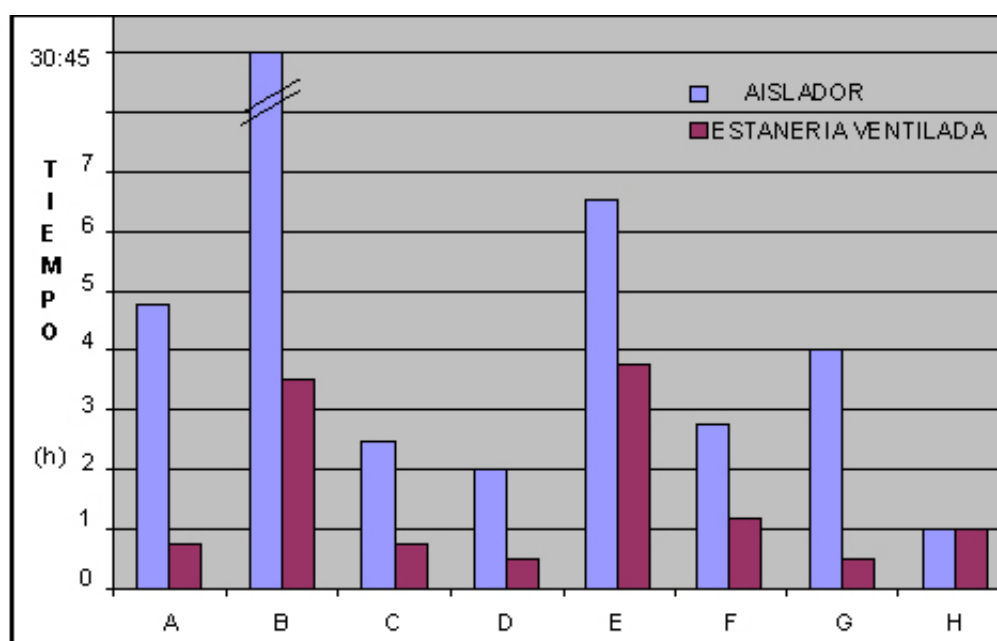


Fig. 1. Ref: A: Montaje y puesta en marcha, B: Desinfección y limpieza, C: Control microbiológico, D: Procedimientos de manejo, E: Preparación y esterilización de insumos, F: Cambio de cajas, G: Controles periódicos, H: Limpieza.

	<b>AISLADOR FLEXIBLE (AF)</b>	<b>Tiempo</b>	<b>ESTANTERIA VENTILADA (RACK - ECIV)</b>	<b>Tiempo</b>
Montaje y puesta en marcha, pasos:	Armado de base. Colocación de motores. Armado de 2 filtros de acero inoxidable con malla filtrante. Esterilización de los filtros ciclo de autoclavado 1:30 hs. Conexión de tuberías de PVC. Sellado con cintas.	1 hora 1 hora 30 min  1:30 hs 30 min  15 min	1) Ensamble de filtros 2) Conexión al panel de control.	30 min 15 min
	TOTAL:	4 horas 45 minutos	TOTAL:	45 minutos
Desinfección y limpieza, pasos:	Preparación de ácido peracético y pistola de fumigación. Fumigación de todo el interior del aislador. Sellado del túnel de acceso. Dejar actuar durante 6 horas. Ruptura de tapones, arrancar motores y ventilar durante 24 horas.	15 min  15 min  15 min 6 horas 24 horas	Limpieza exterior con alcohol o amonio cuaternario. Dejar actuar. Encender.	30 min  3 horas
	TOTAL	30 horas 45 min		3 horas 30 min
Control microbiológico de ambiente pasos:	Abrir el túnel de acceso. Colocar las placas de cultivo Cerrar el túnel. Fumigar y dejar actuar 1 hora. Ingresar las placas al cuerpo del aislador. Abrirlas durante 30 minutos. Retirar las placas hacia el túnel. Abrir puerta externa del túnel Sacar las placas y enviarlas al laboratorio. Cerrar el túnel de acceso y fumigar.	15 min  15 min 1 hora  (6 y 7) 30 min  (8 y 9) 15 min  (10 y 11) 15 min	Encender flujo laminar. Tomar una caja vacía del rack. Colocar dentro las placas de cultivo abiertas. Ubicar la caja en el rack. Dejar actuar media hora. Cerrar las placas de cultivo. Enviarlas al laboratorio.	(1,2y3) 15 min 30 min
	TOTAL	2 horas 30 min	TOTAL	45 min
Procedimientos de manejo:	<b>Ingreso de animales libres de patógenos específicos</b> 1 Llevar las cajas de transporte con animales al flujo laminar. 2 Fumigar con alcohol 70% 3 Tomar una caja estéril envuelta en doble bolsa. 4 Abrir la caja con los animales y la doble bolsa de la caja estéril. 5 Pasar los animales de una a otra caja. 6 Cerrar la doble bolsa con la caja con los animales. 7 Abrir el túnel de acceso. 8 Colocar la caja con los animales con la doble bolsa. 9 Cerrar el túnel. 10 Preparar ácido peracético, fumigar y dejar actuar 20 minutos. 11 Abrir la puerta interna del túnel del aislador e introducir la caja con los animales en la doble bolsa 12 Cerrar la puerta interna del túnel. 13 Abrir la doble bolsa y colocar la caja con los animales en el aislador.	(1,2y3) 15 min  15 min  (5 y 6) 15 min  15 min 15 min  30 min  (11 a 13) 15 min	<b>Ingreso de animales libres de patógenos específicos:</b> 1. Llevar la caja de transporte con los animales al flujo laminar. 2. Fumigar con alcohol por fuera la caja de transporte con los animales. 3. Tomar una caja estéril de la estantería ventilada. 4. Abrir la caja con los animales. 5. Pasar los animales a la caja del rack. 6. Colocarlos en el rack ventilado.	(1,2 y3) 15 min          (4,5 y 6) 15 min

G. Principi y col.

	<p><b>Preparación y esterilización de insumos:</b></p> <p>1 Preparar el alimento y la viruta en bolsas.                  2 Colocarlas en el cilindro.                  3 Sellar el mismo con polipropileno autoclavable y cinta de papel a modo de tapa.                  4 Autoclavarlo a 121°C en ciclo de 1 hora y 30 min.                  5 Abrir la puerta externa del túnel de acceso.                  6 Colocar las botellas con agua previamente esterilizadas en el túnel de acceso del aislador.                  7 Conectar la manga de transferencia al túnel.                  8 Conectar el cilindro porta insumos a la manga de transferencia.                  9 Sellar con cinta.                  10 Preparar ácido peracético y pulverizar con pistola y dejar actuar 2 horas.                  11 Desde la manga de transferencia romper la tapa de polipropileno del cilindro y descargar los insumos en el túnel de acceso.                  12 Ingresar los insumos al aislador para almacenarlos dentro del mismo.                  13 Desacoplar la manga de transferencia del túnel del aislador.                  14 Cerrar el túnel de ingreso.</p>	<p>15 min (2 y 3) 30 min 1h 30 min 15 min (7, 8 y 9) 1 hora 15 min 2 horas (11y 12) 15 min 15 min 15 min</p>	<p><b>Preparación y esterilización de insumos:</b></p> <p>1 Colocar la viruta en cajas limpias de recambio, el alimento en bolsas de tela y el agua en botellones.                  2 Se autoclavan cada insumo en su correspondiente ciclo de esterilización: la viruta (1:30 horas), el alimento (1 hora) y el agua (45 minutos).                  3 A todos los insumos se los coloca en doble bolsa autoclavable.                  4 Se sellan con atadura de hilo.                  5 Se almacenan en la sala de la estantería ventilada.</p>	<p><b>30 min</b> 30 min (2,3,4,5) 3 horas 15</p>
	<b>TOTAL</b>	<b>6 horas 30 min</b>	<b>TOTAL</b>	<b>3 horas 45 min</b>
	<p><b>Cambio de cajas:</b></p> <p>1 Tomar de a una las cajas a cambiar y pasar los animales a un recipiente vacío.                  2 Raspar la viruta sucia de la caja y eliminarla en una bolsa.                  3 Rellenar una por una las cajas con viruta limpia.                  4 Rellenar las mamaderas con agua estéril del botellón y reponer comida.                  5 Colocar nuevamente los animales en la caja.                  6 Colocar las bolsas con viruta sucia, botellón vacío y bolsas de alimento vacías en el túnel del aislador.                  7 Abrir la puerta externa del túnel.                  8 Retirar los elementos sucios.                  9 Cerrar el túnel del aislador.</p>	<p>(1, 2, 3, 4 y 5) 15 min x caja x 8 cajas= 2 horas 15 min 15 min 15 min</p>	<p><b>Cambio de cajas:</b></p> <p>1 Encender y desinfectar el flujo laminar.                  2 Llevar al flujo los insumos limpios necesarios (cajas limpias preparadas en bolsas, maderas estériles, alimento estéril y encender luz UV 10 minutos y apagar).                  3 Tomar la caja del rack con animales y llevarla al flujo.                  4 Abrir la bolsa con las cajas limpias.                  5 Cambiar los animales de caja.                  6 Colocarles agua y comida.                  7 Llevar esta caja nuevamente al rack.                  8 Al finalizar se envían todos los insumos sucios para su lavado y esterilización.</p>	<p>(1, 2) 15 min (3,4,5) 5 minutos por caja x8 cajas: 40 min (7,8) 15 min</p>
	<b>TOTAL</b>	<b>2 horas 45 min</b>	<b>TOTAL</b>	<b>1 hora 10 min</b>
Controles microbiológicos PERIODICOS	<p><b>De ambiente cada 3 meses:</b></p> <p>1 Abrir el túnel de acceso.                  2 Colocar las placas y los hisopos estériles.                  3 Tapar y sellar el túnel.                  4 Preparar y fumigar con ácido peracético dejando actuar 2 h.                  5 Ingresar las placas de cultivo al aislador.                  6 Abrirlas y dejarlas durante 30 min.                  7 Cerrar las placas y retirarlas hacia el túnel.                  8 Sacar las placas del aislador.                  9 Cerrar el túnel de acceso.</p>	<p>(1 y 2) 15 min 15 min 2 horas 15 min 30 min 15 min</p>	<p><b>De ambiente:</b></p> <p>En este caso como cada caja es una unidad individual, lo que se controla es la eficiencia de filtración de aire con una caja vacía de la misma manera que en el armado del equipo.                  El panel de control registra los parámetros y funcionamiento de estos filtros por lo que no sería necesario realizarlo de rutina.</p>	
	<b>TOTAL</b>	<b>3 horas 30 min</b>		
Limpieza	Debe realizarse periódicamente limpieza externa e interna de la unidad flexible de PVC con alcohol 70 %.	1 hora	Requiere solo limpieza exterior con alcohol 70 % o amonio cuaternario.	1 hora

En las figuras siguientes se observan fotográficamente los equipos empleados: Fig. 2 túnel de acceso, en la Fig.3 el aislador flexible, en la Fig.4 el cilindro porta insumos y en la Fig.5 el ECIV - rack ventilado.

## RESULTADOS

El costo del equipo es mucho mayor en el caso de las estanterías ventiladas (ECIV), son más modernas que los aisladores flexibles (AF) y tienen la ventaja de poder alojar un mayor número de animales, requiriendo un espacio menor y consumiendo menos energía.

El montaje y el tiempo empleado para la puesta en marcha del AF fue de 6:30 horas mientras que para la ECIV fue de 3:30 horas. Los procedimientos de trabajo que se deben cumplir, la cantidad de insumos y la necesidad de contar con equipos anexos para trabajar en los AF son más numerosos y complejos comparados con los del ECIV.

Los procesos de desinfección y controles microbiológicos que se realizaron en los AF fueron de mayor complejidad que en el caso de las ECIV.

El personal técnico que trabajó con AF necesitó mayor capacitación que el que manejó las ECIV.

Los resultados obtenidos en esta evaluación demuestran que ambos sistemas son eficientes y adecuados para el mantenimiento de cepas de ratones inmunodeficientes durante largos periodos de tiempo, sin embargo, se determinó que el sistema de ECIV es más sencillo y demanda menos tiempo para su instalación y armado por lo cual se concluye que estos son más ventajosos a pesar de que su costo es más elevado.

Los resultados y la información obtenida en esta evaluación contribuirán indudablemente con la toma de decisiones cuando se deben mantener cepas de ratones inmunodeficientes en bioterios de producción o de experimentación.

## BIBLIOGRAFÍA

1. El ratón CBA/N xid como modelo animal de inmunodeficiencia Producción y manejo Fabricio Maschi, Pilar Cagliada, Cecilia Carbone. Catedra de animales de Laboratorio y Bioterio. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata Calles 60 y 118 s/n (1900) La Plata Revista Química Viva. Número 1, año 9, abril de 2010. ISSN 1666-7948.
2. F Maschi, G Principi, S Milocco, JM Laborde, M Carriquiriborde, M Ayala, P Cagliada, Carbone C. Evaluación de un sistema de aisladores flexibles para el mantenimiento de ratones inmunodeficientes. *Analecta Vet* 2007. 27 (1): 30- 35.
3. CCAC [Canadian Council on Animal Care]. Guide to the Care and Use of Experimental Animals. 2nd ed. Ottawa Canada: CCAC. 1993.



Fig. 2. Túnel de acceso.



Fig.4 Cilindro porta insumos.



Fig. 3. Aislador flexible.



Fig. 5. ECIV - rack ventilado.

## **G. Principi y col.**

4. Clark Derrel J. National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. 1996; p. 22-48.
5. Clough G. UFAW Handbook. The animal House: design, equipment and environmental control. UFAW. 1991; p. 108 - 143.
6. Coates ME, Gustafsson BE. Germ Free Animals in Biomedical Research. 1984; p. 11-48.
7. Ferrer Bazaga S, Martinez Escandell A. SECAL-Animales de Laboratorio: Prevención de riesgos en la exposición a agentes biológicos. 2003; p. 19-23.
8. Michael F. Festing W. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals. Churchill Livingstone. 1976; p. 57-73.
9. Lawson T. LAT Manual de entrenamiento. American Association for Laboratory Animals Science. 2000.
10. Eaton P. UFAW Handbook. Higiene in the animal House. UFAW. 1991; p. 144-157.
11. Bennett M, Parks SR, Dennis MJ. Containment testing of negative pressure isolators used to house laboratory animals infected with BL3 agents. FELASA: Internationalisation and harmonization of laboratory animal care and use issues. 2004; p. 137-144.
12. Lipman NS, Corning BF, Saifuddin M. Evaluation of isolator caging systems for protection of mice against challenge with mouse hepatitis virus. Laboratory Animals. 1993; p. 134-140.
13. Perkins Scott E, Lipman NS. Characterization and Quantification of Microenvironmental Contaminants in Isolator Cages with a Variety of Contact Beddings. Contemporary Topics. 1995. 34 (5): 93-97.

## ULTRAESTRUCTURA DEL ESPERMATOZOIDE DEL MACHO CABRÍO ENANO AFRICANO (*Capra hircus*)

Faisal F<sup>1</sup>, Laplace R<sup>2</sup>, Soto AT<sup>3</sup>, Migliorisi L<sup>3</sup>, Gómez V<sup>3</sup>, Jurado S<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio Central de Microscopía Electrónica.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

<sup>2</sup>Jardín Zoológico y Botánico de La Plata, Municipalidad de La Plata.

<sup>3</sup>Catedra de Reproducción Animal.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata

**Resumen:** Se realizó el estudio y descripción de la ultraestructura de los espermatozoides normales de los machos cabríos adultos enanos de Camerún (*Capra Hircus*) por medio de microscopía electrónica de transmisión. La cabeza tuvo forma oval o de raqueta plana, con una base cuadrada, que proporcionó un espacio cóncavo para la cola. El acrosoma cubrió estrechamente los dos primeros tercios de la cabeza. El clásico patrón de 9 + 9 + 2 pares de microtúbulos que componen el axonema fue observado a lo largo de tres los segmentos de la cola. El límite entre la pieza intermedia y la pieza principal estuvo bien definido por la presencia del anillo de Jensen o annulus. Los resultados de los estudios ultraestructurales de los espermatozoides de los machos cabríos adultos enanos de Camerún fueron similares a lo informado para los espermatozoides de otros rumiantes.

**Palabras clave:** espermatozoides, ultraestructura, *Capra hircus*.

## SPERMATOOA ULTRASTRUCTURE OF THE DWARF AFRICAN BUCK (*Capra hircus*)

**Abstract:** Conducted the study and description of the ultrastructure of normal sperm male goats adult dwarf of Cameroon (*Capra hircus*) by transmission electron microscopy. Head took shape oval or flat with a square base, which provided a concave space for the tail. The acrosome tightly covered the first two-thirds of the sperm head. The classic pattern of 9 + 9 + 2 pairs of microtubules that compose the axoneme was observed in three segments of the tail. The barrier between the midpiece and the principal piece was clearly defined by the presence of the Jensen's ring or annulus. The results of ultrastructural spermatozoa of the dwarf African bucks were similar to the other ruminants spermatozoas.

**Key words:** spermatozoa, ultrastructure, *Capra hircus*.

Fecha de recepción: 15/04/11

Fecha de aprobación: 20/05/11

---

**Dirección para correspondencia:** F. Faisal, Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

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

---

## INTRODUCCIÓN

La aptitud reproductiva de un macho está dada por su potencia coeundi y generandi, y por su libido. Se considera que la evaluación de la calidad seminal es indispensable para demostrar la potencia generandi de un individuo. Las investigaciones realizadas en los diferentes aspectos de la calidad seminal no solo estuvieron direccionadas hacia la clínica, sino que el conocimiento adquirido también ha permitido el desarrollo de diferentes biotecnologías reproductivas las cuales son aplicadas tanto en animales domésticos como en especies silvestres, particularmente aquellas que están en peligro de extinción (1, 2, 3).

El estudio de las características estructurales y ultraestructurales de los espermatozoides de los mamíferos fue determinante para rever los conceptos de capacidad y potencial reproductivo de las diferentes especies animales (4, 5, 6, 7, 8). Es aceptado que las alteraciones morfológicas y estructurales de los espermatozoides y del plasma seminal están relacionadas con diferentes grados de infertilidad (9). Si bien existen diferencias en la ultraestructura de los espermatozoides entre las diferentes especies de mamíferos, los mismos mantienen una estructura semejante (10). Estructuralmente, en el espermatozoide se distinguen la cabeza y el flagelo, ambas estructuras cubiertas externamente por la membrana plasmática, y el acrosoma que recubre la porción apical de la cabeza (5, 8). Si bien, la microscopía óptica es de utilidad práctica y rutinaria para el análisis morfológico de los espermatozoides de los mamíferos (9), la microscopía electrónica de transmisión ha permitido conocer la ultraestructura celular y proveer de información detallada acerca de la integridad celular, lo cual no es posible obtener por medio de otras metodologías y contribuye a valorar la funcionalidad testicular y epididimaria (11).

La ultraestructura de los espermatozoides de los rumiantes se encuentra bien detallada para los bovinos (*Bos taurus*) (12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22). Sin embargo, la información existente sobre el tema en pequeños rumiantes (*Ovis aries* y *Capra hircus*) es menor, en particular sobre la ultraestructura espermática del macho cabrío enano africano (23).

