

Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias

ISSN 03055148 Versión Impresa  
ISSN 1614-2590 Versión Electrónica  
ISSN 1660295-4 Versión CD-ROM

# ANALECTA VETERINARIA



Publicación de la  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
Volumen 31 nº 2 año 2011



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

# ANALECTA

# VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 31 n° 2, 2011

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

## 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*

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*

### **Diseño**

Prof.Dr. Nestor Oscar Stanchi

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

(*www.latindex.unam.mx*),

Ulrich's International Periodicals Directory

(*www.ulrichsweb.com*)

Zoological Records

(*www.biosis.org.uk/products\_services/zrss.html*)

BIOSIS (*http://www.biosis.org*)

Infocyt *http://www.redhucyt.oas.org/infocyt/*

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*

**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**

# ANALECTA VETERINARIA Vol 31 n° 2, 2011

## Artículos de Investigación/Research articles

**INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR HERPESVIRUS BOVINO 1 EN CONEJAS GESTANTES.**  
Experimental Infection by Bovine Herpesvirus 1 in Pregnant Rabbits. Valera A, Pecoraro M, Fuentealba N, Massone A, Quiroga M, Corva S, Galosi C. **5-12**

**COMPORTAMIENTO DINÁMICO DEL PESO CORPORAL TEMPRANO EN POLLOS DE CARNE CON DIFERENTE EDAD AL MISMO PESO OBJETIVO DE FAENA.** Dynamic Behavior of Early Body Weight in Meat Type Chickens with Different Age at the Same Target Slaughter Weight. Romera B, Canet Z, Antruejo A, Dottavio A, Di Masso R. **13-18**

**ESTANDARIZACIÓN DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA PARA LA MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN SEMINAL EN EL PERRO DOMÉSTICO.** Standardization of Spectrophotometry for the Assessment of Sperm Concentration in the Domestic Dog. Diaz J, Valiente C, Corrada Y, Gobello C. **19-22**

**PENETRACIÓN DE FOSFOMICINA EN CÉLULAS HEP-2 Y SU INTERACCIÓN CON DEOXINIVALENOL.** Penetration of Fosfomycin in Hep-2 Cells and its Interaction With Deoxynivalenol. Martínez G, Soraci A, Tapia M. **23-27**

**SEROPREVALENCE OF *Toxoplasma gondii* AND *Neospora caninum* IN SHEEP IN URUGUAY.**  
Seroprevalencia de *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en ovinos de Uruguay. Suzuki K, Corva SG, Travería G, Cattáneo M, Puentes R, Martinicorena M, Moreno J, Furtado A, Freyre A, Satragno D, Acevedo C, Nuñez R, Bermúdez J. **28-32**

## Comunicaciones breves/Short communications

**DEGENERACIÓN CORNEAL EN UN CANINO COMO ÚNICO SIGNO DE HIPOTIROIDISMO, DESCRIPCIÓN DE UN CASO.** Corneal Degeneration in a Canine as Only Sign of Hypothyroidism, Report of a Case. Meana MV, Cassagne PN, Zapata GL. **33-36**

**CHRONIC OSTEOARTHRITIS IN A CAPTIVE MOUNTAIN LION (*Felis concolor*).** Osteoarthritis Crónica en un León de Montaña (*Felis Concolor*) en Cautiverio. Briceño A, Garcia F, Gómez M, Alvizu E, Morales I, Chiachio N **37-39**

## Revisiones/Review

**RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIMICROBIANOS OCASIONADA POR BOMBAS DE EFLUJO. IMPACTO EN LA MULTIRRESISTENCIA.** Bacterial Antibiotic Resistance by Efflux Pumps. Multidrug Resistance Impact. Marchetti M, Errecalde J, Mestorino N. **40-53**

# INFECCIÓN EXPERIMENTAL POR *HERPESVIRUS BOVINO 1* EN CONEJAS GESTANTES

Valera AR<sup>1,4</sup>, Pecoraro MR<sup>1</sup>, Fuentealba NA<sup>1,5</sup>, Massone AR<sup>2</sup>, Quiroga MA<sup>2</sup>, Corva SG<sup>3</sup>, Galosi CM<sup>1,6</sup>

Cátedras de <sup>1</sup>Virología, <sup>2</sup>Patología Especial, <sup>3</sup>Bioestadística y <sup>4</sup>Microbiología Gral. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.  
<sup>5</sup> Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).  
<sup>6</sup> Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

**RESUMEN:** *La infección natural por Herpesvirus bovino 1 (BoHV-1) se manifiesta por conjuntivitis, signos respiratorios (rinotraqueitis), lesiones genitales (vulvovaginitis pustular infecciosa o balanopostitis) y abortos. El conejo, hasta el momento, ha resultado ser el mejor modelo experimental para estudiar los diferentes aspectos de la infección por BoHV-1, el fenómeno de latencia, la neuropatogenicidad de BoHV-5 y el comportamiento de diferentes cepas virales. Este trabajo se desarrolló con el objetivo de estudiar la respuesta de conejas infectadas con BoHV-1 en diferentes períodos de la gestación para que los datos resultantes puedan ser utilizados para la mejor comprensión de la infección en el bovino. Se utilizó un nuevo método de infección intranasal. Los animales desarrollaron signos clínicos. Se recuperó virus a partir de hisopados nasales, se observaron lesiones histopatológicas en las muestras analizadas, se demostró la respuesta inmune humoral y se detectó ADN viral a partir de placentas de los animales gestantes infectados. En este trabajo se evidenció por primera vez en el modelo conejo la llegada del virus al torrente sanguíneo luego de la infección intranasal. Además se aporta una herramienta de utilidad que puede ser utilizada para evaluar la virulencia de diferentes cepas de BoHV-1 y la respuesta inmune a distintos inmunógenos como también para realizar estudios de latencia y reactivación.*

**Palabras claves:** Conejas gestantes, *Herpesvirus bovino 1*, Infección experimental

## EXPERIMENTAL INFECTION BY BOVINE HERPESVIRUS 1 IN PREGNANT RABBITS

**ABSTRACT:** *Natural infection with Bovine herpesvirus 1 (BoHV-1) produces several clinical manifestations including conjunctivitis, respiratory signs, genital diseases and abortion. The rabbit is a good model for studying of latency, pathogenicity of BoHV-5 and other bovine herpesviruses. This study was conducted in order to analyze the response to experimental infection with BoHV-1 in rabbits during different periods of pregnancy. The results obtained could be useful for better understanding of the infection in cattle. A new method of infection was used. The rabbits developed clinical signs. The virus was recovered from nasal swabs and histological lesions were found in the analyzed samples. The humoral response was demonstrated and viral DNA was detected from the placentas. This work showed for the first time the arrival of BoHV-1 to blood after intranasal infection with the virus. It also provides a useful tool that can be used to evaluate the pathogenicity of by BoHV-1 strains, the immune response and to study viral latency and reactivation.*

**Key words:** *Bovine herpesvirus 1*, Experimental infection, Pregnant rabbits

Fecha de recepción: 18/07/11

Fecha de aprobación: 20/11/11

**Dirección para correspondencia:** Alejandro R Valera, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Calle 60 y 118 s/n, CC 296, CP 1900 La Plata. Tel. / Fax: +54-221-4824956.

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

## INTRODUCCIÓN

Existen cinco tipos de herpesvirus que poseen como hospedador natural al bovino: *herpesvirus bovino* (BoHV) 1 (subtipos 1.1 y 1.2), 2, 3, 4 y 5. El BoHV-1.1 provoca un amplio espectro de manifestaciones clínicas: rinotraqueítis (IBR), conjuntivitis, aborto, enteritis y ocasionalmente encefalitis. En caso de que la infección sea causada por el BoHV-1.2, la manifestación clínica principal es la vulvovaginitis pustular infecciosa (IPV) o la balanopostitis (IPB). El BoHV-5 es el mayor responsable de encefalitis (1). La infección experimental por BoHV-1 pudo ser demostrada en cabras, cerdos y ovinos; el embrión de pollo y los pequeños roedores (ratones, ratas, cobayos) no son susceptibles (2). El conejo, hasta el momento, ha resultado ser el mejor modelo experimental para estudiar el fenómeno de latencia de BoHV-1, la neuropatogenicidad por BoHV-5 y el comportamiento de diferentes cepas virales (3, 4, 5). Honda y col. evaluaron la respuesta serológica de conejos ante la infección intratraqueal e intravenosa con BoHV-1 aunque no lograron reproducir los signos clínicos (6). Rock y Reed (1982) reprodujeron la infección intraconjuntival y la reactivación viral (4). Brown y Field reprodujeron la infección por un método de inoculación por trepanación del seno paranasal y evaluaron la respuesta inmune humoral y celular, sin embargo estos autores destacan en su trabajo que la ruta de infección utilizada escapa a la vía natural de entrada del virus y que por lo tanto éste no realiza su etapa de replicación primaria en la mucosa nasal (7). Chowdhury y col. (1997) utilizando el método de inoculación de Brown y Field confirmaron la neuroinvasividad del BoHV-5 aunque no detectaron lesiones cuando evaluaron cepas de BoHV-1 (8). En los estudios experimentales con BoHV-1 en el conejo, el aborto solo es mencionado como un hallazgo complementario resultante de la infección experimental por diferentes vías, excepto la vía intranasal (9, 10). En otros herpesvirus también abortigénicos como el *Herpesvirus equino 1* se ha utilizado como modelo experimental al ratón BALB/c, reproduciendo los signos clínicos y el fenómeno del aborto, datos que resultan de utilidad para ampliar el conocimiento de los mecanismos patogénicos en el huésped natural, el caballo (11).

Por lo expuesto, el objetivo de este trabajo fue estudiar, con un enfoque multidisciplinario, las diferentes respuestas en conejas luego de la infección experimental con BoHV-1, en distintos periodos de la gestación, para ser utilizado como modelo experimental en estudios comparativos con el bovino.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Virus y células:** Se utilizó la cepa Los Ángeles (LA) de BoHV 1.1 obtenida del Instituto Nacional de

Tecnología Agropecuaria de Castelar (INTA), mantenida mediante pasajes en células MDBK (Madin-Darby bovine kidney). Para el crecimiento de las células se utilizó Medio Mínimo Esencial (MEM) suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB) irradiado, glutamina (0,03 g/ml), antibióticos (penicilina 20000 UI/ml y estreptomycinina 10 mg/ml) y antimicóticos (Nistatina 50 µg/ml). Se cultivaron a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5 % de CO<sub>2</sub>. La cepa viral se inoculó con una multiplicidad de infección de 0,1 y luego de 60 min de adsorción a 37 °C las células fueron incubadas con MEM suplementado con 2 % de SFB. Cuando se obtuvo un pasaje con efecto citopático del 100 % en las primeras 48 h post infección (PI), los sobrenadantes fueron levantados y centrifugados a 3000 rpm durante 15 minutos para descartar los restos celulares, se fraccionaron y se conservaron a -70 °C. Cinco muestras representativas de este pasaje viral fueron tituladas por el Método de Reed y Muench utilizando diluciones logarítmicas de base 10. La lectura final de los resultados se realizó a los 72 h PI y se determinó la dosis infectante cultivo celular 50 % por cada 50 µl (DICC<sub>50</sub>/50 µl).

**Animales de experimentación:** se emplearon conejas neozelandesas, de 3-4 meses de edad. Los animales fueron tratados de acuerdo a las normativas internacionales indicadas en la Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio (National Research Council, National Academy Press, Washington DC, USA 1996, [http://dels.nas.edu/ilar\\_n/ilarhome/](http://dels.nas.edu/ilar_n/ilarhome/)) y se alojaron en un bioterio para animales convencionales, con agua y comida *ad libitum*.

### INFECCIÓN EXPERIMENTAL:

#### Experiencia 1: Método por trepanación (T) de seno paranasal (Método de Brown):

Se conformaron tres Bloques de estudio de n=4 cada uno y denominados Bloque 1 (T1): inoculadas ~ 15 días antes del servicio y Bloque 2: inoculadas a ~ 15 días del servicio (2do tercio de preñez) y Bloque 3: inoculadas a ~ 22 días (3er tercio) de preñez. Cada Bloque estuvo compuesto a su vez por tres grupos: "a": gestantes inoculadas (n=2) "b": gestante no inoculada (control negativo de infección) (n=1) y "c": no gestante inoculada (control positivo de infección) (n=1).

Se inocularon 500 µl de suspensión viral a los animales de los Bloques 1 y 2 (T1 y T2) (4). Los animales control negativo de infección recibieron sobrenadante de cultivo celular no infectado. No se realizó la experiencia con el Bloque 3 (T3) al comprobarse la ausencia de resultados en los Bloques anteriores.

#### Experiencia 2: Método de instilación intranasal (IN):

se conformaron tres Bloques de estudio de n=8 cada uno y denominados Bloque 1: inoculadas a ~ 10 a 15 días previos al servicio, Bloque 2: inoculadas a ~ 15 días (2do tercio) de preñez y Bloque 3: inoculadas a ~ 22 días (3er tercio) de preñez. Cada Bloque estuvo compuesto a su vez por tres grupos: "a": gestantes inoculadas (n=4) "b": gestantes no inoculadas (controles negativo de infección) (n=2) y "c": no gestantes inoculadas (controles positivo de infección) (n=2).

Se infectaron los tres Bloques (denominados IN1, IN2 e IN3), previa anestesia local de las narinas con Lidocaína al 10% aplicada por aspersion. Comprobada la insensibilidad de la zona, se introdujo el

inóculo (250 µl por cada narina) utilizando una pipeta descartable (12).

#### **Observación clínica y muestreo**

Los animales fueron observados diariamente a las 9 h y a las 17 h para constatar la aparición de signos clínicos respiratorios. Se llevaron registros de temperatura y se comprobó la gestación por palpación abdominal a los 10-12 días post servicio (dps). Los animales de los grupos "b" (controles negativos de infección) se alojaron en un ambiente separado para evitar una posible infección aerógena.

#### **Muestras para detección de anticuerpos (Ac):**

se tomaron muestras de sangre entera, por punción de la vena marginal de la oreja, para la obtención de suero previamente a la infección experimental y aproximadamente cada 10 días durante un período de 90 días PI (dPI).

#### **Muestras para aislamiento viral y reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

**Sangre:** por punción de la vena marginal de la oreja a las 48 y 72 h PI con heparina (20UI/ml), para detectar viremia.

**Hisopados nasales:** durante 7 dPI para el caso de los animales de los Bloques T1 y T2 y a todos los animales con signos clínicos respiratorios hasta la desaparición de los mismos en el caso de los animales de los Bloques IN1, IN2 e IN3.

**Fetos y natimortos:** se necropsiaron, se tomaron muestras de pulmón, hígado. En los casos posibles se tomaron muestras de placenta.

**Conejas:** se tomaron muestras de útero, pulmón, riñón y bazo en caso de muerte o necesidad de necropsia de las conejas gestantes o post parto.

**Muestras para estudios histopatológicos:** parte de las muestras de fetos, natimortos y conejas fueron fijadas en formol y preparadas usando técnicas estándar para estudios histológicos.