El propósito de este estudio fue describir la ultraestructura de los espermatozoides normales de los machos cabríos adultos enanos de Camerún (*Capra hircus*) con el fin de aportar datos representativos de esta raza caprina.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron machos cabríos adultos enanos de Camerún (*Capra hircus*) (n=5), clínicamente sanos, de 30- 35 Kg de peso vivo, mantenidos en cautiverio en el Jardín Zoológico y Botánico de la ciudad de La Plata, Buenos Aires Argentina

(latitud 34° 55' Sur, Longitud 57° 17' Oeste). La extracción de semen se realizó mediante un electroeyaculador Original Electronic Siremaster Eyaculator® (Ice Company - USA), cada quince días durante un año. Las muestras espermáticas para microscopía electrónica se obtuvieron una vez al mes, tomándose una alícuota de 15 µl. Las muestras fueron centrifugadas a 1.500 rpm durante 3 minutos a temperatura ambiente. El pellet obtenido fue fijado en glutaraldehído al 2 % (LADD Research Industries, INC) pH 7,4 durante 2 horas a 4 °C. Luego, se realizó una posfijación a 4 °C en tetróxido de osmio al 1 % (LADD Research Industries, INC) y posteriormente se deshidrató en una serie creciente de alcoholes (50°, 70°, 80°, 90° y alcohol absoluto) y acetona. Finalmente, se incluyó en resina Epoxi (LADD Research Industries, INC). Se realizaron cortes semifinos (3 µm) como orientación de campo en un ultramicrotomo Reichert - J. (Modelo Supernova) y se tiñeron con azul de toluidina (Schmid GMBH & CO.). Los cortes ultrafinos fueron de 60 nm y se montaron sobre grillas de cobre. El contraste de los cortes ultrafinos se realizó con acetato de uranilo al 1 % y solución de Reynolds de citrato de plomo (LADD Research Industries, INC). La observación, el registro fotográfico y la evaluación de la ultraestructura espermática se realizaron mediante un microscopio electrónico de transmisión Jeol JEM 1200 EX II.

En cada una de las muestras analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión se estudiaron 100 espermatozoides. Para la descripción de la ultraestructura de los espermatozoides se consideraron dos partes principales, la cabeza y la cola, y esta última fue subdividida en cuatro porciones: cuello, pieza intermedia, pieza principal y pieza terminal.

## RESULTADOS

La cabeza se caracterizó por su forma de óvalo o raqueta plana con una base cuadrada la cual proporcionó un espacio cóncavo para la inserción de la cola y presentó externamente una división entre las áreas acrosomal y post-acrosomal (Fig. 1a). Ultraestructuralmente, la membrana plasmática se observó lisa en toda su extensión. El núcleo, cubierto por una doble membrana, abarcó la totalidad de la cabeza y presentó una cromatina densa con algunas pequeñas vacuolas distribuidas al azar (Fig. 1b y c). La parte superior de la cabeza estaba cubierta por el acrosoma, el cual abarcó los dos tercios anteriores del núcleo y presentó una protuberancia unilateral en el borde superior, el cuerpo apical (Fig. 1c). La región ecuatorial, compuesta por la parte caudal del acrosoma y las membranas plasmáticas, conformó un anillo que demarcó el límite entre el acrosoma y la porción post-acrosomal (Fig. 1b).



El cuello, representado por un segmento corto, se halló comprendido entre la base de la cabeza y la pieza intermedia del flagelo. Se observó el centriolo proximal y las fibras densas laminadas que se ubicaron dentro del espacio cóncavo o fosa de implantación en la base de la cabeza (Fig. 1d). La pieza intermedia correspondió a la porción más gruesa y superior de la cola, situada entre el cuello y el anillo de Jensen ó *annulus*, una estructura electrodensa presente alrededor del conjunto axial de fibras densas en la unión entre la pieza intermedia y la pieza principal (Fig. 2 b).

La pieza intermedia se caracterizó por la presencia de nueve fibras densas externas alrededor del axonema y una vaina helicoidal de mitocondrias conteniendo ambas estructuras. Estas fibras densas terminaron a distintos niveles de la pieza principal. En los cortes transversales de la cola se observó el axonema con el patrón

clásico de nueve pares dobles de microtúbulos (subunidad A con los brazos de dineína y subunidad B) alrededor de un par central (Fig. 2b y 2c). En la pieza principal, la vaina mitocondrial fue reemplazada por una vaina fibrosa compuesta por una columna longitudinal continua dorsal y otra ventral conectadas a través de bandas circunferenciales. Hacia la pieza terminal la vaina fue más delgada y las dos columnas se asociaron con las fibras densas externas 3 y 8 (Fig. 2d).

La pieza terminal fue la porción más corta y delgada de la cola, y estaba constituida solamente por el axonema cubierto por la membrana celular (Fig. 2d).

## DISCUSIÓN

La cabeza del espermatozoide del macho cabrío enano de Camerún presentó una forma oval, semejante a la descrita para otros ruminantes y mamíferos (4, 5, 6, 8, 12, 13, 14, 15,

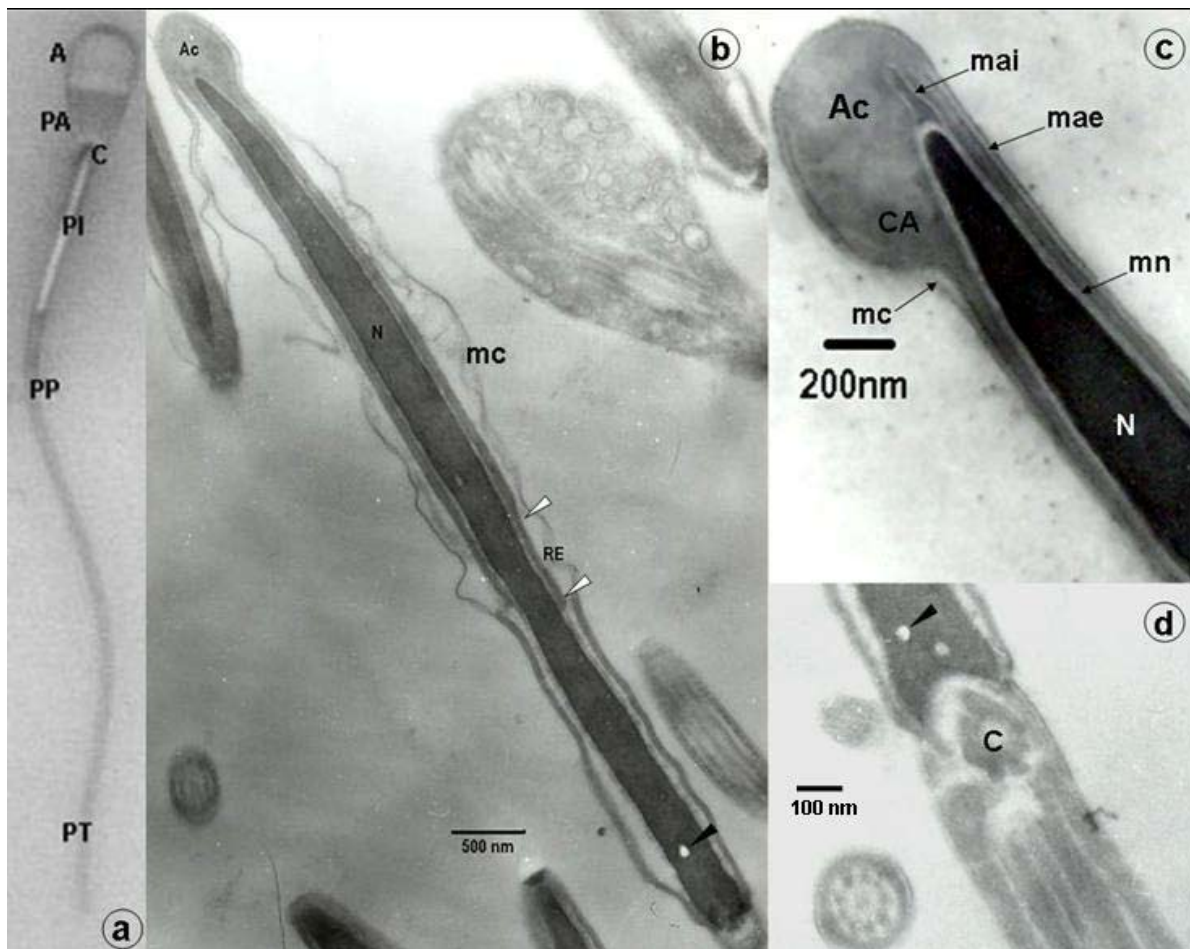


Fig. 1. **a** espermatozoide caprino (40X): Área Acrosomal (A), Área Post Acrosomal (PA), Cuello (C), Pieza Intermedia (PI), Pieza Principal (PP) y Pieza Terminal (PT). **b** corte longitudinal de cabeza: Acrosoma (Ac), Núcleo (N), membrana citoplasmática (mc), Región Ecuatorial (RE) entre cabezas de flechas blancas, vacuolas nucleares (cabezas de flechas negras). **c** detalle de la región acrosomal: Acrosoma (Ac), Cuerpo Apical (CA), membrana acrosomal interna (mai), membrana acrosomal externa (mae), membrana nuclear (mn), membrana citoplasmática (mc), Núcleo (N). **d** detalle de cuello: vacuola nuclear (cabeza de flecha), Centriolo (C).

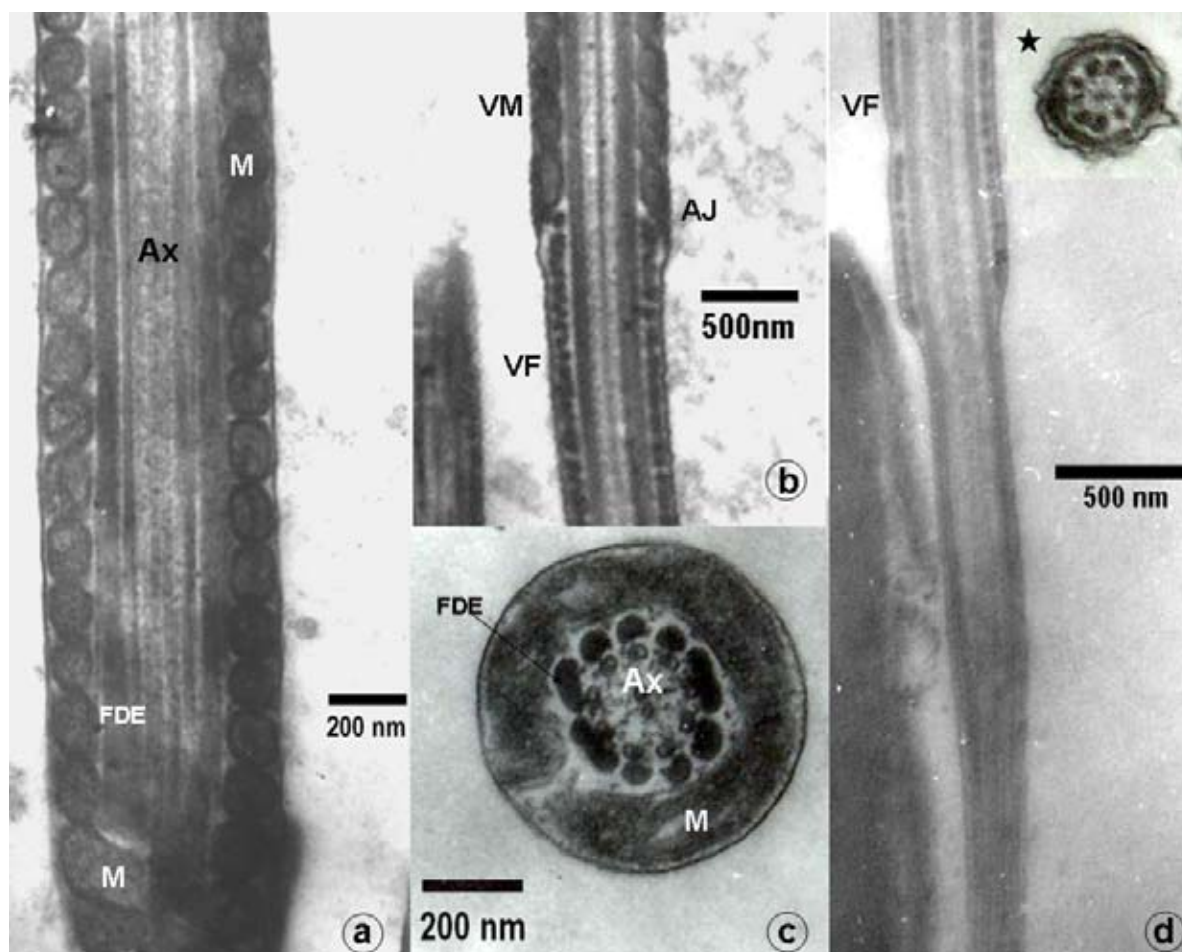


Fig 2. **a** corte longitudinal del flagelo, pieza intermedia: Axonema (Ax), Mitochondrias (M), Fibras Densas Externas (FDE). **b** corte longitudinal de pieza intermedia y pieza principal: Vaina Mitochondrial (VM), Anillo de Jensen (AJ) o *annulus*, Vaina Fibrosa (VF). **c** corte transversal de pieza intermedia: Axonema (Ax), Mitochondria (M), Fibras Densas Externas (FDE). **d** corte longitudinal de pieza principal y pieza terminal: Vaina Fibrosa (VF), corte transversal de pieza principal (estrella): el axonema rodeado por la vaina fibrosa (columnas dorsal y ventral conectadas por bandas circunferenciales que se asocian con las fibras densas externas 3 y 8).

16, 17, 18, 19, 20, 21, 22). El centriolo proximal situado en la base de la cabeza rara vez logró verse en secciones longitudinales. La ultraestructura de la cola, en general, fue similar a los patrones descritos para otras especies (1, 2, 4, 11). El *annulus* se observó como una clara división electrodensa entre la pieza intermedia y la principal donde termina la vaina mitocondrial y comienza la vaina fibrosa. Si bien se describe una invaginación de la membrana para formar un surco profundo de característica retroanular en diferentes especies, entre ellas el carnero (3 y 23), no se pudo reconocer la misma en los cortes realizados en este trabajo.

La descripción de la ultraestructura de los espermatozoides del macho cabrío de Camerún (*Capra hircus*) responde al patrón general descripto para los espermatozoides de los rumiantes.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Baccetti B, Bergamini M, Bernieri G. Submicroscopic mathematical evaluation of spermatozoa in assisted reproduction. 4. The bovine fertilization (Notulae seminologicae). J Submicr Cytol Path. 1997; 29(4): 563-582.
2. Bitto II, Egbunike GN. Seasonal variations in sperm production, gonadal and extragonadal sperm reserves in pubertal West African dwarf bucks in their native tropical environment. Livestock Research for Rural Development. 2006. Volume 18, Article 134.
3. Oyeyemi, MO, Olukole, SG, Esan O. Sperm Morphological Studies of the West African Dwarf Buck Treated with Pumpkin Plant (*Cucurbita pepo*). Int. J. Morphol. 2008, 26(1):121-126.
4. Fawcett DW. A Comparative View of Sperm Ultrastructure 1. Biology of Reproduction Supplement 1970; 2: 90-127.

5. Fawcett DW. The mammalian spermatozoon. *Develop Biol.* 1975; 44: 394-436.
6. Hancock JL. Ultrastructure of mammalian spermatozoa. *Adv Rep. Phys.* 1966; 1: 25.
7. Juhász J, Nagy P, Kulcsar M, Huszenicza GY. Methods for semen and endocrinological evaluation of the stallion: a review. *Acta Vet Brno.* 2000; 69: 247-259.
8. Aquino Luque MC, Nair Bao S. Structural and ultrastructural characterization of zebu (*Bos indicus*) spermatozoa. *Biocell* 2006, 30(1): 33-38.
9. Pesch S, Bergmann M. Structure of mammalian spermatozoa in respect to viability, fertility and cryopreservation. *Micron.* 2006, 37 (7): 597-612.
10. Olson GE, Winfrey VP. A comparison of mammalian sperm membranes. *A Comparative Overview of Mammalian Fertilization*, 3. B.S. Dunbar and M.G. O'Rand (Editors), Plenum Press (New York). 1991. 51-62.
11. Jurado SB, Sarmiento P, Stornelli MA. La Microscopía Electrónica como herramienta en la evaluación de semen canino. *Rev. Analecta Veterinaria.* 2008. 28 (1): 7-14.
12. Bonadonna J. Enquires on the sperms of domesticated animals using the electron microscope. First report: on the microstructure of "*bos taurus sperms*". *Proc Eighth Pacific Sci Cong.* 1958; 4: 455-490.
13. Rahlman DF. Electron microscopic study of mature bovine spermatozoa. *J Dairy Sci.* 1961; 44: 915-920.
14. Blom E. The galea capitis and apical body in bull sperm and the fertilization process. *Intern J Fert.* 1963; 8: 447-452.
15. Saacke RG, Almquist JO. Ultrastructure of bovine spermatozoa. I. The head of normal, ejaculated sperm. *Am. J Anat.* 1964; 115: 143-161.
16. Blom E, Birch-Andersen A. The ultrastructure of the bull sperm. II. The sperm head. *Nord Veterinaermed.* 1965; 17: 193-212.
17. Wooding FBP, O'Donnell JM. Detailed ultrastructural study of head membranes of ejaculated bovine sperm. *J Ultra Mol Struc R.* 1971; 35(1-2): 71-85.
18. Bustos-Obregon E, Fléchon JE. Comparative scanning electron microscope study of boar, bull and ram spermatozoa. *Cell Tiss Res.* 1975; 161: 329-341.
19. Oko RJ, Costerton JW, Coulter GH. An ultrastructural study of the head region of bovine spermatozoa. *Can J Zool.* 1976; 54: 1326-1340.
20. Saacke RG, Almquist JO. Ultrastructure of bovine spermatozoa. II. The neck and tail of normal, ejaculated sperm. *Am J Anat.* 1964; 115: 163-182.
21. Bradfield JRG. Fiber patterns in animal flagella and cilia. *Symp Soc Exptl Biol.* 1955; 9: 306-334.
22. Telkka A, Fawcett DW, Cristensen AK. Further observations on the structure of the mammalian sperm tail. *Anat Rec.* 1961; 141: 231-246.
23. Fawcett DW. Structure of the mammalian spermatozoon. *Intern Rev Cytol.* 1958; 7: 195-243.

## OBSTRUCCIÓN DE VÍAS AÉREAS INFERIORES POR CUERPO EXTRAÑO EN PERROS: DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO ENDOSCÓPICO

Giordano AL<sup>1</sup>, Baschar HA<sup>1</sup>, Aprea AN<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Diagnóstico por Imágenes, Área Endoscopia, Hospital Escuela.

<sup>2</sup>Cirugía II - Facultad de Ciencias Veterinarias - Universidad Nacional de La Plata

**Resumen:** *Se realiza una revisión bibliográfica sobre cuadros clínicos obstructivos de vías aéreas inferiores por cuerpos extraños en caninos. Se presenta un informe de una serie de casos con resolución endoscópica. Se comparan las distintas presentaciones clínicas descriptas en la bibliografía internacional entre ellas y también con nuestra casuística, concluyendo en que existen dos tipos de presentaciones clínicas, una aguda y otra crónica y que responden a distintos tratamientos.*

**Palabra claves:** Broncoscopia, Cuerpo extraño, perro

## OBSTRUCTION OF CANINE LOWER AIRWAYS BY FOREIGN BODIES: DIAGNOSIS AND ENDOSCOPIC TREATMENT

**Abstract:** *After an exhaustive review of the international literature on the clinical presentation of canine lower-airway obstructions by foreign bodies, we present here a report on a series of cases involving a resolution by endoscopy. After comparison of the various clinical presentations described in the literature with our own series of case studies, we conclude that there exist two types of presentations, one acute and the other chronic, and that the two types respond to different treatment modalities.*

**Key Words:** bronchoscopy, foreign body, dogs

Fecha de recepción: 26/09/10

Fecha de aprobación: 20/05/11

---

**Dirección para correspondencia:** Andrea Giordano, Servicio de Diagnóstico por Imágenes. 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

Diferentes tipos de cuerpos extraños livianos pueden ser inhalados hasta la tráquea o los bronquios en los perros. El cuerpo extraño más frecuentemente encontrado es la espiga completa de trigo o cebada cuyas espículas impiden el retroceso del mismo y facilitan su penetración profunda, provocando en algunas oportunidades enfermedad pulmonar (abscesos, neumotórax, piotórax) (1). En ocasiones pueden presentar migración hacia otros órganos causando por ejemplo discospondilitis de la columna lumbar (1). También se han hallado plantas como cola de zorro, semillas, huesos, pelotas y bolitas (cánicas) (1, 2).