#### **Técnica de ELISA**

Se utilizó un ELISA indirecto previamente estandarizado. Se empleó un antígeno soluble producido con células MDBK infectadas con la cepa LA de BoHV-1. La solución de Bloqueo consistió en solución tamponada de fosfatos 0,141 M (PBS) con 0,05 % de Tween 20 y la dilución de uso de los sueros problemas se estandarizó a partir de la dilución inicial de 1/50 y en diluciones sucesivas en base 2. Como Ac secundario se utilizó suero de cabra anticonejo conjugado con peroxidasa. El sustrato consistió en ácido cítrico 0,1M, fosfato disódico 0,2M, 0,3 mg/ml de azinodietilbenzotiazol-sulfonato (ABTS) y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,01 %. Los valores de densidad óptica (DO) fueron leídos utilizando un filtro de 405 nm en un espectrofotómetro para microplacas (Titertek Multiskan Flow Laboratory). Se consideraron positivos aquellos valores de la DO superiores a 2 valores promedios de DO de los sueros negativos (13).

#### **Aislamiento viral**

Las muestras se procesaron inmediatamente de tomadas de acuerdo a los métodos convencionales para aislamiento viral y se inocularon sobre células, en diluciones en base logarítmica 10, desde 10<sup>-1</sup> a 10<sup>-3</sup>. Se realizaron tres pasajes ciegos antes de dar por negativa a cada muestra.

#### **Técnica de PCR**

Para la extracción de ácido nucleico viral se utilizó un equipo comercial (Promega). Para la reacción se utilizó un par de cebadores que amplifican una región de 183 pb correspondiente al gen que codifica para la timidina quinasa (F:5'AGACCCAGTTGTGAATGC-3' y R:5'ACACGTCCAGCACGAACACC-3'). La mezcla para la reacción se preparó con: 1 µl (100 ng) de cada uno de los cebadores, 5 µl de buffer de PCR 10X, 1,5 µl de Cl<sub>2</sub>Mg 50 mM, 0,5 µl de Taq polimerasa, 2 µl de mezcla de dNTP, 29 µl de agua destilada y 5 µl de ADN molde. El ciclado se realizó en un Ciclador Eppendorf (Mastercycler Gradient Eppendorf AG) y consistió en un precalentamiento de 5 min. a 99°C seguido de 1 min. a 95°C y 35 ciclos de 95°C 1min., 61,4°C 1 min. y 72°C 1 min., con una extensión final de 5 min. a 72°C. Los productos de PCR fueron analizados mediante electroforesis en geles de agarosa al 1,8% en buffer TBE (50 mM Tris pH 8, 50 mM ácido bórico y 1 mM de EDTA) durante 30 min. a 100 V. Los geles fueron visualizados con luz UV posteriormente a la tinción con bromuro de etidio. El tamaño de los fragmentos amplificados fue comparado con un marcador de peso molecular.

#### **Estudios histológicos e inmunohistoquímicos**

Las secciones de órganos incluidas en parafina fueron teñidas con hematoxilina y eosina (HE). Algunas muestras fueron procesadas para inmunohistoquímica (IHQ) utilizando un anticuerpo monoclonal anti glicoproteína D. Para el revelado de la reacción se utilizó un reactivo comercial (DakoCytomation LSAB 2 Systems).

#### **Análisis estadístico de los datos**

Los resultados de ELISA y los aislamientos virales se compararon por análisis de varianza (Anova) y por el test de diferencia mínima significativa DMS en el caso de p<0,05. Se utilizó la prueba Q de Cochran para el análisis de los signos clínicos producto de la inoculación experimental. El paquete estadístico utilizado fue Epi Info 2000 ([www.cdc.gov/epiinfo](http://www.cdc.gov/epiinfo)).

## **RESULTADOS**

### **INFECCIÓN EXPERIMENTAL Y OBSERVACIÓN CLÍNICA**

#### **Experiencia 1**

Ninguno de los animales inoculados por este método presentó signos clínicos. La temperatura en todos los casos varió dentro de los parámetros normales (38,6 - 40°C). Uno de los animales del Bloque T1 (T1-a1) fue negativo a la palpación gestacional a los 10-12 días post servicio (dps). Las hembras registrada T1-a2 y las dos conejas gestantes del Bloque T2 (T2-a1 y T2-a2) resultaron positivas a la palpación gestacional llegando a término al parto, sin particularidades y obteniéndose 7, 8 y 5 gazapos vivos respectivamente que se desarrollaron normalmente. Los animales T1-b1 y T2-b1 (controles negativos de infección) no presentaron signos clínicos y llegaron al parto a término obteniéndose 6 y 4 gazapos vivos, respectivamente.

#### **Experiencia 2:**

Se reprodujo la infección experimental en

los tres Bloques (IN1, IN2 e IN3). En todos los casos la temperatura varió dentro de los parámetros normales (38,6 - 40°C). El examen clínico reveló rinitis y descarga nasal en un comienzo serosa (1-2 dPI) para luego tornarse seromucosa durante períodos variables que fluctuaron entre los 5 y 7 dPI en los diferentes animales. Se observaron rales respiratorios que persistieron desde el 2do hasta los 8 dPI. Los animales gestantes inoculados del Bloque IN1 (IN1-a1, a2, a3 y a4) fueron negativos a la palpación gestacional a los 10 dps y se mantuvieron en observación por 25 días más, sin que se hubiera producido el parto en ninguno de ellos. La coneja IN2-a1 llegó al parto normalmente aunque solo se hallaron dos natimortos y un tercer gazapo murió inmediatamente del parto. Los animales denominados IN2-a2 y IN2-a3 murieron en el parto y 4 días previos al parto, respectivamente. La coneja IN2-a4 llegó al parto normalmente aunque sus 4 neonatos se presentaron hipoquinéticos y murieron por aplastamiento. Los animales IN3-a1, IN3-a3 e IN3-a4 llegaron al parto y se presentaron indistintamente casos de mortinatos, neonatos hipoquinéticos y neonatos normales. La coneja IN3-a2 murió a los 4 dPI mostrando signos de neumonía aguda. Los seis animales no gestantes (controles positivos de infección) de los tres Bloques (IN1-c1 y c2, IN2-c1 y c2 e IN3-c1 y c2) mostraron signos clínicos y se recuperaron de la infección. Los controles negativos de infección (animales del grupo "b") no presentaron signos clínicos y llegaron al parto a término.

### **Técnica de ELISA**

**Experiencia 1:** se detectaron Ac contra BoHV-1 con mayor título a los 30dPI para decrecer y ser indetectables a los 80 dPI.

**Experiencia 2:** Las curvas que ejemplifican los resultados serológicos hallados se muestran en los Gráficos I, II y III. Los gazapos que sobrevivieron resultaron positivos al test de ELISA al mes del nacimiento.

### **Aislamiento viral y PCR**

**Experiencia 1:** los hisopados nasales tomados en los primeros 7 dPI y la sangre con anticoagulante tomada a las 48 y 72 h PI resultaron negativos para el AV y PCR.

**Experiencia 2:** los hisopados nasales de los tres Bloques de animales fueron positivos al AV observándose mayores niveles de excreción viral al 2do y 3er dPI (Gráficos IV, V y VI). Se hallaron diferencias significativas ( $p \leq 0,5$ ) entre los valores obtenidos en diferentes días del mismo animal. No se encontraron diferencias significativas ( $p=0,92$ ) entre los tres Bloques. Las muestras de los animales controles negativos de los tres Bloques fueron negativas para AV.

Las muestras de sangre, fetos, natimortos,

neonatos y placentas resultaron negativas por AV. La PCR resultó positiva con tres de las 8 muestras de placentas de la coneja IN2-a2, 2 de la IN2-a3 y las 4 de la IN3-a2.