No existe consenso sobre la incidencia del problema, ni sobre la presentación en diferentes razas y edades. Para algunos autores la presentación es más frecuente en perros de trabajo o caza y, según otros, las razas más afectadas son Labrador Retriever y Springer Spaniel (1, 3, 4).

Se realizó un estudio retrospectivo sobre 23 caninos derivados al servicio de endoscopia para la realización de traqueobroncoscopias entre los años 2003 y 2007. Dentro de este grupo se identificaron 3 que presentaban cuerpos extraños traqueo bronquiales.

## CUADROS CLÍNICOS

En una encuesta la duración de los signos antes de la consulta al veterinario osciló de un día a cinco meses, con un promedio de dos meses (1). En base a esta variación podemos afirmar que de acuerdo al estadio evolutivo de la obstrucción, el cuadro clínico variará.

### CUADRO OBSTRUCTIVO AGUDO

En el cuadro obstructivo agudo prevalecen los signos de obstrucción de vías aéreas: disnea, con signos clínicos de comienzo abrupto. Cuando

la ubicación del cuerpo extraño es en tráquea cervical, la disnea es inspiratoria y cuando es bronquial espiratoria. Pueden existir diversos signos de disnea obstructiva como: respiración discordante (disociación entre los movimientos de la pared y flanco), respiración labial, respiración bucal, ortopnea, cianosis, intolerancia al ejercicio, colapso y náuseas (5). Puede haber aumento de la temperatura corporal por defectos en la disipación del calor por medio del jadeo. En los casos de existir náuseas y vómitos hay que diferenciar de cuerpos extraños esofágicos. A la auscultación: ruidos inspiratorios o espiratorios aumentados (2).

Los estudios radiográficos pueden revelar presencia de cuerpos extraños radio opacos (2). La broncoscopia es esencial para confirmar el diagnóstico cuando las radiografías y radioscopias no son categóricas en sus resultados (1, 2, 6).

### Diagnóstico diferencial

En la presentación aguda es necesario considerar los siguientes diagnósticos diferenciales: estenosis, compresión y colapso traqueal; enfermedad de vías aéreas superiores: parálisis laríngea, edema laríngeo, síndrome braquicefálico (2). El edema pulmonar no cardiogénico (7) y la neumonía por aspiración pueden ser complicaciones de este cuadro (2).

### CUADRO OBSTRUCTIVO CRÓNICO

En el cuadro clínico crónico el signo clínico predominante es la tos persistente seca y no productiva que aparece en situaciones de excitación o ejercicio, puede haber halitosis, siendo la presentación de sibilancias y disnea menos frecuentes. La hemoptisis se presenta cuando hay neumonía por cuerpo extraño (6, 8).

Hay respuesta parcial a los antibióticos y

CASO CLÍNICO	SIGNOS	EVOLUCIÓN, ESTUDIOS Y TRATAMIENTOS PREVIOS	TRAQUEO BRONCSCOPIA	TRATAMIENTO
Nº 1 -Foxterrier -Hembra -3 kg -Edad: 2 m	- Tos de comienzo agudo - Disnea - Tª 40°C	- 24 h - RX cuello y tórax s/p	Presencia de pasto en tráquea sobre carina	Remoción endoscópica con pinza de biopsia
Nº 2 - Mestizo -Macho -30, 5 kg - Edad: 5 m	-Tos de comienzo agudo -Tª40°C	- 7 días - RX tórax s/p -Tratado con corticoides sin resultado	Presencia de semilla de pino en luz traqueal	Remoción endoscópica con canastilla de dormia
Nº3 - Mestizo -Macho -9 kg -Edad: 6 m	- Disnea de comienzo agudo - Vómitos - Agitación - Insomnio - Anorexia	- 6 días - RX cuello y tórax s/p	Presencia de cuerpo extraño esférico localizado en bronquio primario izquierdo.	Remoción endoscópica con canastilla de dormia

recidiva cuando se suspende la administración. Por todo esto hay que considerar al cuerpo extraño en el diagnóstico diferencial tanto de la tos aguda como de la crónica (1, 6). En el caso de pacientes no tratados, después de dos semanas la tos desaparece y surgen signos sistémicos tales como fiebre, anorexia, depresión, leucocitosis (4) y eosinofilia (6). En estos casos las radiografías revelan bronquitis localizada, focos neumónicos y/o efusiones pleurales. Los bronquios más afectados resultan los caudales y la resolución, debido a las complicaciones pulmonares, por lo general debe ser quirúrgica (4).

### Diagnostico diferencial

En la presentación crónica es necesario considerar los siguientes diagnósticos diferenciales: tumores infecciones bacterianas y micóticas, parasitosis pulmonar, colapso traqueal (1).

## DIAGNÓSTICO

### Radiología:

La mayor parte de los cuerpos extraños no son radiopacos. Los signos radiológicos sutiles pueden evidenciarse en placas tomadas en inspiración y espiración. Las radiografías pueden mostrar opacidad en el interior del bronquio afectado y una zona definida de incremento de la radiopacidad periférica (1) más comúnmente envolviendo el bronquio del lóbulo caudal (6). En algunos casos la imagen radiológica es la de una consolidación del lóbulo pulmonar afectado (1).

## DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO

### Broncoscopia:

En las dos presentaciones clínicas el valor diagnóstico de la endoscopia es muy alto ya que las radiografías muchas veces no muestran signos contundentes y en la presentación clínica aguda es esencial ya que durante la práctica endoscópica puede realizarse la extracción del cuerpo extraño (6, 9).

El uso de endoscopia para extraer cuerpos extraños fue descrito por Jones y Roudebush en 1984 (10), sin embargo en ciertos casos es necesario la extracción quirúrgica (11). Podemos clasificar los cuerpos extraños en recuperables y no recuperables (11). La posibilidad de la extracción endoscópica dependerá del tipo de cuerpo extraño, de su localización, del tiempo en el que el animal es remitido a la consulta y de la evolución del cuadro. Puede estar indicada la lobectomía en los casos en el que el cuerpo extraño no sea susceptible de extracción y también cuando existen inflamación crónica y consolidación (1).

La endoscopia respiratoria con endoscopios rígidos flexibles es una indicación tanto para el diagnóstico como para el tratamiento en el caso de los cuerpos extraños recuperables (2, 12).

### Procedimiento de extracción endoscópica:

Antes de realizar la práctica, se debe estabilizar al paciente mediante la suplementación con oxígeno, aplicación de compresas de alcohol en pulpejos o compresas de agua helada y ventiladores para disminuir la temperatura corporal, sedación y cuando corresponda traqueotomía (2). Una vez inspeccionados todos los bronquios principales puede identificarse el cuerpo extraño. Comúnmente se aloja en la bifurcación o en bronquios principales (1, 2). Cuando se localizan en el lado derecho, algunos permanecen en el bronquio lobar caudal derecho, mientras que unos pocos alcanzan el bronquio del lóbulo accesorio. De



Fig.1. Pasto en tráquea (cola de zorro).



Fig. 2. Extracción endoscópica de Semilla de pino.



Fig. 3. Maní en bronquio.

manera infrecuente pueden encontrarse en los lóbulos medio y superior (1).

La broncoscopia permite la localización y la visualización directa. En los casos crónicos se puede observar la emergencia de exudado amarillo a amarillo verdoso desde un bronquio correlacionando este bronquio con el área de consolidación pulmonar (11).

El cuerpo extraño puede ser extraído suavemente con las pinzas específicas. Se pueden utilizar endoscopios flexibles o rígidos estos últimos, como por ejemplo el Chevalier Jackson, son más útiles para la extracción de los mismos (1).

El pronóstico es excelente en el caso en que haya sido posible la identificación y posterior extracción (1).

## PRESENTACIÓN DE CASOS

Los tres pacientes (todos menores de 6 meses) se presentaron con disnea obstructiva inspiratoria. Los cuerpos extraños estaban instalados antes de la bifurcación de la tráquea en dos casos (una semilla de pino y una hoja de cola de zorro Fig. 1 y 2) y uno en el bronquio izquierdo (un maní Fig.3). En las radiografías simples no se visualizaban por ser radiolúcidos. El paciente con el cuerpo extraño en bronquio izquierdo presentaba además vómitos, anorexia, insomnio, e inquietud como signos agregados. El tratamiento (extracción de los cuerpos extraños) fue realizado por vía endoscópica con canastilla de dormia y pinza de biopsia, remitiendo los signos clínicos en forma inmediata. Se utilizó un Gastro-fibroscopio Olympus Gif N30.

## DISCUSIÓN

En nuestro servicio los cuerpos extraños representaron el 13 % (3/23) del total de traqueobroncoscopias. Ninguno pudo ser diagnosticado radiológicamente ya que los cuerpos eran radiolúcidos. Los tres pacientes se presentaron con disnea obstructiva inspiratoria. El cuadro clínico en todos era agudo o sobreagudo y la resolución endoscópica fue exitosa en todos los casos.

Todos eran de corta edad menores 6 meses. Los cuerpos extraños estaban instalados en la bifurcación de la tráquea en dos casos y uno en el bronquio izquierdo.

El paciente que presentaba el cuerpo extraño en bronquio izquierdo presentaba además vómitos, anorexia, insomnio, e inquietud como síntomas agregados, los vómitos hicieron sospechar durante 72 h a los clínicos de que se trataba de un cuerpo extraño esofágico.

Dos de los pacientes con cuerpo extraño alojado en tráquea torácica presentaban hipotermia, en uno de los casos de los casos fue interpretado debido a la reseña como posible enfermedad infecciosa (moquillo).

De acuerdo a la información reportada en la bibliografía sobre el tema y a nuestra casuística podemos inferir que existen dos cuadros clínicos dependiendo de la edad, el tipo de paciente, el tiempo en el que el mismo es remitido a la consulta.

También podemos decir que cuanto más rápida sea la consulta y realizado el diagnóstico definitivo las posibilidades de extracción endoscópica son más altas (casos agudos).

## BIBLIOGRAFÍA

- Herrtage ME. Alteraciones Respiratorias. In: Schaer M ed. Medicina Clínica del perro y el gato. 1st ed. Barcelona: Ed. Masson Elsevier, 2006:163-192.
- Lee JE, Drobatz KJ. Approach to problems in respiratory Medicine. In: LG King ed. Respiratory disease in dogs and cats. 1st ed. St. Louis, Missouri: Ed. Saunders Elsevier, 2004: 1-12.
- Cartagena Albertus JC, Manchado JE. Exploración endoscópica del aparato respiratorio. In: Montoya Alonso ed. Enfermedades respiratorias en pequeños animales. 1st ed. Buenos Aires: Ed Intermédica, 2005:33-40.
- Rodríguez García JF. Cuerpos extraños traqueo-bronquiales. In: Montoya Alonso ed. Enfermedades respiratorias en pequeños animales. 1st ed. Buenos Aires: Ed Intermédica, 2005: 243-246.
- Dobbie GG, Darke PGG, Head KW. Intrabronchial foreign bodies in dogs. J Small Anim Pract. 1986; 27 (4): 227 - 238.
- Tsai SL, Sato AF. What is your diagnosis? Non-cardiogenic pulmonary edema secondary to upper airway obstruction. J Am Vet Med Assoc. 2008; 232(7) (1,Apr):995-6.
- Bailiff NL, Norris CR. Clinical Signs, Clinicopathological Findings, Etiology, and Outcome Associated With Hemoptysis in Dogs: 36 Cases (1990-1999). J Am Vet Med Assoc 2002;38:125-133.
- Johnson L. Tracheal Obstructive Disease. In: NAVC Proceedings 2006, North American Veterinary Conference (Eds). Publisher: NAVC (www.tnavc.org). Internet Publisher: International Veterinary Information Service, Ithaca NY (www.ivis.org), Last updated: 11-Jan-2006. <http://www.ivis.org/proceedings/navc/2006/SAE/468.asp?LA=1>
- Brownlie SE, Davies JV. Bronchial foreign bodies in four dogs. In J. small Anim. Practice 1986; 27, 239-245.
- Jones BD, Roudebush P. The use of fiberoptic endoscopy in the diagnosis and treatment of tracheobronchial foreign bodies. J Am An Hosp Ass. 1984; 20 (3): 497.
- Wendell AN. Enfermedades de la tráquea y los bronquios. In: Slatter, D (ed) Tratado de Cirugía en Pequeños Animales. Ed. Intermédica, Buenos Aires, 2006: 1005-1031.
- Roudebush P. Tracheobronchoscopy. Veterinary Clinics of North América: Small Animal Practice Vol. 20, n° 5, September 1990:1297-1314.

## INFECCIÓN POR *Mycoplasma suis* EN EL CERDO. UNA REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Pintos ME<sup>1</sup>, Scodellaro CF<sup>1</sup>, Perfumo CJ<sup>2</sup>, Posik D<sup>3</sup>, Arauz MS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Central, <sup>2</sup>Patología Especial <sup>3</sup>Genética  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Nacional de La Plata

**Resumen:** *El Mycoplasma suis es un microorganismo epitelial no cultivable, sensible a las tetraciclinas y que se adhiere a la superficie del eritrocito causando deformación y lisis celular. En el cerdo produce cuadros agudos con anemia hemolítica inmunomediada, hipoglucemia y acidosis. En los cuadros crónicos, se consigna anemia moderada, baja tasa de crecimiento, infertilidad e inmunodepresión. El ciclo de vida del M. suis hace necesaria la presencia de eritrocitos ya que presenta mecanismos de adhesión y replicación mediante proteínas a la superficie, los cuales aún no son bien conocidos. El diagnóstico de la infección se realiza a través de la signología clínica y la observación de M. suis en frotis sanguíneos. Sin embargo en la actualidad, el método más sensible y específico es la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real time PCR).*

**Palabras claves:** *Mycoplasma suis*, infecciones en cerdos, revisión

## *Mycoplasma suis* INFECTION IN PIGS. A REVIEW OF THE LITERATURE

**Abstract:** *Mycoplasma suis is a microorganism epi-cellular not cultivable, sensitive to tetracycline, which adheres and deform the surface of erythrocyte causing cell lysis. Acute infections in pigs are clinically marked by a life-threatening acute immune hemolytic anemia, hypoglycemia and acidosis. Chronic course is characterized by anemia, poor growth, infertility and immunosuppression. Erythrocytes are necessary for their cycle of life in which adherence and replication mechanisms through surface proteins are yet not well known. Diagnosis of M. suis are due by clinical signs and special stains on blood smears. Currently the more sensitive and specific method is real-time PCR technique.*

**Keywords:** *Mycoplasma suis*, pig infections, revision

Fecha de recepción: 10/12/09

Fecha de aprobación: 05/05/10

**Dirección para correspondencia:** María E. Pintos, Laboratorio Central. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

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



## INTRODUCCIÓN

El *Mycoplasma suis* es un patógeno hemotrófico de los porcinos, de vida extracelular, que se adhiere a la pared de los eritrocitos causando su deformación y lisis. Es el agente etiológico de la entidad antiguamente denominada Eperythrozoonosis porcina, actualmente correspondería llamarse Hemoplasmosis porcina. Esta infección es de distribución mundial y causa pérdidas económicas en la producción porcina, no estimadas en nuestro país (1).

Su presentación clínica puede ser aguda o crónica. La primera se manifiesta principalmente en lechones y se caracteriza por anemia, ictericia y fiebre con baja morbilidad y alta mortalidad (2, 3, 4). La segunda, es subclínica pudiendo presentar moderada ictericia y anemia en los recién nacidos, retardo en el crecimiento en los animales en engorde (5) y baja performance. Así como una mayor predisposición a infecciones entéricas y respiratorias, probablemente debido a la supresión de las funciones de los linfocitos T (3, 5, 6, 7, 8, 9).

En reproductores está asociada a fallas reproductivas tales como ciclos irregulares, anestro y fallas en la concepción (10, 11).

Los cerdos infectados pueden o no transformarse en portadores crónicos de acuerdo al grado de la respuesta inmune o los resultados del tratamiento con antibióticos. (12, 13)

### Historia:

En 1934, en Estados Unidos se describieron, casos de ictericia y anemia en cerdos, los que se asociaron luego, en 1950, con un agente que fue caracterizado como una rickettsia a la que se denominó *Eperythrozoon suis*. (14, 15) Smith y col., en 1977 (16) estudiaron 10.000 sueros porcinos y encontraron que el 20% eran seropositivos a esta enfermedad por medio de la técnica de hemoaglutinación indirecta. (IHA) En la década de los 90, estudios moleculares realizados con las especies de los géneros *Eperythrozoon* y *Haemobartonella* sugirieron que éstas abandonarían su clasificación como rickettsias y pasarían a formar parte de la clase Mollicutes. (17) Así *M suis* y el resto de especies transferidas fueron agrupados en el género *Mycoplasma* dentro del grupo de los hemoplasmas (15, 16).

En los últimos años, en Estados Unidos con el desarrollo de la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), fueron evaluados 60 sueros porcinos, obteniendo como resultado un 29 % de positivos al microorganismo (18).

En el año 2007 Hoelzle y col., en Alemania estudiaron la patobiología y la inmunología de los hemoplasmas y el uso de la técnica de la PCR

para el diagnóstico de *M. suis*. (19, 20) Además evaluaron la importancia de la técnica de PCR de tiempo real para el diagnóstico de *M. suis* principalmente en animales asintomáticos. Se trabajó con el gen *msg1* específico de *M. suis* encontrando una sensibilidad del 100% y una especificidad del 96,7%. En el 2008 evaluaron la prevalencia de *M. suis* mediante técnicas de PCR de tiempo real y la observación de frotis sanguíneos con tinción de naranja de acridina, encontrando una mayor sensibilidad con la técnica de PCR. (21, 22)

En la República Argentina, el primer hallazgo fue comunicado por Kloster y col., en 1985. (4) En 1986 Anziani y col., (6) identificaron el microorganismo a partir de un animal proveniente de la Provincia de Santa Fé con diagnóstico presuntivo de neumonía. En 1999, Machuca y col., (23) describieron un brote de eperythrozoonosis en la provincia de Buenos Aires en cerdos criados en forma semi-intensiva. El mismo se caracterizó por retraso en el crecimiento y aumento en la mortandad en las categorías de desarrollo y terminación, observándose *M. suis* en frotis sanguíneos de otras categorías como madres y lechones. En el año 2002 nuestro grupo de trabajo evaluó seis establecimientos de ciclo completo en confinamiento localizados en la Pcia. de Buenos Aires, para diagnosticar mediante estudios hematológicos la presencia de *M. suis*. De las seis granjas estudiadas, cinco fueron negativas a la observación de *M. suis* en los extendidos de sangre. Mientras que en la granja positiva el 100% de las hembras muestreadas que representaba el 33% del plantel reproductor, si bien los valores hematológicos fueron normales, se observó *M. suis* en los frotis sanguíneos. Del análisis de los registros reproductivos se constató que el 50% de las hembras presentaban repetición de celos (regulares e irregulares) así como estro postdestete irregular, habiéndose descartado, por estudios complementarios otras causas infecciosas y/o de manejo.