### **Estudios histológicos e inmunohistoquímicos**

Se analizaron las muestras del gazapo muerto en las primeras 24 h de vida (muerte perinatal) y de dos natimortos de la coneja IN2-a1. Los estudios histológicos del gazapo mostraron zonas de atelectasia en pulmones y extensas áreas de hemorragia en hígado, los riñones no presentaron lesiones. En los natimortos se encontraron cambios autolíticos en pulmón, hígado y riñón. La IHQ resultó negativa para todas las muestras. En la coneja IN2-a2 muerta en el parto, se observaron áreas de congestión, edema, hemorragia y áreas de enfisema y atelectasia en pulmón como así también focos con bacterias y abundante infiltrado de neutrófilos. No se observaron cuerpos de inclusión (CI). Las lesiones fueron compatibles con bronconeumonía supurativa (Figura 1). El hígado mostró grandes áreas de hepatocitos con cambios grasos y células con necrosis coagulativa, manteniendo la integridad de los hepatocitos de la zona periportal. Se observó la presencia predominante de macrófagos y linfocitos, marcada dilatación sinusoidal, edema periportal y células con pigmento biliar. Los riñones presentaron zonas con hemorragia glomerular e intertubular, hialinización glomerular, material proteináceo en el espacio de la cápsula de Bowman y presencia de bacteria en los glomérulos. En el útero no se observaron lesiones. La IHQ resultó negativa en pulmón, hígado, riñón y útero. Los tres natimortos de esta coneja presentaron severos cambios autolíticos que no permitieron evaluar la presencia de lesiones. En el pulmón de la coneja IN2-a3 (muerto 4 días antes del parto) se observaron zonas colapsadas, otras con marcada respuesta intersticial y focos diseminados con abundante cantidad de macrófagos y neutrófilos. El hígado presentó retracción y necrosis de células individuales y escasas células inflamatorias (mononucleares y ocasionales eosinófilos) en espacio porta. Se observaron células acidófilas y otras necróticas. Los riñones y el útero no presentaron particularidades. Los dos fetos de este animal como así también dos neonatos hipoquinéticos de la coneja IN2-a4 y un natimorto de la coneja IN3-a1 solo presentaron cambios grasos en hígado. En las muestras de pulmón de la coneja IN3-a2 muerta a los 4 dPI se observaron áreas de enfisema y focos neumónicos con macrófagos, neutrófilos y eosinófilos. Las muestras de cornete nasal presentaron CI típicos (Figura 2) y la IHQ resultó positiva (Figura 3). El hígado presentó regular cantidad de células inflamatorias en el espacio porta. Los riñones

se presentaron con áreas focales de hiperemia, focos de hemorragia glomerular e intersticial cortical y cortico-medular y acúmulos inflamatorios mononucleares (nefritis intersticial no supurativa). En el útero se observaron algunas glándulas endometriales dilatadas y quísticas con moderada infiltración de células mononucleares en la lámina propia del endometrio superficial y marcada hiperemia. Los cuatro nonatos muertos estudiados del animal IN3-a2 así como un neonato hipoquinético de la coneja IN3-a4 solo presentaron cambios grasos en hígado. En todas las placentas analizadas (IN2-a2 y a3 e IN3 a2) se observaron focos de mineralización de arterias y focos de necrosis. También se presentaron zonas de autólisis y zonas hiperémicas. La técnica de IHQ resultó negativa en todos los casos.

## DISCUSIÓN

Desde hace mucho tiempo por razones prácticas, éticas y humanas se han desarrollado modelos animales para su aplicación en investigaciones biomédicas. Los modelos animales se definen como *“organismos vivientes con una inherente adquisición natural a procesos patológicos inducidos o espontáneos que de una u otra manera semejan el mismo fenómeno ocurrido en el huésped natural”* (14). Los animales de laboratorio son modelos muy convenientes y herramientas útiles en el estudio de muchas enfermedades de origen viral. En el caso de Medicina veterinaria y sobre todo cuando se trata de grandes animales el uso del huésped natural para estudiar aspectos patogénicos e inmunológicos de una infección, muchas veces se torna dificultoso por el manejo laborioso de estos animales como también por el costo que ello implica. Debido a estas circunstancias, se planteó como principal objetivo de este trabajo demostrar que el conejo es un modelo válido para estudiar la infección por BoHV-1.1, tanto en su manifestación respiratoria como abortigénica, hecho no bien documentado a la fecha. En este trabajo se describe la infección experimental con BoHV-1.1 en el conejo y la reproducción de la infección respiratoria y sistémica que continúa a la vía natural de infección. En una primera etapa se procedió a realizar la experiencia con el método de Brown (introducción del inóculo por trepanación del seno paranasal) trabajando con dos Bloques de animales. No se evidenciaron signos clínicos ni hubo AV de las muestras tomadas. Los animales llegaron al parto normalmente y solo se detectaron Ac. Al comprobarse la ausencia de resultados en los Bloques T1 y T2 no se trabajó con los animales del Bloque T3 y debido a que este método por trepanación no resultó eficaz para nuestra experiencia se procedió a modificar el método de infección. Es por eso que se utilizó un método de inoculación directa que respetó la puerta de entrada natural del virus

con el objetivo de reproducir el mecanismo de infección natural. Con la utilización de anestesia local que desensibilizó a la mucosa e impidió la expulsión refleja del inóculo y con la ubicación vertical del animal se logró introducir la suspensión viral. El método resultó exitoso ya que a las 24 h PI se confirmó la infección con la aparición de los síntomas respiratorios, a diferencia del bovino en donde el periodo de incubación puede llegar hasta 1 semana (1). Los signos clínicos que hasta el momento no habían sido reproducidos fueron similares a los observados en el bovino y se produjeron en todas las conejas inoculadas. Los registros de temperatura no sufrieron variaciones. Este hecho puede deberse a que, según datos aportados por otros autores, la respuesta febril es de menos de 24 h de duración a partir de iniciados los síntomas y no se produce en todos los casos (10). Para ser posible la evaluación de pequeñas variaciones en la temperatura, los animales deberían haber estado en condiciones ambientales controladas que en esta experiencia no fueron utilizadas.

La reproducción clínica de la infección, el AV a partir de las muestras de hisopados nasales y las curvas ascendentes de excreción viral registradas demostraron una activa multiplicación y eliminación del virus. La presencia de CI en cornetes nasales y la reacción de IHQ positiva en los animales muertos reconfirmaron y revalidaron el método utilizado así como el establecimiento de la infección.

En ninguno de los casos se observaron signos nerviosos, hallazgos que obtuvieron otros autores a pesar de haber inoculado BoHV-1 (15). Esto se debe precisamente a que en el caso de experiencias de reproducción de enfermedad neurológica en conejos, la edad de los mismos es un factor determinante y los animales no sobrepasaban los 30 días de edad. En esta experiencia todos los animales empleados fueron adultos.

En relación a la respuesta inmune humoral, trabajos realizados por Honda y col. (1991) determinaron la respuesta de Ac en conejos inoculados por vía intratraqueal e intravenosa. Los resultados hallados por los autores indicaron un pico de detección de Ac entre las 3-4 semanas posteriores a la primera inoculación a pesar de no haberse registrados signos clínicos y los Ac decrecieron a partir de las 9 semanas PI. Estos datos son coincidentes con la infección en el huésped natural. En esta experiencia y en concordancia con los autores, en todos los Bloques T e IN el mayor pico de Ac se detectó a los 30-35 dPI, decreciendo posteriormente para llegar a valores indetectables entre los 80 y 90 dPI que fue el punto final de la experiencia. Por otro lado se pudo observar la detección de Ac, aunque en muy bajos niveles, en los gazapos que mamaron calostro (6).

Como resultado de la infección y la complicación bacteriana secundaria se sucedieron una serie de eventos de similares características que las que cita Tikoo para el bovino, de manera que a partir de los signos clínicos observados a nivel de tracto respiratorio superior, en el modelo experimental se desencadenó una severa neumonía que condujo a la muerte de un animal de la experiencia (1). La reacción de IHQ confirma la detección de antígenos virales y los hallazgos histopatológicos demuestran lesiones típicas compatibles con infecciones bacterianas concomitantes. En relación a la detección de viremia las experiencias realizadas por Fuchs y col. (1999) en bovinos demuestran que el virus es transportado por los leucocitos y puede ser aislado a partir de ellos. Otros autores hacen referencia a que es muy poca la cantidad de partículas virales que se unen o se transportan en los leucocitos y no siempre el AV a partir de los mismos es posible (16). En esta experiencia no fue positivo el AV ni la detección de ADN viral por PCR a partir de las muestras de sangre extraídas. Probablemente en este modelo experimental y para determinar el momento exacto de recuperación viral y la duración de la viremia, deberían haberse tomado las muestras en lapsos mas cortos en las primeras 24 h lo que en este caso constituía un riesgo ya que podría haber llevado a los animales a un aborto espontáneo o muerte por estrés traumático con modificaciones de los resultados. El aborto por BoHV-1 en este modelo experimental sólo se menciona en la bibliografía como un hallazgo casual resultante de la infección por BoHV-1 en conejas ocasionalmente preñadas pero en ningún caso se evaluó como tal para validar el modelo conejo en el estudio de la infección abortigénica. Se cita al aborto por BoHV-1 como un hecho producido en algunas conejas inoculadas por vía intravenosa, sin embargo no se detallan registros de signos clínicos previos al mismo (10). Si analizamos el Bloque de animales IN1 (inoculados 10-15 días anteriores al servicio), los signos clínicos fueron evidentes y la respuesta de Ac permitió confirmar la infección. En todos los animales de este Bloque no hubo palpación gestacional positiva ni parto posterior. Podría suponerse que la acción del virus impidió la concepción y el establecimiento de la gestación. Este hecho se ha observado en el bovino al registrarse bajos índices de preñez como consecuencia de endometritis causada por el virus presente en semen utilizado en inseminación artificial. Esta sería una posible explicación a la falla de preñez en el modelo experimental. En el segundo Bloque de animales (IN2: inoculados en el segundo tercio de la preñez), los signos clínicos fueron coincidentes con aquellos del Bloque IN1. Dos de los animales murieron con evidente signos de neumonía producida por complicaciones bacterianas secundarias. Las

muestras de fetos y neonatos tomadas de todos los animales, aquellos que murieron y los que llegaron al parto normalmente, fueron negativas a AV y PCR y tampoco se observaron lesiones típicas ni CI. Estos datos coinciden también con lo expresado por algunos autores para la infección natural en el bovino en donde demuestran moderadas lesiones en feto aunque no detectan CI ni alteraciones microscópicas que confirmen la infección por BoHV-1 (17). Igual que sucede en el bovino, la muerte fetal podría haber sucedido entre las 24-48 h PI y la demora en la expulsión de los fetos hizo que estuvieran presentes severos signos de autólisis que dificultaron el estudio histológico, el AV y probablemente la detección de ADN viral por PCR. Está bien documentada la relación de los efectos tóxicos y/o inhibitorios que las muestras clínicas pueden ejercer sobre la PCR como así también la pérdida de infectividad de la partícula viral, condición indispensable para ser aislada en cultivos celulares. Los fetos y natimortos analizados de una coneja muerta del Bloque 3 (IN3-a2) no presentaron cambios histológicos patognomónicos.

El aspecto más importante a ser considerado al evaluar al conejo como modelo experimental es la diferente estructura de la placenta en relación con la del bovino, sin embargo pueden ser comparables. En el útero bovino preñado se establece un estrecho contacto entre la placenta epiteliochorial (sindesmochorial) y el feto a través de estructuras denominadas placentomas de manera que esta interdigitación entre la madre y el feto aumenta la superficie de contacto. La bibliografía cita que la ruta del BoHV-1 hacia el feto involucra la ruta sanguínea a través del cordón umbilical ya que en el feto las lesiones primarias se suceden en el hígado (18). En el conejo, en cambio, la placenta es de tipo hematochorial, sin embargo también se sucede el mismo fenómeno produciéndose un estrecho contacto entre la madre y el feto lo que para algunos autores, luego de la mitad de la gestación, estaría dado por el hecho que solo el endotelio fetal separaría a ambos (hemoendotelial) (19). Es por eso que los hallazgos más relevantes, lo constituyen los resultados de los estudios de las placentas de los Bloques 2 y 3 en las que se observaron focos necróticos alternados con zonas de hiperemia y otras de autólisis. Esto es coincidente con los datos aportados por Gibbs para el bovino quien cita que los cotiledones pueden presentar lesiones degenerativas aunque no son patognomónicas (20). Las lesiones histológicas observadas en la placenta de bovinos infectados con BoHV-1 revelan además marcado edema perivascular y extensiva necrosis coagulativa en el corioalantoides, lo que conduce a un severo y gradual cese de la circulación placentar llevando al desprendimiento de la misma y al aborto subsecuente, sin obser-

vación de lesiones típicas virales en el feto. Por otro lado, hallazgos detallados por Smith (1997) revelan evidencias de AV en placenta a pesar de ausencia de lesiones. El mismo autor cita que en el caso de otros herpesvirus como el que produce el aborto equino también se observaron abortos sin poder aislarse virus de las placentas las que a veces tampoco presentaban lesiones (18). En este trabajo el AV no fue positivo, sin embargo el dato más significativo de este estudio es la detección de ADN viral a partir de las muestras de placentas lo que confirma el pasaje del virus a través de la misma.

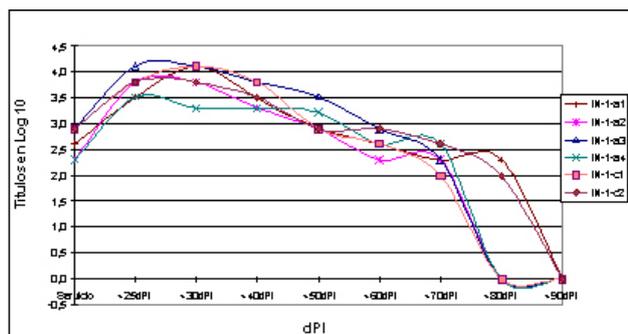


Gráfico I: Curva de anticuerpos obtenidos por ELISA correspondiente a los animales del Bloque IN1 (inoculación previa al servicio). Los datos correspondientes a 30-45 días post infección (dPI) fueron arreglados para la muestras no determinadas, tomando un promedio entre los valores anteriores y posteriores para suavizar la curva, de manera de no mostrar un dato falseado. Los títulos fueron transformados en log base 10

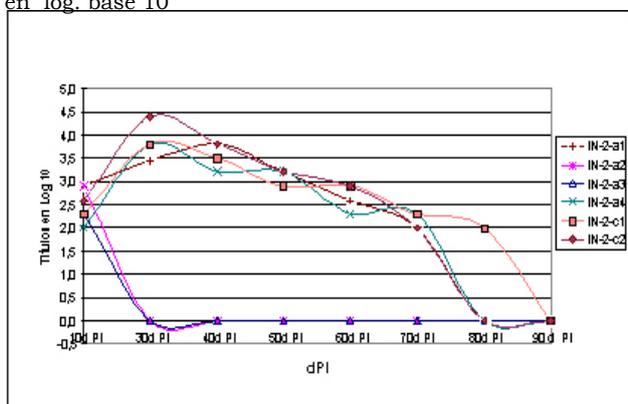


Gráfico II: Curva de anticuerpos obtenidos por ELISA correspondiente a los animales del Bloque IN2 (inoculación en el 2° tercio de preñez). Los títulos fueron transformados en log base 10.