En todos los frotis de sangre de los lechones recién nacidos hasta 21 días de vida provenientes de las madres positivas también se identificó el microorganismo. Además se observaron alteraciones en los eritrocitos como: anisocitosis, poiquilocitosis, policromasia, corpúsculos de Howell-Jolly y eritroblastos, lo que fue indicativo de una anemia regenerativa. Por lo tanto se confirmó la transmisión del microorganismo por vía transplacentaria, descartando las otras vías de transmisión mediante el estudio de los registros de manejo de la granja.

En el año 2004 trabajamos con muestras provenientes de granjas dentro de la Pcia de Buenos Aires, con lechones de 87 días de edad con peso promedio de 24 kg que presentaban retraso en el crecimiento y mucosas pálidas. A través de estudios hematológicos se diagnóstico anemia

regenerativa por *M. suis*, la cual se asoció a la presentación clínica del síndrome multisistémico de adelgazamiento postdestete (SMAP), una de las entidades asociadas a la infección por circovirus porcino tipo 2 (PCVAD, porcine circovirus associated diseases) (24, 25).

En el año 2004, Pereyra y col., (25) evaluaron por la técnica de PCR, 285 muestras de sangre, provenientes de las provincias de Santa Fe, Córdoba y Buenos Aires y los resultados obtenidos fueron que el 65 % eran positivos a *M. suis*, con una distribución del 56,4 %, 70,8 % y 83,6 % respectivamente.

En el año 2006 (26) trabajamos en una granja de producción intensiva que tenía bajo peso al destete (21 días), en animales cuyo peso al nacimiento era normal (1,49kg) y con un índice de mortalidad en maternidad normal (2%). En la misma se hicieron estudios hematológicos donde se diagnosticó *M. suis* y anemia microcítica e hipocromica probablemente relacionada con deficiencia de hierro. Ambas fueron tomadas como causa de pérdida de peso en lechones lactantes. En ese mismo año, Pereyra y col., (25) describieron casos clínicos en donde se encontró una interacción entre *M. suis* y circovirus porcino tipo 2 (PCV-2).

## ETIOLOGÍA

Los micoplasmas fueron separados de la Clase *Schizomycetes* en el año 1967 y ubicados en una nueva categoría, la Clase *Mollicutes*, nombre que hace referencia a sus características morfológicas (*mollis*: blando; *cutes*: piel).

Según la última actualización del "Subcomité de Taxonomía de los *Mollicutes*" (2003), esta clase se divide en 4 órdenes, 7 familias y 8 géneros, con un total, hasta el presente, de 190 especies clasificadas y unas 24 aún sin clasificar. Dentro de la Clase *Mollicutes* sólo las especies de las familias *Mycoplamataceae* y *Acholeplasmataceae* tienen importancia en Medicina Veterinaria.

La primera familia se divide, a su vez, en dos géneros, *Mycoplasma* con tropismo por el colesterol y en la que se encuentran las principales especies patógenas y *Ureaplasma* caracterizado por hidrolizar la urea y en la cual se conocen 7 especies de humanos, bovinos, gatos y aves de corral (27, 28).

El *M. suis*, antiguamente denominado *Eperythrozoon suis*, fue clasificado originalmente en la familia Anaplasmataceae (27), con los avances de la biología molecular, a través del estudio de las secuencias del gen del ARNr 16S (13, 18, 29, 30) fue reclasificado dentro de la familia *Mycoplasmataceae*.

El *M. suis* hoy se incluye en el género *Mycoplasma*, junto con otras bacterias hemotróficas,

en el grupo de los hemoplasmas. Esta bacteria es un microorganismo pleomórfico debido a la falta de pared celular rígida, no cultivable y epicelular obligado. (16, 19, 30, 31) Se describió como un microorganismo de redondo a oval con un largo total de hasta 600 nm y un diámetro de 375 a 500 nm. Estas variaciones de forma y tamaño están relacionadas con el ciclo vital de *M. suis* ya que se demostraron tres diferentes estados morfológicos. Los organismos inmaduros son ovals a redondos y se denominan formas cocoides cuando el microorganismo evoluciona hacia una forma juvenil se elonga y se define como forma discoide. Cuando alcanza la forma madura el centro se comprime y se observa como una forma anular. A medida que evoluciona, el ADN va pasando de una posición central a una periférica (15). Se observa adherido a la superficie de los eritrocitos porcinos en frotis sanguíneos coloreados con la tinción de May Gründwall-Giemsa (32) o con la tinción de naranja de acridina.

Mediante un screening genómico del *M. suis* se ha logrado identificar y caracterizar dos proteínas con características de proteínas de choque térmico, dos proteínas con características de enzimas glucolíticas, una helicasa del ARN y una proteína similar a la actina. Dentro de las proteínas de choque térmico se encuentra la proteína antigénica HspA1. El gen de *M. suis* denominado A1 de un tamaño de 1830 pb, que codifica para esta proteína de 67 KDa. Por técnicas de inmunomarcación con microscopía electrónica e inmunoblotting se observó que dicha proteína es accesible a los anticuerpos porque se encuentra en la superficie del *M. suis*. Esta proteína presenta actividad de ATPasa a través de la proteína HspA1 recombinante (RHspA1) obtenida en *Escherichia coli* (21)

Se encuentra también la proteína de membrana de *M. suis*, MSG1, con características similares a un gliceraldehído 3-deshidrogenasa (GAPDH). Esta proteína presenta la función de adherir el *M. suis* a la membrana de los eritrocitos. La MSG1 es la primera proteína adhesiva con función putativa en el grupo de los hemoplasmas. Esta proteína ayudó a poner a punto la técnica de PCR de tiempo real (21).

## PATOGENIA

Después de una infección experimental se produce un período de latencia variable, que dura aproximadamente 1 a 3 semanas, seguido de un período de parasitemia intensa. En las infecciones masivas se produce la fagocitosis del *M. suis*, adherido a la membrana del eritrocito, lo que lleva a una anemia hemolítica inmunomediada por crioaglutininas o asociada con éstas. Se producen así autoanticuerpos que se unen a

los eritrocitos de los cerdos infectados. Se ha propuesto que el parásito altera la membrana eritrocitaria causando la exposición a nuevos determinantes antigénicos y estimulando el desarrollo de anticuerpos antieritrocitarios. La infección aguda va acompañada de acidosis e hipoglucemia (33, 34, 35, 36). La disminución de glucosa en sangre está asociada con el metabolismo de *M. suis* (14, 17, 37, 38, 39).

El período de parasitemia intensa dura 5 a 10 días; después, los microorganismos visibles en la sangre son mucho menos abundantes y aparece la anemia. La gravedad y duración de la anemia son variables en los distintos animales, aunque generalmente esta última es de 1 a 2 meses. Tras la recuperación se pueden producir nuevos ciclos de parasitemia y anemia, con menor gravedad. Probablemente, una vez que el animal adquiere la infección queda infectado de por vida.

Hasta ahora no se conoce bien su patogenia en la infección natural, debido a que este microorganismo aún no se ha podido cultivar in vitro y se mantiene por pasaje en cerdos persistiendo durante años sin provocar manifestación clínica. Aparentemente es el bazo el que realiza el secuestro de los eritrocitos infectados, clarificando el torrente circulatorio. En diversos estudios se ha sugerido que la infección subclínica es frecuente y que el desarrollo de la enfermedad clínica, requiere la presencia de algún otro factor debilitante (esplenectomía, situaciones de estrés por liberación de corticoides endógenos), que ocasione la presencia de bacteriemia con signología clínica (40). Además puede estar asociado a infecciones virales como el síndrome respiratorio y reproductor porcino (SRRP) y la gripe del cerdo. Estas entidades parecen predisponer a la aparición de la enfermedad en la especie porcina. (7)

Se ha demostrado que los artrópodos hematófagos (ej: *Haematophinus suis*), y las agujas e instrumental contaminados con sangre transmiten la enfermedad en los cerdos. (35) La transmisión transplacentaria también constituye una vía importante en los cerdos. (23, 24, 33, 41).

## SIGNOLOGÍA

La anemia en los cerdos recién nacidos acompañada de un bajo índice de viabilidad en la camada y de la afectación de varias camadas

en una misma granja de producción intensiva constituye otra manifestación clínica (3, 8). Los lechones enfermos están pálidos y presentan letargo; dentro de una camada afectada se observa una gran variabilidad en el peso de los recién nacidos.

La anemia aumenta su gravedad entre el nacimiento y el destete. Los cerdos presentan palidez cutánea, intolerancia al ejercicio y una variación considerable en el peso que alcanzan cuando tiene lugar el destete.

Si bien históricamente la enfermedad se consideró una icterooanemia aguda y febril de los cerdos de engorde (42), más recientemente se amplió el rango de edades afectadas y actualmente se reconocen cuatro síndromes:

-Anemia crónica y fallas reproductivas en cerdas, caracterizadas por celos irregulares, muerte embrionaria, abortos y muerte perinatal. Pirexia, anorexia, depresión, disminución en la producción de leche e inadecuada conducta maternal asociada con el estrés del post-parto (39, 42, 43).

-Anemia, ictericia y debilidad en lechones recién nacidos con una susceptibilidad aumentada a enfermedades respiratorias y digestivas (19,35).

-Inadecuada conversión del alimento en las etapas de recría y terminación. (19, 23, 43, 44)

-Anemia, ictericia, debilidad, dificultad respiratoria y muerte en cerdos de recría y terminación (9, 19, 23, 35, 36, 45).

Aunque *M. suis* está ampliamente distribuido en la población porcina, deben estar presentes ciertos factores de estrés para que se desencadene el cuadro clínico. Se considera que existe asociación entre la manifestación clínica por hemoplasmas y la existencia de enfermedades virales, neoplásicas e inmunomediadas. (19, 35, 36).

Recientemente en la Argentina se ha relacionado el *M. suis* con el síndrome multisistémico de adelgazamiento postdestete (SMAP) (25, 33).

## DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la entidad se realiza sobre la base del cuadro epidemiológico, los signos clínicos, los estudios anatomopatológicos, hematológicos y serológicos. Dentro de los estudios hematológicos se incluye el hemograma que consta de los siguientes parámetros: hematocrito, dosaje de hemoglobina, recuento de glóbulos blancos, recuento de glóbulos rojos y frotis sanguíneo teñido con la coloración de May-Grunwald-Giemsa y/o Naranja de Acridina, para la observación del microorganismo y confirmación de la anemia.

Los estudios serológicos utilizados en el año 1975 (14) como la técnica de Hemaglutinación Indirecta (IHA), si bien con ella, se han obtenido títulos de anticuerpos solo persisten durante 2 a

3 meses dando en muchos casos falsos negativos (14, 40).

Hubo muchos intentos por validar técnicas serológicas para la detección de anticuerpos específicos contra *M. suis* sin éxito.

En el año 1999 Messick y col., desarrollaron la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa para la detección de *M. suis*. Con esta metodología se pueden producir en el laboratorio múltiples copias de un fragmento de ADN específico, incluso en presencia de millones de otras moléculas de ADN. Se basa en la actividad de la enzima ADN polimerasa que es capaz de fabricar una cadena de ADN complementaria a otra ya existente (29).

La clave en la PCR cuantitativa es la posibilidad de detectar en tiempo real la amplificación de nuestro genoma de interés. La cuantificación de la fluorescencia emitida durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando. En general para que sea válida esta técnica requiere realizar en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

Actualmente el método de elección para el diagnóstico de *M. suis* por su alta especificidad, sensibilidad y reproducibilidad es la técnica de PCR en tiempo real, debido a que permite también la cuantificación del microorganismo (46, 47). La desventaja de estas técnicas en nuestro país es su alto costo para ser utilizadas en forma rutinaria.

En la actualidad, en la Argentina se está desarrollando y evaluando una prueba de inmunofluorescencia indirecta para detectar la infección en granjas con el objetivo final de estudiar el impacto real del *M. suis* en la producción porcina en nuestro país (48).

## PROFILAXIS

Debido a que la transmisión de esta enfermedad es a través de artrópodos hematófagos como *Haematophinus suis*, de instrumental contaminado con sangre de animales enfermos (agujas, bisturís), son necesarias las siguientes medidas de profilaxis y soporte, que se deberían incluir:

- Control de parásitos externos.
- Higiene del establecimiento.
- Uso de material descartable e instrumental estéril por cada animal en cualquier técnica de manejo utilizada en la granja.
- Incorporación al plantel de animales libres de *M. suis* evaluados por la técnica de PCR.
- Realizar controles hematológicos periódicos (35, 44, 49).

## TRATAMIENTO

Los tratamientos de los casos clínicos se basan en la aplicación de oxitetraciclina a dosis simple LD 25 mg, hierro dextrano 1cc y glucosa (21). Estos son efectivos para reducir el nivel de infección y sus efectos, si bien los cerdos afectados se transforman en portadores (48).

Se aconseja la aplicación de oxitetraciclina inyectable en aquellos animales que presenten signos como: debilidad, palidez, disnea y su administración en la ración para el resto de los animales (50).

## DISCUSIÓN

Si bien el diagnóstico de *Mycoplasma suis* mediante la observación de frotis sanguíneos con la coloración de May Grünwald-Giemsa es de gran utilidad para identificar el microorganismo, por su bajo costo y fácil aplicación, existe limitaciones cuando se presenta la forma subclínica o crónica de la enfermedad, solo se detecta el microorganismo en sangre cuando hay sintomatología clínica.

Nuestro grupo de trabajo está comparando la sensibilidad para detectar *Mycoplasma suis* mediante la observación de un frotis sanguíneo con la coloración de Naranja de Acridina (22, 51) ya que también es de bajo costo y de fácil procesamiento.

Por último esta revisión sugiere el desarrollo y adaptación de la PCR para la detección de *M. suis* en nuestro país. Sería de gran utilidad para conocer la prevalencia en granjas porcinas intensivas como extensivas y su relación con otras enfermedades para evitar las pérdidas económicas en la producción porcina producidas por esta enfermedad.

Actualmente estamos elaborando un protocolo de extracción de ADN de *M. suis* para poder trabajar con la técnica de PCR ya que si bien es más costosa, se puede detectar el microorganismo en animales subclínicos e implementar esta técnica en toda renovación del plantel en la granja (52).

## AGRADECIMIENTOS

Los estudios aquí reportados fueron financiados por el Proyecto: 11v151, dentro del Programa de Incentivos de Investigación, otorgados por la Secretaría de Políticas Universitarias Ministerio de Educación de la Nación. Secretaria de Ciencia y Técnica de la UNLP y el Proyecto PICT 2005-33987, Secretaria de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva. Agencia Científica y Tec-

nológica. Fondo para la Investigación Científica y Técnica.

## BIBLIOGRAFÍA

- 1- Zachary JF, Basgall EJ. Erythrocyte membrane alterations associated with the attachment and replication of *Eperythrozoon suis*: a light and electron microscopic study. 1985; 22:164-170. 1
- 2- Gaunt SD. Hemolytic anemias caused by blood rickettsial agent and protozoa. En: Schalm's. Veterinary Hematology. Ed. Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC. 5<sup>a</sup> Edition, 2000, p. 154-162. 2
- 3- Gwaltney SM. *Eperythrozoon suis* infections in pigs: Clinical syndromes and diagnosis. Swine Health Prod 1995; 3:25-27. 3
- 4- Kloster A, Descarga C, Davies P, Piscitelli H, Díaz L, Zielinski G. Eperythrozoonosis porcina: observaciones sobre la infección natural y experimental. Quinto congreso Argentino de Ciencias Veterinarias; La Plata, Argentina 1985, Abs N° 171.
- 5- Gresham A, Rogers J, Tribe H, Phipps LP. *Eperythrozoon suis* in weaned pigs. Vet. Rec 1994; 134:71-72. 5
- 6- Anziani OS, Ford CA, Tarabla HD. Eperythrozoonosis porcina en la República Argentina. Rev Med Vet 1986;67:99-101.
- 7- Gresham ACJ. *Eperythrozoon* infection in pigs. The Pig J. Proceedings. 1996; 37:20-26.
- 8- Henderson JP, O'Hagan J, Hawe SM, Pratt MCH. Anaemia and low viability in piglets infected with *Eperythrozoon suis*. Vet Rec 1997; 140:144-146.
- 9- Zachary JF, Smith AR. Experimental porcine eperythrozoonosis T-lymphocyte suppression and misdirected immune responses. Am J Vet Res. 1985; 46:821-830.
- 10- Smith A. Eperythrozoonosis. B Straw, WL Mengeling, S D'Allaire, DJ Taylor, eds. Ames: Iowa State University Press, In Diseases of Swine, 7<sup>th</sup> ed 1992; 470-474.
- 11- Brownback, A. 1981. Eperythrozoonosis as a cause of infertility in swine. Vet Med Small Anim Clin 1981; 76: 375-378.
- 12- Splitter EJ. *Eperythrozoon suis* n. sp. and *Eperythrozoon parvum* n. sp, two new blood parasites of swine. Science 1950a) 111:513-514.
- 13- Pereyra N, Sarradell J, Cane F, Francois S, Pidone C, Comba E, et al. Detección de *Mycoplasma suis* en Casos Clínicos de Síndrome del Desmedro Multisistémico Postdestete en porcinos. Rev. Argent. Microbiol. 2006; 38:130-133.
- 14- Smith AR, Rahn T. An indirect hemagglutination test for the diagnosis of *Eperythrozoon suis* infection in swine. Am J Vet Res. 1975; 36:1319-1321.
- 15- Neimark H, Johansson KE, Rikihisa Y, Tully JG. Proposal to transfer some members of the genera *Haemobartonella* and *Eperythrozoon* to the genus *Mycoplasma* with descriptions of "Candidatus *Mycoplasma haemofelis*", "Candidatus *Mycoplasma haemomuris*", "Candidatus *Mycoplasma haemosuis*" and "Candidatus *Mycoplasma wenyonii*". Int. J. Syst Evol Microbiol. 2001; 51:891-899.
- 16- Neimark H. et al. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. Int J Syst Evol Microbiol. 2002; 52:683.
- 17- Johansson KE, Tully JG, Bolske G, Petterson B. *Mycoplasma cavipharyngis* and *Mycoplasma fastidiosum*, the closest relatives to *Eperythrozoon* spp. and *Haemobartonella* spp. FEMS Microbiol Lett. 1999; 174:321-326.
18. Messick JB. Hemotrophic mycoplasmas (hemoplasmas): a review and new insights into pathogenic potential. Vet. Clin: Pathol. College of Veterinary, University of Illinois at Urbana-Champaign 61, USA. 2004; 33 Supl 1:2-13.
19. Hoelzle LE, Adelt D, Hoelzle K, Heinritzi K, Wittenbrink MM. Development of a diagnostic PCR assay based on novel DNA sequences for the detection of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) in porcine blood. Vet. Microbiol. 2003; 93:185-196.
20. Hoelzle LE, Helbling M, Hoelzle K, Ritzman M, Heinritzi K, Wittenbrink MM. First Light Cyclor real-time PCR assay for the quantitative detection of *Mycoplasma suis* in Clinical samples. Journal of Microbiological Methods. 2007; 70:346-354.
21. Hoelzle LE. Haemotrophic Mycoplasmas: Recent advances in *Mycoplasma suis*. Veterinary Microbiology 2008; 130:215-226.
22. Groebel K, Hoelzle K, Wittenbrink MM, Ziegler U, and Hoelzle LE. *Mycoplasma suis* Invades Porcine Erythrocytes. Infection and Immunity. 2009; p.576-584.
23. Machuca MA, Quiroga MA, Armocida AD, Arauz S, Idiart JR; Stornelli MA, et al. Eperythrozoonosis porcina. Descripción de un brote en la provincia de Buenos Aires. Rev Med Vet. 1999; 80(Pt 6):470-474.
24. Pereyra N, Cane F, Pereyra M. Peste Porcina Clásica: incidencia y formas clínicas de presentación. Rev Med Vet. 1990;71:214-218.
25. Pereyra N, Messick J, Cane F, Pereda A, Blum M, Guglielmone A. Prevalencia de la infección por el hemoplasma *Mycoplasma suis* en Argentina. Memorias del XIX Congreso Panamericano de Veterinaria, 2004.
26. Arauz S, Acuña M, Barbera R.M, Scodellaro C, Pintos ME, Stornelli MC, et al. "Mycoplasma suis infection in lactating piglets as a cause of low weight at weaning". III Congreso Latino Americano de Suinocultura. Pork Expo 2006. Foz de Iguazú.
27. Cerdá RO. Micoplasmas. En Stanichi, NO. Microbiología Veterinaria. Ed. Intermédica. Buenos Aires, Argentina, 2007; 43:313-317.
28. Chastel C. Nocard Edmond (1850-1903) and the centenary of the discovery of the first *Mycoplasma* 1898. Hist Sci Med. French, 1999; 33 Supl 4:311-5.
29. Messick JB, Cooper S, Huntley M. Development and evaluation of a polymerase chain reaction assay using the 16r RNA gene for detection of *Eperythrozoon suis* infection. J Vet Diagn Invest. 1999; 11:229-236.
30. Moulder J, Order I. Rickettsiales. In Bergey's. Ma-

- nual of Determinative Bacteriology. Ed. Baltimore: The Williams and Wilkins. 8 th ed. 1974; 882-890.
31. Hall SM, Cipriano JA, Schoneweis DA, Smith JE, Fenwick BW. Isolation of infective and non-infective *Eperythrozoon suis* bodies from the whole blood of infected swine. *Vet. Rec.* 1988; 123:651.
32. Rikihisa Y, Kawahara M, Wen B, Kociba G, Fuerst P, Kawamori F, et al. Western Immunoblot Analysis of *Haemobartonella muris* and Comparison of 16S, rRNA Gene Sequences of *H. muris*, *H. felis*, and *Eperythrozoon suis*. *J. Clin Microbiol.* 1997; 35:823-829.
33. Arauz MS, Pintos ME, Stornelli MA, Stornelli MC, Pereda R, Rodríguez Durán MF, et al. Estudio de la prevalencia de *Eperythrozoon suis* en granjas de producción intensiva de cerdos de la provincia de Buenos Aires. XIV Reunión Científico Técnica AAVLD, 2002, PAR-03, Buenos Aires, Argentina.
34. Hall WF, Weigel RM, Siegel AM, Wiemers JF, Lehman JR, Taft AC, et al. Prevalence of pseudorabies virus infection and associated infections in six large swine herds in Illinois. *J Am Vet Med Assoc.* 1991; 198:1927-1931.
35. Heinritzi K. Eperitrozoonosis. In: Enfermedades del Cerdo. 8° ed. Interamericana, Buenos Aires 1999; 363-367.
36. Perestrelo Vieira R, Heinritzi K, Perestrelo Vieira H, Sobestiansky J, Abreu Lopes JA. Primeiro diagnostico de *Eperythrozoon suis* en Portugal. *Rev Port Cienc Vet.* 1997;92:14-19.
37. Heinritzi K. 1989. *Eperythrozoon* infection in swine as a disease factor. *Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr.* 1989; 102:337-342.
38. Neimark H., Johansson KE, Rikihisa Y, and Tully JG. Revision of haemotrophic *Mycoplasma* species names. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 2002; 52: 683.
39. Smith AR, Cipriano JE, Hall SM. In vitro and in vivo glucose consumption in swine eperythrozoonosis. *Zentralbl. Veterinarmed. B.* 1990; 37: 587-592.
40. Heinritzi K. Eperitrozoonosis. In: Straw, B., D'Allaire, Mengeling WL, Taylor DJ. (Eds.), *Diseases of Swine.* 8th ed. Iowa State University Press, Ames, 1999, p.413-418.
41. Wu J, Yu J, Song C, Sun S, Wang Z. Porcine eperythrozoonosis in China. *Ann N Y Acad Sci.* 2006; 1081:280-285.
42. Henry SC. Clinical observations on Eperythrozoonosis. *J Am Vet Med Assoc* 1979; 174:601-603.
43. Nonaka N, Thacker BJ, Schillhorn van Veen TW, Bull RW. In vitro maintenance of *Eperythrozoon suis*. *Vet. Parasitol.* 1996; 61:188-199.
44. Zinn GM, Jesse GW, Dobson AW. Effect of eperythrozoonosis on sow productivity. *J Am Vet Med Assoc.* 1983; 182:369-371.
45. Cane F, Pereyra, N, Pereyra M. Observaciones sobre la infección natural por *Eperythrozoon suis*. *Memorias II Cong Nac Prod Porc*, 1992, Argentina.
46. Guimaraes AE, Biondo AW, Lara AC, Messick JB. Exploratory study of *Mycoplasma suis* (*Eperythrozoon suis*) on four commercial pig farms in southern Brazil. *Vet. Rec.* 2007; 160:50-53.
47. Gwaltney SM, Hays MP, Oberst RD. 1993. Detection of *Eperythrozoon suis* using the polymerase chain reaction. *J. Vet. Diagn. Invest.* 1993; 5:40-46.
48. Pereyra N, Cane F, Francois S, Comba E, Pidone C, Guglielmone A. 2007. Evaluación de una prueba de inmunofluorescencia indirecta para la detección de cerdos infectados con *Mycoplasma suis*. Congreso Argentino de Microbiología, Córdoba. 10 al 12 de octubre de 2007. Argentina.
49. Kixmoeller M, Ritzmann M, Heinritzi K. 2006. Reference ranges for laboratory parameters in pigs of different breeds. *Prakt. Tierarzt*, 2006; 87:204-213.
50. Mangold A, Volponi M, Guglielmone A. Tratamiento de la Eperitrozoonosis bovina con tilosina: resultados preliminares. Anuario 2000 EEA Rafaela Actas 14as Jorn Nac de Farm y Toxicol Vet. Tandil abril 2002, p.129.
51. Fernández H, Eller G, Paillacar J, Gajardo T, Riquelme A. Toxigenic and Invasive Capacities: Possible Pathogenic Mechanisms in *Arcobacter cryaerophilus*. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Rio de Janeiro, 1995; 90 Supl 5:633-634.
52. Ritzmann M, Grimm J, Heinritzi K, Hoelzle K, Hoelzle LE. Prevalence of *Mycoplasma suis* in slaughter pigs, with correlation of PCR results to hematological findings. *Veterinary Microbiology* 2009; 133:84-91.

## **PRIONES Y ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES: UN RECORRIDO POR SU HISTORIA**

**Pena I del C**

**RESUMEN:** Las enfermedades causadas por priones son un grupo de enfermedades neurodegenerativas, producidas por el metabolismo aberrante de una proteína, que afectan tanto a los animales como a la especie humana. Presentan un prolongado período de incubación, alta transmisibilidad y una evolución clínica fatal y careceden de tratamiento. Se ha utilizado el término de prionopatías para denominarlas y debido a la espongirosis que producen en el sistema nervioso también se les conoce con el nombre de encefalopatías espongiiformes subagudas. En este trabajo se brinda un recorrido a través de la historia de los priones, las enfermedades por ellos inducidas y las diferentes teorías que intentan explicar la etiología de estas patologías.

**PLABRAS CLAVE:** Prion, Encefalopatías Espongiiformes Transmisibles, Historia.

### **PRIONS AND TRANSMISSIBLE SPONGIFORM ENCEPHALOPATHIES: A TOUR AROUND ITS HISTORY**

**ABSTRACT** The prion diseases are a group of neurodegenerative diseases that affect both animals and human species, caused by aberrant metabolism of a protein. They have a long incubation period, high transmissibility and fatal clinical course and lack of treatment. To name them It has been used the term prionopatías, and due to the spongiosis they produce in the nervous system, they are also known as subacute spongiform encephalopathies. This paper provides a tour through the history of prion, the diseases induced by them, and the various theories which try to explain the etiology of these pathologies.

**KEY WORDS:** Prion, Transmissible Spongiform Encephalopathies, History.

Fecha de recepción: 27/04/11

Fecha de aprobación: 30/07/11

---

**Dirección para correspondencia:** Irene Pena, Cátedra de Enfermedades Infecciosas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

**E-mail:** idelcpena@hotmail.com

---

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades causadas por priones son un grupo de enfermedades neurodegenerativas, que afectan tanto a los animales como a la especie humana (1, 2). Presentan un prolongado período de incubación, alta transmisibilidad y evolución clínica fatal. Se ha utilizado el término de prionopatías para nombrarlas y debido a la espongiosis que producen en el sistema nervioso también se les conoce con el nombre de encefalopatías espongiformes subagudas (3, 4).

El término "prion" deriva de "proteinaceous infectious particle", término propuesto por Stanley B. Prusiner (5). Los priones están compuestos principalmente o en su totalidad por una isoforma anormal de una proteína celular normal. Esta proteína priónica celular o *PrPc* (6) está presente en distintos tejidos, como fibras musculares y linfocitos, pero es particularmente abundante en el tejido nervioso. En los sujetos enfermos se observa la presencia de una isoforma anormal, llamada "*scrapie prion protein*" o proteína prión tipo scrapie (*PrPsc*). Esta proteína anormal proviene de la modificación de la proteína normal o *PrPc*. Ambas proteínas difieren en su estructura espacial. La forma patógena (*PrPsc*), a diferencia de la normal (*PrPc*), presenta gran proporción de láminas beta con respecto a las hélices alfa, relación que está invertida en la forma normal *PrPc* (7).

Ambas isoformas también presentan diferencias en su resistencia al ataque por las enzimas digestivas; mientras la *PrPc* es digerida, la *PrPsc* no se ve afectada por los jugos digestivos.

De acuerdo con la hipótesis del prion, la infección comienza con la ingestión o la inoculación de la isoforma aberrante, *PrP\**, la cual promueve la conversión de la proteína normal, *PrPc*, en proteína anormal *PrPsc*. La recién formada proteína anormal produce la conversión de más proteína normal en la isoforma aberrante, disparando una reacción en cadena con acumulación de *PrPsc*. Así la característica principal de este trastorno es el resultado del acúmulo progresivo de la *PrPsc* insoluble en forma de placas amiloides extracelulares durante la evolución de la enfermedad (8, 9). Para una mejor comprensión de la biología de los priones es necesario tener en cuenta dos conceptos importantes: la de barrera de especies y la existencia de múltiples cepas.

El concepto de barrera de especies es definido básicamente por la prolongación del período de incubación cuando el prion es inoculado por primera vez en un nuevo hospedador. La explicación de este fenómeno parece residir en las diferencias moleculares entre la proteína inoculada y la proteína normal del nuevo hospedador. Al principio los priones inoculados reflejan la secuencia del gen de la *PrP* del huésped y no la de la *PrPsc* del inóculo del donante. En los países

subsiguientes, en el hospedador homólogo, el tiempo de incubación se acorta hasta un límite estocástico, determinado por la nueva especie, período que se mantiene constante en los países siguientes. El mejor ejemplo de este fenómeno se obtuvo cuando al inocular ratones transgénicos expresando el gen de la *PrPc* del hámster con una cepa de *PrPsc* pasada previamente en hámster (*PrPscHa*) se observó una disminución en el tiempo de incubación, comparado con el tiempo de incubación de ratones no transgénicos inoculados con la misma cepa *PrPsc* de hámster.

En el transcurso de los experimentos con animales transgénicos se observó una respuesta dosis dependiente en relación con el desarrollo de la enfermedad, así ratones que portaban más de una copia para el gen de la *PrP* del hámster mostraban un incremento de los síntomas y lesiones asociados con la enfermedad priónica, y una reducción en el tiempo de incubación, inversamente proporcional al número de copias del gen. Este hallazgo demostraba que la presencia del gen que codifica para *PrP* es esencial para la presentación de esta alteración, y que la concentración de la *PrPc* que sirve de base para la transformación y acumulación de *PrPsc* juega un rol determinante en el curso de la enfermedad.

El concepto de la existencia de múltiples cepas propone que a pesar de tratarse de agentes infecciosos exclusivamente, o al menos mayoritariamente, proteicos, existe diversidad de cepas, caracterizadas por su período de incubación y las lesiones histopatológicas que generan. En este caso la explicación está basada en la estructura terciaria de las *PrPsc*, donde los patrones de glicosilación y los diferentes sitios de clivaje proteolítico, por ejemplo, muestran suficiente variabilidad para sostener la hipótesis (10).

La sintomatología clínica en general incluye alteraciones nerviosas, incoordinación motora, ataxia, cambios de comportamiento, y, en el hombre, alteraciones mentales seguidas de demencia, insomnio, paraplejas, y parestesias. Una vez aparecidos los primeros síntomas, el desenlace fatal de la enfermedad ocurre en unos pocos meses.

La típica imagen histopatológica muestra astrogliosis y vacuolización o espongiosis del citoplasma de las neuronas, en ocasiones acompañadas por la formación de depósitos amiloides en las formas lentas. En 1980 se estableció que el elemento característico de todas estas enfermedades es la acumulación de una isoforma anormal de la proteína priónica en el tejido nervioso de los sujetos enfermos, tanto animales como humanos (2).

Si bien muchas de estas dolencias se consideraron en un principio como enfermedades degenerativas, su condición de transmisibilidad ha sido probada, hecho que las enmarca dentro



del grupo de las enfermedades infecciosas. Además de su carácter de enfermedad transmisible, es importante mencionar que se pueden presentar de forma esporádica, comprendiendo tanto la transmisión horizontal (individuo-individuo) como vertical (madre-hijo), de forma hereditaria, y existe una predisposición genética. También se ha comprobado el contagio de manera iatrogénica (2, 11, 12).

Las enfermedades priónicas humanas incluyen el kuru, la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob esporádica (sCJD), la ECJ familiar (fCJD), la ECJ iatrogénica (iCJD), la enfermedad de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), el síndrome de Alpers, el Insomnio familiar fatal (FFI), y, más recientemente, la nueva variante de la ECJ (nvECJ o vCJD) (2, 12). Además se han reconocido enfermedades relacionadas con priones en varias especies animales. El Scrapie o tembladera es una enfermedad que ocurre naturalmente en ovejas y cabras caracterizada por un intenso prurito que lleva a que los animales afectados se rasquen intensamente, conducta de la que toma nombre la enfermedad. Otras enfermedades priónicas en animales incluyen la encefalopatía transmisible de visón (TME), la enfermedad de desgaste crónico (ECD/CWD) de mulas, ciervos y alces, la encefalopatía espongi-forme felina (FSE), la encefalopatía espongi-forme bovina (EEB o BSE por su sigla en inglés), y las encefalopatías espongi-formes en el nyala, el ciervo eland, el oryx de Arabia y el kudu, englobadas bajo la denominación de encefalopatías espongi-formes de ungulados exóticos. Estas últimas son de aparición más reciente. La encefalopatía espongi-forme bovina es la de mayor publicidad al demostrarse su transmisión al hombre como vCJD (2, 13, 14, 15, 16, 17).

Se presume que la mayoría de estas enfermedades son resultado de la ingestión de subproductos animales contaminados con la tembladera ovina, aunque la CWD parece ser una enfermedad de origen natural de América del Norte (13).

Hasta el momento no existe tratamiento alguno para estas enfermedades, el manejo de los pacientes es sólo sintomático y de soporte. En el plano farmacológico se están experimentando algunas drogas, hasta ahora sin resultados concluyentes.

El diagnóstico de las EETs en humanos se basa en la historia clínica y los hallazgos EEG típicos (complejos periódicos de alto voltaje y ondas lentas, sobre un fondo de ondas lentas pobremente organizadas). También se encontró atrofia cerebral mediante el estudio de imágenes (TAC / RNM). Dentro de los métodos diagnósticos puede ser útil el inmunoanálisis del líquido cefalorraquídeo buscando PrPsc. Las características patológicas típicas son fundamentales para el diagnóstico, pero para ello se requiere la biopsia

cerebral. La inoculación de muestras del SNC a monos es un método diagnóstico que requiere mucho tiempo y es laborioso.

Recientemente, se ha demostrado que en pacientes con demencia y sin padecimientos agudos del SNC, la detección, por radioinmunoanálisis de la proteína 14-3-3 en el líquido cefalorraquídeo apoya fuertemente el diagnóstico de la CJD (18). De la misma manera, la detección por electroforesis bidimensional en gel de dos proteínas, la p130/131 permite favorecer el diagnóstico de la CJD cuando se suma su detección a los criterios clínicos aceptados (19).

Como no existe tratamiento efectivo alguno, y ante el potencial riesgo zoonótico de la EEB/BSE, la Organización Mundial de la Salud (OMS) ha diseñado las recomendaciones de prevención y control para la misma (20).

Puede decirse que las enfermedades priónicas constituyen el nuevo paradigma en la nosología neurológica. Si bien hasta ahora su incidencia es baja, su carácter transmisible plantea nuevos problemas de salud pública (3, 21, 22).

## HISTORIA DE PRIONES Y ENCEFALOPATÍAS ESPONGIFORMES TRANSMISIBLES

Los primeros registros escritos fiables sobre EET datan del siglo XVIII, en ellos se describe el temblor del cordero, conocido también como prurito lumbar ovino, *scrapie* en Inglaterra, *traberkrankheit des Schafes* en Alemania, o *la tremblante du mouton* en Francia (2, 23).

El *scrapie* fue reconocido formalmente en Inglaterra en 1732. La enfermedad, que afecta a ovejas y cabras, se caracteriza por una ataxia crónica progresiva que llega al punto de impedir a los animales sostenerse en pié, se manifiesta con prurito intenso, pérdida de coordinación de movimientos, y cambios en el comportamiento, y es invariablemente fatal (10, 24, 25, 26).

Recién en 1936 se obtuvo la primera evidencia de que esta enfermedad era producida por un agente infeccioso, cuando J. Cuillé y P. Chelle probaron su transmisibilidad al inocular intraocularmente primero, y luego también por vías intracerebral, oral, subcutánea, intramuscular e intravenosa, extractos de cerebro y homogeneizados de médula espinal de animales enfermos a ovejas sanas, las que desarrollaban la enfermedad. No obstante, desde que se tiene conocimiento de su existencia no hay evidencias de su transmisión al hombre por consumo de productos de ovino, por lo que su importancia era considerada sólo de índole económica y no médico-sanitaria (10, 27, 28).

Estos veterinarios franceses habían desmontado así las teorías que consideraban al *scrapie* como una enfermedad muscular, y proponían

tres conclusiones fundamentales: el temblor de la oveja es una enfermedad infecciosa e inoculable, el agente etiológico está presente en los centros nerviosos (médula y cerebro) y el periodo de incubación es largo, entre 14 y 22 meses. Poco a poco se estaba construyendo una estructura científica novedosa, de la que todavía hoy nos estamos beneficiando (29).