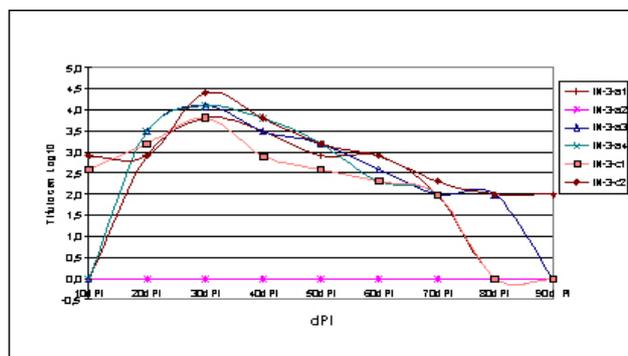


Gráfico III: Curva de anticuerpos obtenidos por ELISA correspondiente a los animales del Bloque IN3 (inoculación en el 3° tercio de preñez). Los títulos fueron transformados en log base 10.

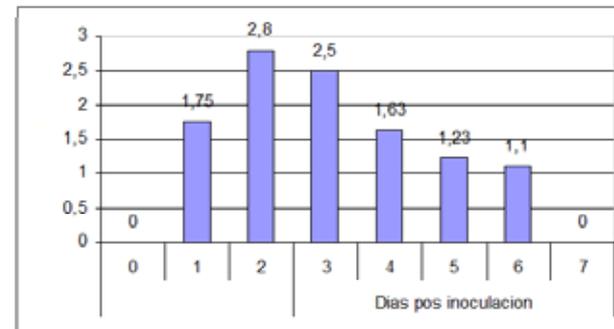


Gráfico IV: Representación gráfica del promedio de los títulos virales obtenidos y expresados como DIC50%/50µl (eje vertical), a partir de los hisopos tomados de los animales inoculados del Bloque IN1 y a diferentes días post infección (dPI) ( $p \leq 0.5$  entre los dPI por cada animal)

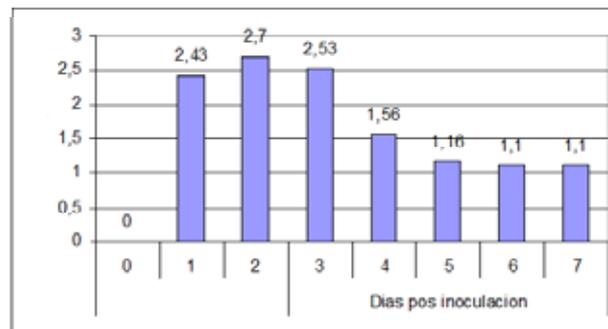


Gráfico V: Representación gráfica del promedio de los títulos virales obtenidos y expresados como DIC50%/50µl (eje vertical), a partir de los hisopos tomados de los animales inoculados del Bloque IN2 y a diferentes días post infección (dPI) ( $p \leq 0.5$  entre los dPI por cada animal)

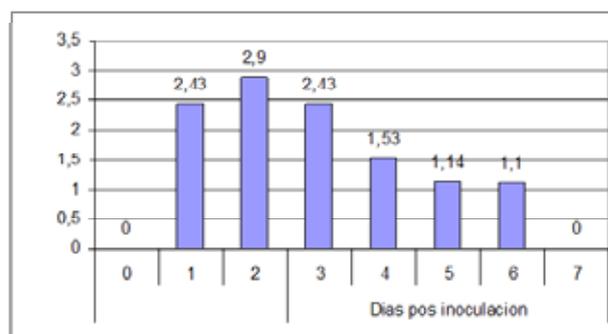


Gráfico VI: Representación gráfica del promedio de los títulos virales obtenidos y expresados como DIC50%/50µl (eje vertical), a partir de los hisopos tomados de los animales inoculados del Bloque IN3 y a diferentes días post infección (dPI) ( $p \leq 0.5$  entre los dPI por cada animal)

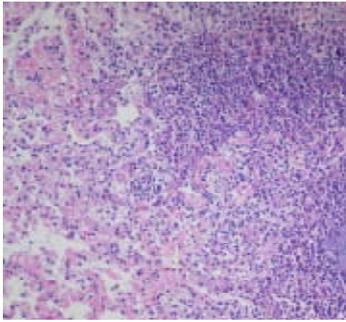


Figura 1: Pulmón de la coneja IN2-a2. Neumonía supurativa. HE (Obj.20X)

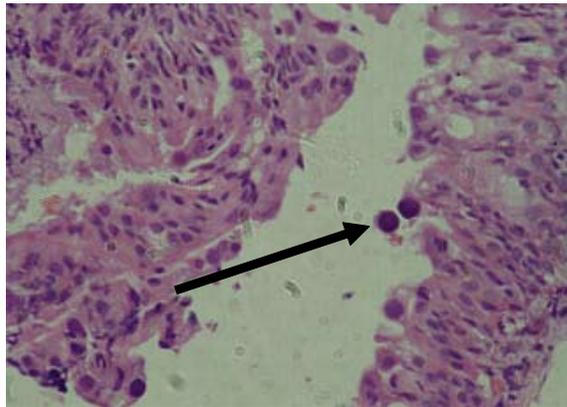


Figura 2: Cornete nasal de la coneja IN3-a2. Se observan cuerpos de inclusión intranucleares (flecha), redondos e intensamente basofílicos. HE (Obj.40X)

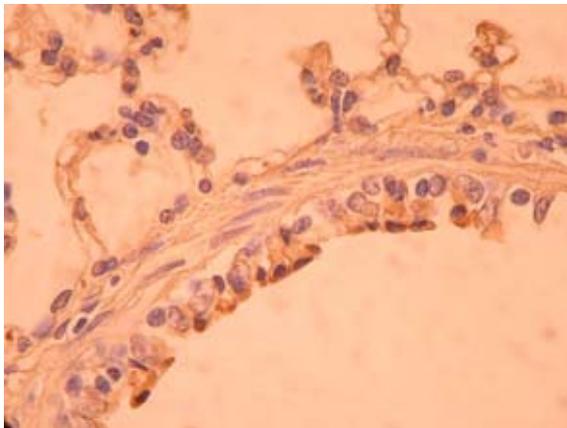


Figura 3: Inmunohistoquímica de cortes de pulmón de la coneja IN3-a2. Se observa inmunomarcación positiva en las células de la mucosa del bronquiolo (Obj. 40X).

## AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo resume la Tesis doctoral del MV Alejandro Valera dirigida por la Dra Cecilia M Galosi y financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Plata y por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia de Bs As. Los autores agradecen a la Dra Cecilia Carbone (Cátedra de Animales de Laboratorio y Bioterio) por facilitar las instalaciones para realizar la experiencia, al Dr Claudio Barbeito (Cátedras de Histología y Embriología y Patología general) por la bibliografía específica provista y a la Dra Cristina Seki (Centro de Virología Animal -CEVAN-) por ceder el Anticuerpo monoclonal utilizado en este estudio. Un especial agradecimiento al MV Raul Lacchini y al Sr Alejandro Grattoni (Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales) por la gentil colaboración en la provisión y manejo de los animales.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Tikoo S, Campos M, Babiuk L. Bovine herpesvirus 1 (BHV-1): biology, pathogenesis and control. *Adv Virus Res* 1995; 45: 191-223.
2. Mc Kercher DG. Viruses of other vertebrates. En: AS Kaplan, editor. *The Herpesviruses*. (New York, Estados Unidos) Academic Press Inc, 1973; p. 429-441.
3. Rock DL, Beam SL, Mayfield. Mapping bovine herpesvirus type 1 latency-related RNA in trigeminal ganglia of latently infected rabbits. *J Virol* 1987; 61(12): 3827-3831.
4. Rock DL, Reed DE. Persistent infection with bovine herpesvirus type 1: rabbit model. *Inf. and Immun* 1982; 35 (1): 372-373.
5. Spilki FR, Esteves PA, Fanco AC, Lima M, Holz CL, Batista HBR, et al. Neurovirulencia e neuroinvasividade de herpesvirus bovinos tipo 1 e 5 em coelhos. *Pesq Vet Braz* 2002; 22 (2): 58-63.
6. Honda E, Taniguchi T, Watanabe M, Kumagai T. Detection of bovine rhinotracheitis virus antibody by neutralizing test and ELISA in experimentally infected rabbits. *J Vet Med B* 1991; 38: 55-59.
7. Brown GA and Field HJ. A reliable method for establishing viral infection in the rabbit by intranasal inoculation. *J Virol Methods* 1990; 27 (3): 341-346.
8. Chowdhury SI, Lee BJ, Mosier D, Sur JH, Osorio FA, Kennedy G et al. Neuropathology of Bovine Herpesvirus Type 5 (BHV-5). Meningo-encephalitis in rabbit seizure model. *J Comp Pathol* 1997; 117: 295-310.
9. Kelly DF. Experimental infection of rabbits with the virus of infectious bovine rhinotracheitis. *Braz J Exp Pathol* 1977; 58: 168-176.
10. Lupton HW, Barnes H J, Reed DE. Evaluation of the rabbit as a laboratory model for infectious bovine rhinotracheitis virus infection. *Cornell Vet* 1980; 70 (1): 77-95.
11. Iwai H, Kodera A, Sekiya N, Nakamura A, Kirisawa R. Effect of Equid herpesvirus 1 infection on parturition of mice. *J Eq Vet Sci* 1998; 9: 25-27.
12. Valera AR, Pidone CL, Massone AR, Quiroga MA, Riganti JG, Corva SG, Galosi CM. A simple method of infecting rabbits with *Bovine herpesvirus 1* and 5. *J Virol Methods* 2008; 150: 77-79.
13. Valera AR, Galosi CM, Echeverría MG, Silvestrini MP, Romero JR, Noretto EO. Desarrollo y Estandarización de un ELISA indirecto para la detección de anticuerpos contra el herpesvirus bovino tipo 1. *Avances en Medicina Veterinaria* 1999; 13 (1): 21-24.
14. Márquez Rosa de Jesús. Determinación de la cultura sobre el uso de los animales de laboratorio existentes en los investigadores de la Universidad de los Andes. [Tesis doctoral]. Mérida. Venezuela. Universidad de los Andes. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. 1997.
15. Beltrão N, Flores EF, Weiblen R, da Silva AM, Roehe PM, Irigoyen LF. Infecção e enfermidade neurológica pelo herpesvírus bovino tipo 5 (BHV-5): coelhos como modelo experimental. *Pesq Vet Brás* 2000; 20 (4): 144-150.
16. Fuchs M, Hubert P, Detterer J, Rziha HJ. Detection of bovine herpesvirus type 1 in blood from naturally infected cattle by using a sensitive PCR that discriminates between wild-type virus and virus lacking glycoprotein E. *J Clin Microbiol* 1999; 37 (8): 2498-2507.
17. Owen NV, Chow TL, Molello JA. Bovine fetal lesions experimentally produced by infectious bovine rhinotracheitis virus. *Am J Vet Res* 1964; 25: 1617-1626.
18. Smith KC. Herpesviral abortion in domestic animals. *Review Vet J* 1997; 153: 253-268.
19. Björkman N, Dantzer V, and Leiser R. Comparative placental infection in laboratory animals. A review. *Scand J Lab Anim Sci.* 1989; 4: 129-158.
20. Gibbs EPJ, Rweyemamu MM. Bovine herpesviruses. *Vet Bulletin.* 1977; 47 (1): 317-332.

## COMPORTAMIENTO DINÁMICO DEL PESO CORPORAL TEMPRANO EN POLLOS DE CARNE CON DIFERENTE EDAD AL MISMO PESO OBJETIVO DE FAENA

Romera BM<sup>1</sup>, Canet ZE<sup>1,3</sup>, Antruejo AE<sup>2</sup>, Dottavio AM<sup>1,4</sup>, Di Masso RJ<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Genética, <sup>2</sup>Cátedra de Producción Avícola y Pilíferos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de Rosario. <sup>4</sup>CIC-UNR.

**RESUMEN:** Con el objetivo de caracterizar el comportamiento del peso corporal en dos poblaciones de pollos de crecimiento lento (híbrido simple Casilda CP y Campero INTA) en comparación con el parrillero comercial Cobb 500, se pesaron en forma individual, a intervalos semanales entre el nacimiento y la faena, 20 machos y 20 hembras de cada grupo. Los datos peso corporal - edad se ajustaron a un modelo exponencial creciente y los valores de los estimadores de los parámetros  $S$  (valor de inicio) y  $k$  (tasa de crecimiento) correspondientes a cada ave se utilizaron como nuevas variables aleatorias. En ambos sexos Cobb 500 mostró mayor valor de  $S$  sin que se observaran diferencias significativas entre los grupos de crecimiento lento. No se observaron diferencias significativas entre grupos en los valores de  $k$ . La intensa selección por velocidad de crecimiento aplicada a las poblaciones de reproductores pesados, responsable de la reducción del número de días requerido para alcanzar un determinado peso objetivo de faena, habría afectado la regulación del proceso en un nivel muy primario de la cadena de eventos vinculados con la fenogénesis del peso corporal, fijando un nivel más elevado de esta variable respuesta sin modificar la tasa de crecimiento relativo.

**Palabras clave:** peso corporal inicial, peso objetivo de faena, función exponencial, tasa de crecimiento, pollo campero

## DYNAMIC BEHAVIOR OF EARLY BODY WEIGHT IN MEAT TYPE CHICKENS WITH DIFFERENT AGE AT THE SAME TARGET SLAUGHTER WEIGHT

**ABSTRACT:** In order to characterize the dynamic behavior of body weight in two populations of slow-growing chickens (Casilda CP and Campero INTA) compared to the commercial broiler Cobb 500; 20 males and 20 females of each group were weighed individually at weekly intervals between birth and slaughter. Body weight-age data were fit to an exponential model and the values of the parameter estimates,  $S$  (start value) and  $k$  (growth rate), for each bird were used as new random variables. In both sexes Cobb 500 showed a higher value of  $S$  than Casilda CP y Campero INTA with no apparent differences between the groups of slow growth. There were no significant differences among groups in  $k$  values. Artificial selection for growth rate applied to heavy breeders populations, responsible for reducing the number of days required to reach a target slaughter weight, would have affected the regulation of the process in a very primary level of the chain of events linked to body weight phenogenesis, setting a higher level of this variable response without changing the relative growth rate.

**Key words:** initial body weight, target slaughter weight, exponential function, growth rate, free-range chicken

Fecha de recepción: 10/02/11

Fecha de aprobación: 03/10/11

**Dirección para correspondencia:** Bernardo Martín Romera, Av. Ovidio Lagos y Ruta 33, 2170 Casilda.

<sup>3</sup>Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, EEA Pergamino.

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

## INTRODUCCIÓN

La intensa presión de selección por velocidad de crecimiento aplicada en el mejoramiento genético de las poblaciones de pollos para carne permitió, en un lapso de 30 años (1960 – 1990), reducir a razón de un día por año la edad de faena y aumentar entre el 250 y el 300 % el peso a la edad de sacrificio (1, 2, 3).

Si bien esta respuesta directa a la selección representa una de las principales razones que permitieron transformar a la carne de pollo en un producto más barato y por ende en una fuente de proteína de calidad accesible a una mayor franja de la población, la misma estuvo acompañada de un conjunto de respuestas correlacionadas consideradas indeseables que han puesto en serio compromiso el bienestar de las aves (4, 5, 6, 7) y establecido un límite al mejoramiento posible en base a los criterios de selección habituales (8).