Al comienzo de los años veinte los autores alemanes Creutzfeldt y Jakob, a quienes se atribuye la paternidad de las primeras descripciones de encefalopatías espongiformes publicaron la descripción de algunos pacientes con síndromes neurológicos complejos, de evolución rápida y que aparentemente no correspondían a ninguna entidad de las conocidas hasta ese momento. Estos casos han sido revisados posteriormente por diversos investigadores

En 1920 Hans Gerhard Creutzfeldt publicó el caso de una mujer nacida en 1890 y que falleció en 1913 tras una compleja enfermedad del sistema nervioso, cuya duración probablemente fue de un año y medio. Si bien la existencia de antecedentes de enfermedad neuropsiquiátrica ha planteado alguna duda acerca de si realmente el proceso final pudo ser el último episodio de una enfermedad más larga, sumado a la existencia de trastorno mental en dos hermanas mayores, ha sugerido a algunos autores la posibilidad de un factor genético o familiar. La paciente sufrió deterioro mental progresivo con alteración de la conducta y delirio, trastorno motor incapacitante, mioclonias faciales y braquiales y crisis epilépticas. La autopsia reveló una degeneración extensa pero parcheada de la sustancia gris, con alteraciones neuronales difusas y astrogliosis. Kirschbaum, acepta que el caso de Creutzfeldt pudiera guardar relación con alguno de los publicados por Jakob (30) Richardson en 1977 y Masters y Gajdusek (31, 32) consideraron que el caso descrito por Creutzfeldt podía probablemente ser excluido del catálogo de encefalopatías espongiformes subagudas, sobre la base de los datos clínicos y anatomopatológicos aportados en la descripción original, aunque no arribaron a un diagnóstico alternativo concreto.

Por su parte, Adolf Jakob publicó cuatro casos en 1921 y un quinto en 1923, incluido en un capítulo de una monografía sobre enfermedades extrapiramidales editado por Foerster y Wilmanns (30, 31, 32). Entre los síntomas menciona trastorno mental, vértigo y ataxia, disartria y mioclonias, con un progresivo deterioro neurológico y motor global. Masters y Gajdusek tuvieron la oportunidad de revisar en el Departamento de Neuropatología de la Universidad de Hamburgo las preparaciones originales, excepto las del caso cuarto, perdidas. Estos cinco casos fueron asimismo analizados por Kirschbaum (30). Con criterios actuales, tan sólo los casos tercero

y quinto de Jakob se consideran ejemplos de encefalopatía espongiforme. De hecho, para Masters y Gajdusek, el quinto caso de Jakob, sería el primer caso de "encefalopatía espongiforme transmisible" de la literatura.

En su revisión de las preparaciones originales, que incluyó la retención con eosina, Masters y Gajdusek comprobaron la presencia de una extensa vacuolización del neuropilo en la corteza cerebral y en la capa molecular del cerebelo, característica de las encefalopatías espongiformes. En su descripción anatomopatológica el propio Jakob mencionaba la existencia de degeneración vacuolar en el cortex cerebral, junto a proliferación astrocítica y degeneración neuronal (28, 29).

A partir de esas descripciones iniciales, fueron apareciendo otros casos procedentes en los primeros años del mismo laboratorio de Jakob.

En 1929, Heidenhain describió en dos pacientes un cuadro de demencia rápidamente progresiva en el que la pérdida de visión, de origen cortical, había ocupado un primer plano. En esta variante de Heidenhain las lesiones espongíóticas predominaban en los lóbulos occipitales. Una variedad de enfermedad de Creutzfeldt-Jakob más frecuente es la descrita en 1965 por Brownell y Oppenheimer en cuatro pacientes en los que la enfermedad comenzó por una ataxia cerebelosa progresiva (28, 29).

En 1928, se describió el Síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (GSS), que posee aspectos coincidentes con el CJ pero con una mayor incidencia en pacientes más jóvenes (a partir de los 30 o 40 años), con un carácter familiar o hereditario más marcado, y caracterizado por daños cerebelares (ataxia cerebelosa) y demencia progresiva (22, 29).

En 1957 D. Carleton Gajdusek y Vicent Zigas describieron el primer caso de Kuru, palabra que significa temblor o escalofrío, que alude a los temblores involuntarios que sufrían las personas afectadas. Se trataba de un trastorno neurológico endémico de la etnia Fore, del distrito de Okapa de la provincia de las Tierras Altas del Este en Papua-Nueva Guinea y que presentaba unos niveles de incidencia sorprendentemente elevados, cifrados en aproximadamente un 1 % de la población total, aunque en determinados clanes podía sobrepasar el 5 %. Los casos más frecuentes de esta enfermedad se daban a edades tempranas, especialmente en mujeres menores de 40 años y en niños, más que en sujetos de edad madura o avanzada (33). El mantenimiento del Kuru en la población de los Fore con incidencias tan altas fue la consecuencia de los rituales funerarios de los nativos, que incluía la práctica del canibalismo como prueba de respeto hacia los difuntos en la creencia de que la sabiduría, destreza y cualidades de estos pasaban a quienes

ingerían sus restos. La preparación de los cuerpos correspondía a las mujeres, y las vísceras internas, el cerebro incluido, eran ingeridas de forma predominante por las mujeres y niños, lo que explicaba su mayor proporción de casos. Al cesar esta práctica, cesó también el contagio. Por sus investigaciones y esfuerzos en el control de la enfermedad, Gajdusek recibió el Premio Nobel de Medicina y Fisiología en 1976 (34, 35).

Se sospecha que el origen de la enfermedad pudo estar, quizá, en la aparición de un caso esporádico de CJ en un miembro de la tribu a finales del siglo XIX, quien transmitió la enfermedad al resto de la etnia al fallecer. Aunque al terminar la década de 1980 se considera prácticamente desaparecida, ha proporcionado importantes pruebas acerca de los mecanismos de transmisión de las EET. El último de los casos conocidos falleció en 1999 habiendo tardado alrededor de cuarenta años en desarrollar la enfermedad (11). Por su sintomatología y por las características patológicas de la enfermedad, el neuropatólogo I. Klatzo estableció en 1957 la primera semejanza entre Kuru y CJ, y en 1959 William J. Hadlow puso de manifiesto la relación entre *scrapie* y Kuru (36, 37, 38).

Estudios posteriores probaron que el agente infeccioso era capaz de contagiarse por inoculación intracerebral. Entre 1965 y 1968 D. C. Gajdusek demostró la transmisibilidad del Kuru al inyectar extractos contaminados a chimpancés, que tras un largo período de incubación, de hasta 30 meses, desarrollaban la enfermedad (39). De forma casi simultánea Gibbs y colaboradores (40) contagiaron la enfermedad de Creutzfeldt-Jacob (CJD) a chimpancés. La demostración de la transmisibilidad de estas enfermedades se completaría en años posteriores con la transmisión del síndrome de Gerstmann-Sträussler-Scheinker (41).

El Insomnio Familiar Fatal (IFF), es la EET identificada más reciente, ha sido descrita en Italia por Lugaresi en 1986. Se le conoce también como demencia talámica por las características clínicas que presenta. La enfermedad se transmite con un patrón autosómico dominante. Los rangos etáreos de los pacientes afectados van de los 35 a los 61 años. La enfermedad se caracteriza por insomnio, disautonomía y por alteraciones motoras, del estado mental y hormonales. Como se desprende de lo anteriormente expuesto, el IFF ataca preferentemente a los núcleos anterior y mediodorsal del tálamo. La muerte suele ocurrir al año (rango de 5 a 25 meses) (42, 43).

En 1974, quedó en evidencia la naturaleza infecciosa de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob cuando Duffy y col. comunicaron el caso de una mujer fallecida de una enfermedad de Creutzfeldt-Jakob dos años después de recibir un trasplante de córnea procedente de un donante en quien se pudo demostrar la enfermedad. En

los años siguientes fueron apareciendo en la literatura otros mecanismos de contagio accidental, lo que contribuyó a iniciar el legendario temor frente a estas enfermedades. Posiblemente un factor iatrogénico haya podido estar presente en otros casos previos, contagiados a través de intervenciones neuroquirúrgicas con instrumental contaminado (44).

Anteriormente, durante 1947, se detectó por primera vez en Estados Unidos una enfermedad que afectaba los visones de peletería. Estos animales sufrían cambios en su comportamiento, con cuadros de excitabilidad acentuada y pérdida de coordinación; finalmente morían, presentando manifestaciones histológicas semejantes al *scrapie*. Se trataba de la Encefalopatía transmisible del visón (Transmissible Mink Encephalopathy o TME), posteriormente descrita en los años '60. Por su similitud con el *scrapie*, hay autores que sospechan que la causa del primer brote pudo ser la alimentación con restos de ovejas enfermas. No obstante, aunque la transmisión mediante inoculación intracerebral fue demostrada, no se ha conseguido la transmisión de la enfermedad por vía oral (45, 46). Sin embargo, los últimos brotes aparecidos a mediados de la década de 1980, en los que parte de la alimentación suministrada a los animales enfermos tenía productos procedentes de vacas y caballos pero no de ovino, hicieron dudar de este origen. Posteriormente se comprobaría el contagio tanto por inyección intracerebral como por ingestión a partir de restos de vacuno que padecía la EEB (11). A finales de la década de 1960 se describió la Enfermedad causante del debilitamiento crónico en el ciervo salvaje (Chronic Wasting Disease o CWD). Sus principales manifestaciones consistían en un debilitamiento general, pérdida de peso, salivación excesiva y cambios en el comportamiento. Su distribución se limita prácticamente a Estados Unidos, afectando a diversas especies de ciervos y al alce (47).

En 1966 Alper y otros investigadores comunicaron que diversas pruebas experimentales realizadas con el fin de inactivar al agente infeccioso del *scrapie* mediante la aplicación de radiaciones ultravioleta a dosis apropiadas para provocar la desnaturalización de los ácidos nucleicos, no aportaban los resultados esperados y parecían indicar la carencia de dichos ácidos, por lo que la naturaleza del agente en estudio podría ser puramente proteica. En 1967 Griffith propuso que el agente podría ser una proteína capaz de autorreplicarse utilizando mecanismos existentes en las células del hospedador (48, 49, 50).

Estas conclusiones fueron acogidas con bastante escepticismo por la comunidad científica, fundamentalmente porque contradecían el dogma central de la biología. Por aquellos años las explicaciones más aceptadas eran aquellas

que postulaban la presencia de un tipo especial de virus de muy pequeño tamaño cuyo material genético estaría bien protegido gracias a una envoltura proteica peculiar.

En este contexto, en el año 1979 Dickinson y Outram acuñaron el término "virino" para describir a este nuevo tipo de virus que provocaba una infección lenta (por lo que se denominaron "virus lentos" o "slow viruses") (51).

Ya en 1954 Sigurdsson había propuesto el concepto de infecciones lentas a partir de su experiencia en el estudio de dos enfermedades ovinas, maedi y *scrapie* (10, 52).

Este investigador islandés estableció tres criterios provisionales, aceptando que serían modificados a medida que se dispusiera de nuevos conocimientos, ellos son: periodo de incubación muy largo, de meses o años; curso clínico prolongado con desenlace generalmente fatal, y enfermedad limitada a una sola especie y a un solo órgano (29). La presencia de los virinos no pudo demostrarse ni por microscopía electrónica ni por pruebas bioquímicas, no obstante el modelo explicaba satisfactoriamente el hecho de que la infectividad del *scrapie* y las EET parece depender de la actividad de las cepas, que en las diversas pruebas de transmisión realizadas en laboratorio (como la inoculación intracerebral de homogeneizados de tejidos nerviosos de animales enfermos a animales sanos) muestran diferentes periodos de incubación. (11,29). Al final de la década de 1970, Prusiner retomó las ideas de Alper y Griffith, e introdujo un nuevo concepto absolutamente novedoso que prescindía de los postulados de Koch (29). Prusiner propuso que una fracción proteica estaba en el corazón del origen de estas enfermedades e introdujo, en 1982, el término *prion* (*Novel proteinacious infectious particle*) para enfatizar su naturaleza tanto proteica como infecciosa. El prión sería en último término el responsable de la transmisión de las EET y su característica principal es la resistencia a los intentos de desnaturalización realizados mediante agentes que dañan ácidos nucleicos (nucleasas, radiaciones ionizantes, radiaciones ultravioleta, etc.) (53, 54).

En 1981 Merz y col. detectaron la presencia de fibrillas anormales de naturaleza amiloide en cerebros infectados de *scrapie*. Este hallazgo se consideró como la primera evidencia morfológica del agente infeccioso (55).

En 1983 Prusiner aisló por primera vez un prión en el cerebro de hámsters infectados y pudo ver que formaba agregados fibrilares de naturaleza similar a las fibras de proteína amiloide halladas por Merz en 1981. El prión resultó ser una proteína con un peso molecular de entre 27-30 kDa que se acumulaba en los cerebros infectados por las EET, y con la capacidad de formar placas amiloides (56).

A través de la secuenciación de los aminoácidos constituyentes, se logró la secuencia del fragmento de ADN que codificaría para dicha proteína priónica. Sorprendentemente, en 1985 Prusiner y su equipo detectaron mediante estudios realizados en hámster que dicho gen formaba parte del ADN normal de la célula huésped. Este hecho se confirmó después en el ratón, lo cual provocó serias dudas en lo referente a su consideración como el agente infeccioso causante de la enfermedad. (57).

En contra del dogma central de la biología, hasta entonces universalmente aceptado, que establece que la secuencia de aminoácidos determina en última instancia la estructura terciaria de las cadenas peptídicas para una proteína concreta, los análisis indicaron que parecían existir dos versiones de la misma proteína, ambas con idéntica secuencia de aminoácidos pero con propiedades bioquímicas diferentes. Mientras la forma del prión clasificada como normal (*PrPc*) era digerida por la acción de determinadas proteasas, la forma anómala o patógena (*PrPsc*) era parcialmente resistente, lo que explicaba por qué se acumulaba en los tejidos nerviosos del encéfalo llegando incluso a formar microplacas amiloides. De hecho, el peso molecular real de la proteína prión era de 33-35 kDa, el tratamiento mediante proteinasa K degradaba completamente a la forma *PrPc*, pero sólo era capaz de acortar la *PrPsc*, que pasaba a pesar 27-30 kDa. Esto se explicaría debido a que, si bien ambas formas de la proteína compartían la misma secuencia de aminoácidos (estructura primaria), mediante mecanismos todavía hoy no totalmente comprendidos podría producirse una transformación de determinados tramos de la estructura secundaria de la forma normal (el primer nivel de plegamiento real de la secuencia de aminoácidos, en forma de hélices alfa o cadenas beta) lo que a su vez afectaría a la estructura terciaria de la proteína (el plegamiento sobre sí mismo de la estructura secundaria debido a fuerzas hidrofóbicas-hidrofílicas, puentes de hidrógeno, puentes disulfuro, etc.).

La estructura secundaria de *PrPc* es mayoritariamente helicoidal (hélices alfa) mientras que la formación de la variante patógena, *PrPsc*, conlleva un aumento del contenido en estructuras extendidas (láminas beta). Así mientras que *PrPc* tiene aproximadamente un 42 % de hélices alfa (más compactas) y un 3 % de láminas beta, *PrPsc* tiene un 30 % de hélices alfa y un 43 % de láminas beta. Los esfuerzos realizados para lograr la tipificación del agente causal de las EET se vieron sin duda acelerados por la aparición de nuevas enfermedades de este grupo en el ganado bovino y el hombre. En los primeros meses de 1985 la Encefalopatía Espongiforme Bovina (EEB) (Bovine Spongiform Encephalopathy o BSE) más conocida pública-

mente como la enfermedad de las vacas locas, se observó por primera vez en un animal de una granja en West Sussex, al Sudoeste de Londres, Inglaterra. El animal presentaba movimientos anormales y temblores, ataxia locomotora, pérdida de peso y alteración del estado general con cambios en su comportamiento, presentándose más agresivo. En el transcurso de un año, otros animales de la misma granja presentaron signos idénticos, al mismo tiempo iban apareciendo nuevos casos en otras zonas. En pocos años, la magnitud del contagio llegó al rango de epidemia. Si bien la naturaleza infectiva de las EET ya se conocía, la hipótesis del prión no era aún unánimemente aceptada, y se consideraba tan solo uno más de los modelos propuestos hasta la fecha. Por ello, aunque se identificó su presencia en homogeneizados de cerebro de vacas enfermas a finales de 1987, hubo que esperar a nuevas pruebas para que la comunidad científica reconsiderase su postura (58).

Las primeras comprobaciones de que el agente causal poseía características de transmisibilidad semejantes al resto de las EET no fueron fáciles de hallar. Los experimentos de inoculación de extractos en hámster, dentro de la metodología normalmente empleada para la confirmación de *scrapie*, no resultaron efectivos. Las pruebas con ratones no comenzaron hasta finales de 1987 y los resultados tuvieron que esperar a finales de 1988 tras un periodo aproximado de 290 días después de la inoculación, para el desarrollo de la enfermedad. Experimentos realizados posteriormente confirmaron los resultados obtenidos (59).

En tanto a mediados de 1987 John Wilesmith, director del Departamento de Epidemiología del Laboratorio Central Veterinario del Reino Unido inició el estudio epidemiológico de esta nueva enfermedad. Luego de una exhaustiva investigación, en la que se recogieron datos referentes al empleo de hormonas, vacunas, tratamientos médicos, uso de herbicidas y pesticidas, etc., se llegó a la conclusión de que el único factor común presente en las granjas que tenían animales enfermos detectados hasta la fecha era la utilización de piensos y suplementos alimenticios elaborados con harinas animales fabricadas a partir de restos de ganado porcino, vacuno, ovino y aviar. Sus conclusiones se publicaron en diciembre de 1988 (60, 61).

Durante el mismo año surgieron nuevas descripciones de EET en rumiantes de parques zoológicos y reservas que también habían sido alimentados con este tipo de piensos. El número conocido de especies afectadas creció en poco tiempo, dándose casos en ñalás (*Tragelaphus angasi*), cudúes mayores (*Tragelaphus strepsiceros*), órices del Cabo (*Oryx gazella*), órices de Arabia (*Oryx leucoryx*), órices blancos (*Oryx dammah*),

elanes del Cabo (*Taurotragus oryx*) y bisontes (*Bison bison*) (15, 62).

Las conclusiones de ese y otros estudios epidemiológicos, reafirmadas por la detección de la enfermedad en las especies exóticas de rumiantes indicadas, indicaron que la enfermedad se habría originado a finales de la década de 1970 o principios de 1980 en unos pocos animales, seguramente debido al empleo de restos de ovejas contaminadas con *scrapie* en las harinas utilizadas como alimento. Tras un periodo de incubación de 3 o 4 años, estos sirvieron a su vez como material infectivo al incorporarse a la cadena de procesamiento para la obtención de harinas animales, repitiéndose el ciclo hasta que en 1988 se dictaron normas para impedir la alimentación de rumiantes con proteínas procedentes del despiece de animales de este mismo grupo.

Por ese entonces, ya se conocía el gen que codifica para ambas formas de la proteína prión en el hombre, que se encuentra en el cromosoma 20. La región con la información efectiva es sólo de unos 759 pares de bases, que codifican los algo más de 250 aminoácidos que forman la proteína prión (257 en el visón, 254 en ratones y hámsters, y 253 en el hombre), una glicoproteína que tiene una única cadena. Aunque la expresión del gen ocurre en cantidades más altas en los órganos nerviosos, no es exclusiva de estos, encontrándose en multitud de localizaciones como corazón, hígado, páncreas, etc. La función de la proteína resultante no está clara. Se piensa que podría tener un papel en la regulación del catión cobre (12, 22, 63).

En 1989 se descubrió la primera de las mutaciones conocidas en ese gen, presente en enfermos de GSS. Posteriormente se han identificado más de 20 mutaciones en pacientes con distintos tipos de EET consideradas como variedades familiares (CJ, GSS, o el Insomnio Familiar Fatal). El presentar un carácter hereditario, unido al hecho de que se expresan a edades maduras o tardías provoca que estas enfermedades puedan pasar a la descendencia. Las mutaciones, presentes en las variedades familiares de las EET, no se han encontrado en las formas más habituales, denominadas históricamente como esporádicas o dispersas (64).

En 1990, en Inglaterra se diagnosticó el primer caso de Encefalopatía espongiiforme felina en un gato doméstico (Feline Spongiform Encephalopathy o FSE), aunque hasta 1994 no se hizo oficial la existencia de una nueva encefalopatía espongiiforme que afectaba a felinos. En los años sucesivos se han registrando bastantes más casos distribuidos por el Reino Unido, así como en tigres, pumas, guepardo, leones, etc., mantenidos en zoológicos (65, 66, 67).

También en la década de los '90 el modelo viral vuelve a escena de la mano de Narang y

## I. Pena

otros investigadores. Narang en 1990 anunció la detección, mediante microscopía electrónica, de estructuras que contenían cadenas sencillas de ADN, a las que llamó "nemavirus", lo cual confirmó en 1998 mediante nuevos experimentos. Sin embargo, dichas experiencias no han podido ser repetidas por otros grupos (68, 69).

L. Manuelidis junto con otros autores, sostiene que la transmisión por vía oral de las EET cuenta con elementos similares a la de otros virus. Un agente puramente proteico tendría dificultades en resistir los procesos digestivos, mientras que muchos virus son capaces de sobrevivir a estas condiciones. En esta línea de investigaciones, H. Diringer anunció en 1994 el descubrimiento de lo que en su opinión eran evidencias de virus extremadamente pequeños (70).

En tanto en 1992 la incidencia de BSE alcanzó a unos 170.000 animales infectados en el Reino Unido, fecha a partir de la cual su número descendió. El desfase entre la aplicación de las medidas y la disminución de casos se produjo debido al prolongado periodo de incubación de la enfermedad. El hecho de que la enfermedad estuviese restringida al Reino Unido hasta 1989, hizo pensar que o bien la conversión *scrapie*-BSE se produjo también en esa nación, o que quizá los cambios introducidos en los mecanismos industriales de elaboración de harinas animales en la década de 1970 y principios de la de 1980 eran los responsables de la misma (descenso de la temperatura de producción y eliminación de la extracción de sustancias grasas mediante cierto tipo de disolventes hidrocarbonados). Esta última hipótesis fue durante mucho tiempo considerada como un factor importante, pero en la actualidad se cree que ha sido sobre valorada, ya que los mismos mecanismos de producción han sido adoptados en diversos países en donde no se desarrolló la enfermedad inicialmente. Otros datos, extraídos de pruebas sobre resistencia del prión a los distintos métodos de esterilización, se encuentran en esta misma dirección, al concluir que en esas fechas los procedimientos industriales de elaboración no eran completamente seguros a la hora de inactivar el prión, pero que esta circunstancia no era exclusiva del Reino Unido. A finales de la década de 1980 el problema era ya considerado muy serio. Sin embargo, la situación se agravó cuando se detectó que el hombre también podía contraer la enfermedad si comía productos de vacunos contaminados. Aunque a finales de la década de 1980 parecía clara la relación entre EEB y *scrapie*, nunca se habían documentado casos de contagios directos de *scrapie* a humanos (71).

En 1994, mediante estudios realizados con ratones transgénicos, en los que el gen normal del prión fue reemplazado por el gen anómalo presente en determinados casos de GSS, se pudo

comprobar que los animales desarrollaban la enfermedad (72).

La naturaleza no exógena del agente infeccioso, explicaría la falta de respuesta inmune observada en las EET. No existe certeza de cual es el mecanismo que regula o provoca la conversión entre las formas normales y patógenas del prión. Según la teoría del prión o de las partículas proteicas propuesta por Prusiner, y por la que fue galardonado con el premio Nobel de Medicina en 1997, *PrPc* sufriría un cambio de conformación, ya sea espontáneamente o por contacto con *PrPsc*, que le conferiría la resistencia a los procesos degradativos normales de la célula, razón por la cual se acumularía en los tejidos del huésped. Dicho cambio conformacional requeriría de la intervención de una proteína del huésped, denominada proteína "X", que actuaría como chaperona (73, 74).

Otros autores piensan que tanto *PrPc* como *PrPsc* podrían ser constituyentes normales en sus formas monoméricas. *PrPc*, proteína altamente hidrofóbica, podría en un momento dado cambiar de fase para formar un cristal de *PrPsc* infeccioso, que sería responsable de la resistencia a la degradación enzimática. Este cristal actuaría como núcleo o germen al que se incorporarían nuevas moléculas idénticas. El cristal podría romperse, permaneciendo dentro o fuera de la célula, y dando origen a nuevos núcleos de crecimiento. Este hecho explicaría la ampliación de *PrPsc* sin necesidad de ácidos nucleicos. Este es el modelo de "crecimiento por núcleos" o "nucleación", también conocida como teoría cristalina (75).

Acercándose a la hipótesis vírica, C. Weissmann ha propuesto un "modelo unificador" o "teoría del holoprión". Esta hipótesis postula que el agente etiológico de las EET podría ser una molécula quimérica constituida por una proteína codificada por el hospedador y un ácido nucleico no codificante, propio del agente infeccioso. Así el ácido nucleico estaría protegido y camuflado por la proteína del huésped. Los dos componentes de esta molécula quimérica son el apoprión, que sería la forma *PrPsc* de la proteína, capaz por sí sólo de provocar la enfermedad, y el coprión, que sería probablemente un ácido nucleico que portaría la información que al ser expresada, determinaría en última instancia, las propiedades características de los diferentes linajes o "cepas" de agentes infecciosos (76).

En 1995 Bateman y Britton describieron los primeros casos conocidos de una nueva variante de la enfermedad de Creutzfeldt-Jakob (nvCJ). Esta presentaba la peculiaridad de desarrollarse a edades bastante más tempranas (una media de 30 años frente a los 60 del CJ tradicional) así como un desarrollo sensiblemente más largo (más de una año de media frente a medio año en CJ tradicional). En 1996 Will e Ironside describieron 10 casos más

(la enfermedad fue llamada también síndrome Will-Ironside). En 1997 estos autores demostraron que la nueva variante estaba causada por EEB (77, 78, 79). Se había traspasado la barrera de especies.

También durante 1995 Byron W. Caughey y Peter T. Lansbury informaron que la forma normal *PrPc* podía convertirse en la forma anómala *PrPsc in vitro* si ambas se mezclaban (80).

Desde 1985 se produjo el fallecimiento de aproximadamente 100 enfermos humanos en Francia, Estados Unidos y Reino Unido. Ellos habían sido tratados años atrás con hormona de crecimiento extraída a partir de la glándula pituitaria de cadáveres, algunos de los cuales pertenecían a su vez a enfermos que habían padecido CJ, lo que brindó nuevas pistas que indicaban la capacidad de transmisión del CJ en una variante denominada CJ iatrogénico. A estos casos se le sumaron varios fallecimientos de pacientes tratados con injertos experimentales de duramadre, trasplantes de córnea, etc., también contaminados. Desde entonces también se ha confirmado la vía de transmisibilidad de las EET a otras especies animales mediante la ingestión de piensos con harinas animales y/o restos frescos contaminados (11, 12).

Entre los principales desafíos que plantean las EET a la salud pública, se encuentran por un lado, diseñar un tratamiento adecuado, y por el otro hallar una prueba diagnóstica confiable y que se pueda emplear *in vivo*.

Debido al proceso de neuroinvasión por el cual los priones migran desde el sitio de inoculación, por ejemplo, el aparato digestivo (ingesta de derivados bovinos contaminados con BSE), hasta el SNC, donde causan la sintomatología y la alteración histológica clásica de estas enfermedades, las medidas terapéuticas que se basen en la interrupción de este proceso son de vital importancia ante la sospecha de la existencia de personas infectadas por BSE, que se hallen en el periodo de incubación (2).

Los datos existentes actualmente sugieren que la invasión por el prión se produce en dos etapas. La primera de ellas, linfoinvasión, comprende el pasaje a través de la mucosa gastrointestinal, aparentemente a nivel de las placas de Peyer del intestino, probablemente a través de las células M. Las células linfáticas que endocitan al prión, viajan a otros órganos como el bazo, las tonsilas o los linfonódulos. En esos órganos bien inervados, se produce la primera replicación de la isoforma anormal *PrPsc*. Para que la infección desde los tejidos periféricos tenga éxito, estos deben expresar el gen *PrP*. En una segunda etapa, neuroinvasión, la *PrPsc* asciende retrógradamente por los axones que inervan a estos órganos linfáticos, alcanza la médula espinal para llegar finalmente al encéfalo. Si bien los datos sobre esta etapa no son muchos, se ha demostrado la utilización de los nervios del

sistema nervioso autónomo para la propagación del prión (81, 82).

También se sabe que ambas etapas, linfó y neuroinvasión, dependen de la presencia de linfocitos B (83). Postulándose que su función principal es el mantenimiento de las células dendríticas foliculares del bazo y de los linfonódulos, por la producción de la linfotóxina- $\beta$  (84) y la supresión de la producción de la linfotóxina- $\beta$  detiene la patogénesis periférica del prión (85). La entrada de los priones en las células dendríticas está facilitada por factores del sistema del complemento (86).

Así la comunidad científica dirige sus esfuerzos para encontrar un medicamento que cumpla con el principio farmacológico de traspasar la barrera hematoencefálica y sea capaz de impedir la conversión de la proteína priónica normal en proteína anormal. Con estos fines ya han sido utilizados ciertos tipos de drogas empleados en el tratamiento de enfermedades neurológicas, como por ejemplo derivados de la quinacrina y la clorpromazina, utilizados en el tratamiento de la malaria y la esquizofrenia, respectivamente, pero sin resultados concluyentes.

Estudios recientes *in vitro* han indicado que los anticuerpos monoclonales anti-*PrP*, con escasa o nula afinidad por la *PrPsc*, pueden prevenir la incorporación de *PrPc* a los priones infectantes. Estos estudios mostraron un resultado similar *in vivo*. Estos hallazgos son esperanzadores y señalan a las estrategias inmunoterapéuticas en humanos como una posibilidad de tratamiento para las enfermedades por priones (87).

No existe actualmente un tratamiento que cure, mejore o controle las manifestaciones clínicas de estas enfermedades. Además de los ensayos con las drogas mencionadas y con anticuerpos monoclonales en modelos animales, se han probado la amantadina, los esteroides, el interferón, el aciclovir, diversos agentes antivirales y antibióticos; sin embargo, ninguno ha demostrado claramente su eficacia (88).

En 1996 se descubrió la existencia en el líquido cefalorraquídeo de un marcador proteínico llamado 14-3-3, fue hallado tanto en animales afectados por EET como en pacientes humanos. Actualmente la detección de esta proteína proporciona un diagnóstico probable de la enfermedad, pero no definitivo, tiene la ventaja de que es una de las pocas pruebas ante-mortem existentes (89).

Otra vía de estudio consiste en buscar la obtención de anticuerpos que sean capaces de discriminar entre las formas *PrPc* y *PrPsc* a partir de homogeneizados de los tejidos presumiblemente infectados. En 1997 se consiguieron anticuerpos monoclonales que podían utilizarse para la detección de la forma *PrPsc* y diferenciarla de la *PrPc*. Los denominados 15B3 y 6H4 fueron

los primeros. Con posterioridad, su número ha ido incrementándose (90).

La utilización de estos anticuerpos se realiza normalmente en técnicas de detección por inmunoensayo, entre los que se destacan: el *Western Blotting* (SDS-PAGE) basada en la detección del fragmento proteinasa-K-resistente de la conformación patógena del prión (27-30 *PrP*-Sc), utilizando el anticuerpo 6H4 como marcador; y el ELISA (enzimoinmunoanálisis/ Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) que utiliza anticuerpos policlonales (11).

Queda claro que un punto fundamental a resolver es impedir que la proteína *PrPc* normal se transforme en *PrPsc* patológica. En este sentido el debate vuelve a intensificarse a partir del siguiente planteo realizado por Chiesa y Harris:

1. Se ha comprobado la presencia de *PrPsc* sin síntomas clínicos ni alteraciones histopatológicas de encefalopatía espongiforme aguda.

2. Ocasionalmente se ha observado el cuadro clínico y el complejo neuropatológico de encefalopatía espongiforme subaguda con *PrPsc* escasa o indetectable de ratones inoculados con *scrapie* y con encefalopatía espongiforme bovina.

3. Ratones inoculados con priones de hámster adquieren niveles altos de *PrPsc*, degeneración esponjosa y placas amiloides en cerebro, pero no expresan síntomas clínicos.

4. En enfermedades priónicas familiares parece no ser necesaria la presencia de *PrPsc* para desarrollar la enfermedad.

Ante estas evidencias puede ser lógico pensar que bajo ciertas circunstancias celulares, que impliquen situaciones de estrés celular, capaces de llevar a un desbalance energético, la *PrPc* modifica su nivel energético para ser más eficiente y mantener su estabilidad, ya que la capacidad de guardar información conformacional que poseen los priones los convierten en candidatos para participar en procesos celulares que demandan estabilidad durante largos períodos (formación de la memoria a largo plazo, la memoria inmunológica y la evolución del genoma de muchos organismos). Debido a que los priones son menos susceptibles a la digestión de las proteasas es muy probable que se trate de mecanismos celulares fisiológicos (22).

Otro avance científico más que interesante puede resultar de algunos estudios actuales en los que se ha encontrado similitud de estas afecciones con la enfermedad de Parkinson, la esclerosis lateral amiotrófica y la enfermedad de Alzheimer. Esta relación se basa en que en estas enfermedades hay casos esporádicos y familiares (12).

En la enfermedad de Creutzfeldt – Jacob y en la de Alzheimer aparece un cambio en la configuración espacial de la proteína priónica en

la primera, y de la beta – amiloide en la segunda. Se ha observado también una variante vascular de la proteína priónica, caracterizada por la presencia de ovillos neurofibrilares intraneuronales que resultan de la manifestación fenotipo de una mutación en el codón 145 del gen PRNP. En la enfermedad de Alzheimer, la apolipoproteína E podría incidir como un chaperón molecular respecto a la proteína A<sub>4</sub> de la beta – amiloide y modificar su plegamiento (22).

Pero no solamente en animales y en el hombre están presentes los priones, en la década de los ´70s también fueron descubiertos en hongos y levaduras, pero recién en 1994 fue utilizada la teoría de los priones para explicar su naturaleza. Los priones de las levaduras son elementos citoplasmáticos hereditarios que representan una forma alterada de una proteína normal, la que asume una nueva estructura y función, confiriendo a su vez un nuevo fenotipo a la célula que los porta. Son considerados infecciosos en el sentido de que pueden ser transmitidos cuando las levaduras se reproducen por vía sexual. Posteriormente se han identificado otros posibles candidatos a priones en varios microorganismos, e incluso se ha sugerido que algunas funciones celulares normales, tales como la diferenciación y el desarrollo, podrían explicarse a través de la teoría priónica. (10, 91).

## CONCLUSIONES

A lo largo de la historia del conocimiento sobre los priones se puede ver que la ciencia ha transitado un largo camino, con marchas y contramarchas, dejando más interrogantes que certezas, en este sentido indagar en la historia de las EETs, patologías que son a la vez antiguas y emergentes, resulta muy enriquecedor ya que nos recuerda claramente que el conocimiento es provisional, lo que hoy tenemos como verdad cuasi dogmática, mañana puede ser considerado incorrecto.

Al final de la introducción de este trabajo decíamos que las enfermedades priónicas constituyen el nuevo paradigma en la nosología neurológica. Según el filósofo estadounidense Thomas Kuhn (1922 - 1997) en su libro “La estructura de las revoluciones científicas” (92), hay un cambio de paradigma cuando aparece una teoría revolucionaria, que contradice todos los conceptos válidos hasta entonces, y no es posible pasar de lo viejo a lo nuevo sin transición porque no se logra describir completamente lo nuevo empleando el vocabulario de lo viejo, y viceversa. En ese marco pueden encuadrarse las teorías del prión, del virino, del nemavirus o del holoprión, que intentan explicar el origen de las EET. Así la teoría del prión en particular es emblemática porque contradice los dogmas de la biología molecular, por un lado la tríada proteína-ADN-ARN, y por



otro lado la firme creencia, hasta la aparición del prion en escena, de que toda enfermedad infecciosa transmisible debe estar producida por agentes etiológicos con material genético, incluso pone en jaque a los postulados de Koch.

Por su parte Imre Lakatos (1923- 1974), filósofo húngaro (93), sostenía que lo que sucede en la historia de la ciencia, es que un programa de investigación progresivo sustituye a uno regresivo, y que el valor de una teoría radica en su poder de predicción de los hechos, también decía que es bueno trabajar con dos o más programas de investigación científica en paralelo, no necesariamente tiene que existir una sola teoría que explique el fenómeno. De hecho desde la aparición de los priones están conviviendo varias teorías. En consonancia con esto, hoy la teoría del prión es la que cuenta con mayor aceptación, presenta más posibilidades de ampliación de conocimientos y de predicción de los hechos, sería una teoría progresiva, va adelante de los hechos, si bien no podemos descartar de plano el resto de las teorías mencionadas porque la teoría del prión no siempre resulta pertinente a la hora de explicar y predecir algún comportamiento del agente causal de la BBS.

Entre las dudas que nos deja este recorrido por la historia de los priones y las enfermedades por ellos inducidas, está la posibilidad de que una proteína sea el agente etiológico de enfermedades infecciosas transmisibles. Como vimos a lo largo de este trabajo, algunos investigadores piensan que la proteína prión se acompaña de pequeños fragmentos de un ácido nucleico aún por descubrir; otros creen que la proteína prión hace que el individuo sea susceptible a la infección por un segundo agente, por ejemplo un virus, quien sería el real causante la enfermedad. Así, el desarrollo de la enfermedad por un gen mutante que codifica la proteína prión en ratones transgénicos es un argumento a favor de la teoría del prión, pero los intentos por transmitir la enfermedad con extractos de cerebro de ratones transgénicos a ratones normales no transgénicos han tenido éxito limitado, por lo que algunos aspectos sobre la etiología de las EET permanecen confusos.

Otro interrogante sin respuesta es el mecanismo por el cual el agente infeccioso se duplica en el individuo afectado. Hasta donde sabemos sólo se duplican los ácidos nucleicos, entonces, ¿cómo puede una proteína producir más de sí misma?. En esta pregunta radica uno de los principales puntos débiles en el concepto íntegro de los priones como agentes infecciosos.

La memoria genética es otro de los puntos de interés científico todavía no resuelto. Una vez más, si la memoria es una propiedad que se confería únicamente al DNA y RNA celulares, es en ellos que se almacena la información que luego va transmitiéndose de generación en generación

y también la que permite que enfermedades víricas y bacterianas se repliquen y multipliquen rápidamente por el organismo humano. ¿Cómo almacena esta información la *PrP* del prión sin alterar los aminoácidos que la forman? ¿Por qué mecanismos aún desconocidos modifica su forma?.

También resulta interesante preguntarse por qué una proteína que se expresa en el cerebro y en otros tejidos durante el desarrollo embrionario en todos los mamíferos examinados, podría ser prescindible sin ningún efecto negativo. ¿Es que la función de la proteína perdida es asumida por otra proteína diferente o relacionada? ¿O es que estamos frente a una proteína con una función redundante?.

A partir de los estudios de Chiesa y Harris surge la inquietud de si ¿*PrPc* podría llegar a inducir neurodegeneración sin convertirse en *PrPsc*?

Otro interrogante que aparece es si la alteración en el plegamiento de proteínas puede llegar a ser parte de un proceso patológico, pero también fisiológico o normal.

Por otra parte, si las investigaciones que están en desarrollo logran determinar que priones de otras proteínas intervienen en procesos neurodegenerativos como las enfermedades de Alzheimer, Parkinson, Huntington, esclerosis lateral amiotrófica y otras, puede surgir una oportunidad para impedir la diseminación de priones y, por lo tanto, para la prevención de encefalopatías, después de la exposición a priones.

Los avances científicos brindan hoy la posibilidad de criar ratones carentes de *PrPc* que permiten estudiar si la *PrPc* es esencial no sólo para enfermedades semejantes al *Scrapie* sino también para la formación del agente infeccioso, y proporcionan también la posibilidad de analizar los genes *PrP* mutados o extraños. Esto nos lleva a plantearnos otro interrogante, ¿los ratones carentes de *PrPc* serían resistentes a la infección por priones? Si esto resulta así, ¿se trataría de un fenómeno común a todas las especies?, y de ser esto confirmado, ¿podría ser factible obtener ganado resistente a la enfermedad?

Para terminar podemos afirmar que la historia real de los priones y las EET no está concluida, sino que continúa escribiéndose en la actualidad, aún resta mucho por explicar, y los fondos bibliográficos con que contamos indudablemente brindarán aportes valiosísimos que terminen siendo decisivos, y con el correr del tiempo quizás debamos olvidar premisas que hoy nos parecen trascendentales.

## AGRADECIMIENTO

Trabajo de Revisión Bibliográfica realizado como requisito de la Carrera Docente Universitaria.

## BIBLIOGRAFÍA:

1. Aguzzi A, Montrasio F, Kaeser PS. Prions: health scare and biological challenge. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001; 2:118-126.
2. Pacífico C, Galotta JM. Enfermedades por priones. *Rev. de la Facultad de Ciencias Agrarias UCA* 2002; Vol. 20. [http://www.uca.edu.ar/esp/sec-fagrarias/esp/docs-revista/volumenes/tomo.php?numero=20\\_5](http://www.uca.edu.ar/esp/sec-fagrarias/esp/docs-revista/volumenes/tomo.php?numero=20_5).
3. Zarranz JJ. Enfermedades priónicas o prionopatías. *Neurología* 2006; 21 (8): 396-399.
4. Prusiner SB. Prion diseases and the BSE crisis. *Science* 1997; 278: 245-51.
5. Prusiner SB. Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie. *Science* 1982; 216: 136-144.
6. Prusiner SB. Molecular biology of prion diseases. *Science* 1991; 252: 1515-22.
7. Oesch B. Prion Review. Chapter IV. 2007 Un gen, dos proteínas. En: <[http://www.biologia.educar/el\\_prion/prion4.htm](http://www.biologia.educar/el_prion/prion4.htm)> [consulta: marzo 2008].
8. Prusiner SB. Neurodegenerative disease and prions. *New England Journal Medicine* 2001; 344: 1516-1526.
9. Wilmer V, Gonzáles J, Arrieta JA, Álvarez C, Borja G, Vergara JC et al. Enfermedad de Creutzfeldt- Jakob tipo esporádica: reporte de caso. *Infect.* 2007 [serial on the Internet]. Sep [cited 2009 Sep 15]; 11(3): 124-128. Available from: [http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S01239392200700030005&lng=en](http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01239392200700030005&lng=en).
10. Villegas LA, Rodas JD. Principios de Virología. 3ra ed. Jorge Ossa Londoño Editor. Medellín (Colombia), 2000; p. 209-221.
11. Enfermedades causadas por priones. BorNet. Revista de divulgación sobre ciencias. [http://www.bornet.es/notic/Medicina\\_y\\_Salud/160201190523.shtml](http://www.bornet.es/notic/Medicina_y_Salud/160201190523.shtml).
12. Pastor Torregosa S. Priones, solución a un enigma médico. 1999 en: <http://webvision.umh.es/docencia/biocelular/seminarios/seminario-2/priones-1.html>
13. Mastrianni JA, Roos RP. The Prion Diseases. *Seminars in Neurology* ThiemeMedical Publishers 2000 En: <http://www.medscape.com/viewarticle/410863>
14. Wyatt JM, Pearson GR, Smerdon TN, Gruffydd-Jones TJ, Wells G, Wilesmith W. Naturally occurring scrapie-like spongiform encephalopathy in five domestic cats. *Veterinary Record* 1991; 129: 233-236.
15. Jeffrey M, Wells GA. Spongiform encephalopathy in a nyala (*Tragelaphus angasi*). *Veterinary Pathology* 1988; 25: 398-399.
16. Fleetwood AJ, Furley CW. Spongiform encephalopathy in an eland. *Veterinary Record* 1990; 126: 408-409.
17. Kirkwood JK, Wells GA, Wilesmith JW, Cunningham AA, Jackson SI. Spongiform encephalopathy in an arabian oryx (*Oryx leucoryx*) and a greater kudu (*Tragelaphus strepsiceros*). *Veterinary Record* 1990; 127: 418-420.
18. Hsich G, Kenney K, Gibbs C, Lee KH, Harrington MG. The 14-3-3 Brain Protein in Cerebrospinal Fluid as a Marker for Transmissible Spongiform Encephalopathies. *New England Journal Medicine* 1996; 335: 924-930.
19. Zerr I, Bodemer M, Otto M, Poser S, Windl O, Kretzschmar HA, Gefeller O, Weber T. Diagnosis of Creutzfeldt-Jakob disease by two-dimensional gel electrophoresis of cerebrospinal fluid. *Lancet* 1996; 348: 84649.
20. Béringue V, Herzog L, Reine F, Le Dur A, Casalone C, Vilotte JL, et al. Transmission of atypical bovine prions to mice transgenic for human prion protein. *Emerging Infectious Diseases Journal* 2008 [serial on the Internet]. Dec [date cited]. Available from <http://www.cdc.gov/EID/content/14/12/1898.htm>. DOI: 10.3201/eid1412.080941
21. Hernández FAA, Céspedes CG, González AJE. Enfermedades priónicas en humanos. *Gac Med Caracas* 2002; 110 (1). <<http://www.anm.org>> [consulta: agosto 2008].
22. Rubio González T, Verdecia Jarque M. Enfermedades priónicas [artículo en línea] *MEDISAN* 2009; 13(1). <[http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol13\\_1\\_09/san08109.htm](http://bvs.sld.cu/revistas/san/vol13_1_09/san08109.htm)> [consulta: noviembre 2009].
23. Mc Gowan JP. Scrapie in sheep. *Scott. Journal of Agricultural* 1922; 5:365-375.
24. Beer J. Enfermedades infecciosas de los animales domésticos. Tomo I. Editorial Acribia. Zaragoza. (España) 1987.
25. Blood DC, Radostitis OM. *Medicina Veterinaria*, Vol II. Interamericana, Mc Graw-Hill. Madrid (España) 1992.
26. Wise DJ, Carter GR. Priones y encefalopatías espongiiformes transmisibles. In: Carter G.R. and Wise D.J. (Eds.), *A Concise Review of Veterinary Virology*. Ithaca: International Veterinary Information Service ([www.ivia.org](http://www.ivia.org)); Document No. A3429.1205.ES. 2005
27. Cuillé J, Chelle P. La Maladie dite tremblante du mouton, est-elle inoculable? *Comptes Rendus De L'Académie Des Sciences* 1936; 203, 1552-1554.
28. Fresquet JL. Alfons María Jakob (1884-1931) en: <http://www.historiadelamedicina.org/jakob.htm>. 2005
29. Polo JM. Historia y clasificación de las enfermedades priónicas humanas. Primer Congreso virtual Iberoamericano de Neurología. <http://svneurologia.org/congreso/priones-3.html>. 1998.
30. Kirschbaum WR. Jakob-Creutzfeldt disease (spastic pseudosclerosis, A Jakob; Heidenhain syndrome; subacute spongiform encephalopathy). *Nueva York: Elsevier* 1968.
31. Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ. Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Sträussler syndrome. With an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain* 1981; 104: 559-588.

32. Masters CL, Gajdusek DC. The spectrum of Creutzfeldt-Jakob disease and the virus-induced subacute spongiform encephalopathies. *Recent Advances in Neuropathology* 1982; 2: 139-163.
33. Zigas V, Gajdusek D. Kuru: Clinical Study of a New Syndrome Resembling Paralysis Agitans in Natives of the Eastern Highlands of Australian New Guinea. *Medical Journal of Australia* 1957; 2: 745-754.
34. Gajdusek DC. Unconventional viruses and the origin and disappearance of kuru. *Science* 1977; 197: 943-60.
35. Gajdusek DC, Zigas V. Clinical, pathological and epidemiological study of an acute progressive degenerative disease of the central nervous system among natives of the eastern highlands of New Guinea. *American Journal of Medicine* 1959; 26: 442-469.
36. Klatzo I, Gajdusek DC, Zigas V. Pathology of Kuru. *Lab Invest.* 1959; 8: 799-847.
37. Hadlow WJ. Scrapie and Kuru. *The Lancet* 1959; 2: 289-290.
38. Poser CM. Notes on the history of prion diseases. Part I. *Clinical Neurology and Neurosurgery* 2002; 104: 1-9. PubMed
39. Gajdusek DC, Gibbs C, Alpers M. Experimental Transmission of a Kuru-like Syndrome to Chimpanzees. *Nature* 1966; 209: 794-796.
40. Gibbs CJ, Gajdusek DC, Asher DM, Alpers MP, Beck E, Daniel PM, Matthews WB. Creutzfeldt-Jakob disease (subacute spongiform encephalopathy): transmission to the chimpanzee. *Science* 1968; 161: 388-389.
41. Masters CL, Gajdusek DC, Gibbs CJ. Creutzfeldt-Jakob disease virus isolations from the Gerstmann-Sträussler syndrome. With an analysis of the various forms of amyloid plaque deposition in the virus-induced spongiform encephalopathies. *Brain* 1981; 104: 559-588.
42. Medori R, Tritschler HJ, Leblanc A, Villare F, Manetto V, Chen HY et al. Fatal familial insomnia is a prion disease with a mutation at codon 178 of the prion gene. *New England Journal of Medicine* 1992; 326: 444-449.
43. Lugaresi E, Medori R, Montagna P, Baruzzi A, Cortelli P, Lugaresi A et al. Fatal familial insomnia and dysautonomia with selective degeneration of thalamic nuclei. *New England Journal of Medicine* 1986; 315: 997-1003.
44. Ridley RM, Baker HF. Fatal protein. The story of CJD, BSE, and other prion diseases. Oxford University Press. 1998
45. Marsh RF, Burger D, Hanson RP. Transmissible mink encephalopathy: Behaviour of the disease agent in mink. *American Journal of Veterinary Research* 1969;30:1637-1642.
46. Mohanty SB, Dutta SK. *Virología Veterinaria*. 1era ed. Nueva editorial Interamericana. México D.F. (México) 1999.
47. Williams ES, Young S. Chronic wasting disease of captive mule deer: a spongiform encephalopathy. *Journal of Wildlife Diseases* 1980; 16: 89-98.
48. Alper T, Haig D, Clarke M. The Exceptionally Small Size of the Scrapie Agent. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 1966; 22: 278-284.
49. Alper T, Cramp WA, Haig DA, Clarke MC. Does the agent of scrapie replicate without nucleic acid? *Nature* 1967; 214: 764-766.
50. Griffith J. Self-Replication and Scrapie. *Nature* 1967; 215: 1043-1044.
51. Dickinson AG, Outram GW. The Scrapie Replication-Site Hypothesis and its Implications for Pathogenesis, *Slow Transmissible Diseases of the Nervous System*, vol. 2, editado por Prusiner S.B. y Hadlow W.J., New York, Academic Press (Estados Unidos) 1979. p. 13-32.
52. Johnson RT, Johnson KP. Recent advances in Neurology. Plum F, ed. Filadelfia: F.A. Davis (Estados Unidos) 1969. p. 33-78.
53. Prusiner S. Novel Infectious Agents Cause Scrapie, *Science* 1982 ; 216: 136-144.
54. Prusiner SB. Human prion diseases and neurodegeneration. En: Prusiner S.B. ed. *Prions*. Berlin: Springer: 1998. p.1-17.
55. Merz P, Somerville R, Wisniewski H, Iqbal K. Abnormal Fibrils from Scrapie-Infected Brain. *Acta Neuropathologica* 1981; 54, 63-74.
56. Prusiner S, Mc Kinley M, Bowman K, Bolton D, Bendheim P, Groth D, Glenner G. Scrapie Prions Aggregate to Form Amyloid-like Birefringent Rods. *Cell* 1983; 35: 349-358.
57. Oesch B, Westaway D, Walchli M, Mc Kinley M, Kent S, Aebesold R, Barry R, Tempst P, Teplow D, Hood L, Prusiner S, Weissmann C. A Cellular Gene Encodes Scrapie PrP 27-30 Protein. *Cell* 1985; 40: 735-746.
58. Wells G, Scott T, Johnson C, Gunning R, Hancock R, Jeffery M, Dawson M, Bradley R. A Novel Progressive Spongiform Encephalopathy in Cattle. *Veterinary Record* 1987; 121: 419-420.
59. Fraser H, Bruce M, Chree A, Mc Connell I, Wells G. Transmission of Bovine Spongiform Encephalopathy and Scrapie to Mice. *Journal of General Virology* 1992; 73: 1891-1897.
60. Wilesmith J, Wells G, Cranwell M, Ryan J. Bovine Spongiform Encephalopathy: Epidemiological Studies. *Veterinary Record* 1988; 123: 638-644.
61. Ariza A. El patólogo ante las encefalopatías espongiiformes transmisibles. *Revista Española de Patología* 2002; 35 (1): 49-62.
62. Kirkwood J, Cunningham A. Epidemiological Observations on Spongiform Encephalopathies in Captive Wild Animals in the British Isles. *Veterinary Record* 1994; 135: 296-303.
63. Gasset M, Westaway D. Los priones y su biología. En: <http://neurologia.rediris.es/congreso-1/conferencias/priones-1.html> (consultado: julio 2009). 2009.
64. Hsiao K, Baker H, Crow T, Poulter M, Owen F, Terwilliger J, Westaway D, Ott J, Prusiner S. Linkage of a Prion Protein Missense Variant to Gerstmann-

Sträussler Syndrome. *Nature* 1989; 338: 342-345.

65. Pearson GR, Wyatt JM, Gruffydd-Jones TJ, Hope MJ, Chong A, Higgins RJ, Scott AC, Wells GAH. Feline spongiform encephalopathy: fibril y PrP studies. *Veterinary Record* 1992; 131: 307-310.

66. Willoughby, K.; Kelly, D.; Lyon, D. and Wells, G. (1992) Spongiform Encephalopathy in a Captive Puma (*Felis Concolor*), *Veterinary Record* 131: 431-434.

67. Peet R, Curran J. Spongiform Encephalopathy in an Imported Cheetah (*Acinonx Jubatus*). *Australian Veterinary Record* 1992; 69, 171.

68. Narang HK. Detection of Single-Stranded DNA in Scrapie-Infected Brain by Electron Microscopy. *Journal of Molecular Biology* 1990; 216: 469-473.

69. Narang HK. Evidence that Single-Stranded DNA Wrapped Around the Tubulofilamentous Particles Termed "Nemaviruses" is the Genome of the Scrapie Agent. *Research in Virology* 1998; 149: 375-382.

70. Diring H, Beekes M, Oberdieck U. The Nature of the Scrapie Agent: The Virus Theory. *Annals of the New York Academy of Science* 1994; 724: 246-258.

71. Brown P, Cathala F, Raubertas, RF, Gajdusek DC, Castaigne P. The Epidemiology of Creutzfeldt-Jakob Disease: Conclusion of a 15-Year-Investigation in France and Review of the World Literature. *Neurology* 1987; 37: 895-904.

72. Hsiao K, Groth D, Scott M, Yang S, Serban H, Rapp D, Torchia M, Dearmond S, Prusiner S. Serial Transmission in Rodents of Neurodegeneration from Transgenic Mice Expressing Mutant Prion Protein, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91: 9126-9130.

73. Weber EL. Biología de los priones: actualización. *Revista Argentina de Microbiología* 1999; 31: 205-218.

74. Prusiner SB. The prion diseases. *Brain Pathology* 1998; 8: 499-513.

75. Pidone CL. La teoría del prión. *Analecta Veterinaria* 2005; 25(2): 62-72.

76. Weissmann C. A "unified theory of prion propagation. *Nature* 1991; 352, 679-683.

77. Bateman D, Hilton D, Love S, Zeidler M, Beck J, Collinge J. Sporadic Creutzfeldt-Jakob Disease in a 18-year-old in the UK. *The Lancet* 1995; 346: 1155-1156.

78. Will RG, Ironside JW, Zeidler M, Cousens SN, Estibeiro K, Alperovitch A, Poser S, Pocchiari M, Hofman A, Smith PG. A New Variant of Creutzfeldt-Jakob Disease in the UK. *The Lancet* 1996; 347: 921-925.

79. Bruce M, Will R, Ironside J, Mc Connell I, Drummond D, Suttie A, Mc Cardle L, Chree A, Hope J, Birkett C, Cousens S, Fraser H, Costock C. Transmissions to Mice Indicate that 'New Variant' CJD is Caused by the BSE Agent. *Nature* 1997; 389: 498-501.

80. Bessen RA, Kocisko DA, Raymond GJ, Nandan S, Lansbury PT, Caughey B. Non-genetic propagation of strain-specific properties of scrapie prion protein. *Nature* 1995; 375(6533):698-700.

81. Beekes M, Mc Bride PA, Baldauf E. Cerebral targeting indicates vagal spread of infection in hamsters fed with scrapie. *Journal of General Virology* 1998; 3: 601-607.

82. Glatzel M, Heppner FL, Albers KM, Aguzzi A. Sympathetic innervation of lymphoreticular organs is rate-limiting for prion neuroinvasion. *Neurobiology* 2001; 31: 25-34.

83. Klein MA. A crucial role for B cells in neuroinvasive scrapie. *Nature* 1997; 390: 687-690.

84. Klein MA et al. PrP expression in B lymphocytes is not required for prion neuroinvasion. *Nature Medicine* 1998; 4: 1429-1433.

85. Montrasio F et al. Impaired prion replication in spleens of mice lacking functional follicular dendritic cells. *Science* 2000; 288: 1257-1259.

86. Klein MA et al. Complement facilitates early prion pathogenesis. *Nature Medicine* 2001;7: 488-492.

87. White AR et al. Monoclonal antibodies inhibit prion replication and delay the development of prion disease. *Nature* 2003; 422: 80-83.

88. López-Herrera A, Haenni AL, Ureiqui Inchima S. El desafío de las enfermedades priónicas, una emergencia en humanos y bovinos. *Veterinaria México* 2002; 33(4).

89. Hsich G, Kenney K, Gibbs Jr, Clarence J, Lee KH, Harrington MG. The 14-3-3 Brain Protein in Cerebrospinal Fluid as a Marker for Transmissible Spongiform Encephalopathies. *New England Journal of Medicine* 1996; 335 (13) p. 924-930.

90. Korth C, Stierli B, Streit P, Moser M, Schaller O, Fischer R, Schulz-Schaeffer W, Kretzschmar H, Raebler A, Braun U, Ehrensperger F, Hornemann S, Glockshuber R, Riek R, Billeter M, Wuthrich K, Oesch B. Prion (PrPsc)- specific epitope defined by a monoclonal antibody. *Nature* 1997; 390(6655):74-77.

91. Derkatch IL, Bradley ME, Zhou P et al. Genetic and environmental factors affecting the de novo appearance of the [PSI+] prion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 1997;147: 507-519. [PubMed]

92. Kuhn TS. La estructura de las revoluciones científicas. Fondo de Cultura Económica. (México) 1971.

93. Biografías y vidas. <http://www.biografiasyvidas.com>. fecha de consulta mayo 2009.

# 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>