Frente al modelo productivo vigente, de naturaleza intensiva, altamente integrado y que prioriza la productividad individual lograda en base a la aplicación de estos criterios de selección, han surgido otras propuestas de producción avícola, bajo diferentes denominaciones tales como orgánica o ecológica, destinadas a cubrir la demanda de un nicho creciente de mercado. Esta modalidad productiva, de naturaleza semi-intensiva, requiere de un tipo particular de ave, más rústica, que alcance el peso objetivo de faena a mayor edad cronológica y con mayor madurez que el “*broiler*” o parrillero industrial. En nuestro país el INTA desarrolló un ave de este tipo denominada Campero (9), de crecimiento lento y plumaje variado, buen desarrollo de pechuga y carne firme, de sobresalientes características organolépticas, cuya producción se lleva a cabo bajo normas protocolizadas (10).

El objetivo de este trabajo fue caracterizar el comportamiento dinámico del peso corporal temprano en dos poblaciones de pollos camperos de crecimiento lento, el híbrido experimental Casilda CP generado en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de Rosario y el híbrido Campero INTA producido y distribuido por la Sección Avicultura de la EEA INTA Pergamino, en comparación con el parrillero comercial Cobb 500, todos ellos mantenidos en las condiciones de cría establecidas por el protocolo de producción del Pollo Campero INTA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### AVES

Las aves utilizadas en este ensayo pertenecían a los siguientes tres grupos genéticos:

- Híbrido simple experimental Casilda CP (gallos Cornish Blanco x gallinas Plymouth Rock Barrada),
- Campero INTA (estirpe paterna AS x estirpe materna E)

- Cobb 500 (parrillero híbrido comercial)

Todas las aves se produjeron en la EEA Pergamino de INTA. El día de la eclosión los pollitos BB se sexaron (Casilda CP y Campero INTA por cloaca y Cobb 500 por velocidad de emplume), se identificaron con banda alar y se vacunaron contra Marek.

Las aves se criaron a galpón, como un único grupo, con una densidad inicial de 8 animales por m<sup>2</sup>. Esta etapa de cría se extendió hasta los 28 días de edad en el caso de Cobb 500 y hasta los 35 días en el caso de Campero INTA y Casilda CP. Durante ese lapso las aves en crecimiento se mantuvieron con un fotoperíodo de 16 h y un ciclo mínimo de oscuridad de 8 h. En las primeras semanas de vida la temperatura ambiente del galpón se reguló en 33 °C para ir luego disminuyendo paulatinamente a razón de tres grados por semana hasta llegar a 21 °C. A partir del día 29 o 36, según el grupo genético, 40 animales (20 machos y 20 hembras) elegidos al azar de cada una de las respectivas poblaciones, se trasladaron a corrales con acceso a parque, con una densidad de 2 aves por m<sup>2</sup>, donde permanecieron hasta alcanzar el peso objetivo de faena de 2500 g para los machos y 2200 g para las hembras.

Durante su permanencia en el experimento las aves recibieron *ad libitum* alimento balanceado formulado especialmente para pollo Campero de acuerdo con el siguiente detalle: Iniciador (2860 kcal EM, 18,5 % PB, 1 % Ca y 0,44 % P), Crecimiento (2840 kcal EM, 17,5 % PB, 0,77 % Ca y 0,58 % P) y Terminador (2870 kcal EM, 16 % PB 0,85 % Ca y 0,38 % P). El lapso de alimentación con cada uno de estos alimentos se determinó en función de los siguientes rangos de peso corporal: Iniciador (nacimiento-1000 g en machos y nacimiento-800 g en hembras); Crecimiento (1000-2000 g en machos y 800-1800 g en hembras); Terminador (2000 g-peso objetivo de faena en machos y 1800 g-peso objetivo de faena en hembras) correspondientes a los siguientes intervalos de edades: Casilda CP y Campero INTA -Iniciador (nacimiento - 35 días, cría a galpón), Crecimiento (36 - 56 días) y Terminador (57 - 70 días) y Cobb 500 - Iniciador (nacimiento-28 días, cría a galpón), Crecimiento (29-42 días) y Terminador (43 a 56 días).

El manejo sanitario incluyó el plan mínimo de vacunaciones establecido por el protocolo de producción del pollo Campero INTA.

Todas las aves se pesaron en forma individual, a intervalos semanales, con aproximación al gramo hasta su traslado a parque, y con aproximación a los 10 g desde ese momento hasta la faena.

Los datos longitudinales peso corporal (g) - edad cronológica (días) se ajustaron por regresión no lineal a un modelo exponencial creciente del tipo:

$$W_t = S * \exp (k*t)$$

donde  $W_t$  = peso corporal (g) en el tiempo  $t$ ,  $S$  = valor de inicio,  $k$  = tasa de crecimiento exponencial y  $t$  = edad cronológica en semanas.

La bondad del ajuste se evaluó con tres criterios: la convergencia en una solución, el valor del coeficiente de determinación no lineal ( $R^2$ ) y la aleatoriedad de los residuales determinada con un test de rachas (11).

Los valores de los estimadores de los parámetros  $S$  y  $k$  correspondientes a cada ave se utilizaron como nuevas variables aleatorias.

### ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El efecto del grupo genético, el sexo y la correspondiente interacción simple (grupo genético x sexo) se evaluó con un análisis de la variancia correspondiente a un diseño factorial 3 x 2 (tres grupos genéticos x dos sexos).

El efecto del grupo genético dentro de sexo se evaluó con un análisis de la variancia a un criterio de clasificación seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey.

Las diferencias entre grupos genéticos, en cada sexo por separado, en la relación entre el peso corporal inicial (en el día de la eclosión) y el estimador del parámetro  $S$  se evaluaron con un análisis de la covariancia.

### RESULTADOS

La Tabla 1 muestra los valores del peso corporal inicial y de los estimadores de los parámetros de la función exponencial creciente en machos y hembras de los tres grupos analizados.

Los datos mostraron un comportamiento compatible con el modelo propuesto de acuerdo con los valores calculados del coeficiente de determinación no lineal ( $0,86 \leq R^2 \leq 0,99$ ) y el resultado del test de aleatoriedad de los residuales que en todos los casos mostró ausencia de desviaciones significativas ( $P > 0,05$ ) respecto del modelo planteado.

Tanto en machos como en hembras las aves Cobb 500 mostraron mayor valor del parámetro  $S$  sin que se observaran diferencias significativas entre los dos grupos de crecimiento lento. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupos en los valores promedio de  $k$ .

Casilda CP presentó el menor peso inicial, Cobb 500 el mayor y Campero INTA valores intermedios. Todas estas diferencias fueron estadísticamente significativas y comunes a ambos sexos.

La Tabla 2 resume el significado de los efectos directos del grupo genético, del sexo y de la interacción simple entre ambos. Cada uno de los dos estimadores presentó un comportamiento particular. En el caso del parámetro  $S$  se observó

Tabla 1. Estimadores de los parámetros de la función exponencial y peso corporal inicial en machos y hembras de tres poblaciones de aves para carne con diferente edad cronológica al peso objetivo de faena.

	Machos			Hembras		
	Casilda CP	Campero INTA	Cobb 500	Casilda CP	Campero INTA	Cobb 500
<b>Parámetro S</b>	113,3 a ± 3,68	121,4 a ± 3,45	228,0 b ± 8,90	118,8 a ± 3,42	109,1 a ± 2,71	218,0 b ± 8,71
<b>Parámetro k</b>	0,3875 a ± 0,0029	0,3828 a ± 0,0031	0,3858 a ± 0,0048	0,3541 a ± 0,0034	0,3544 a ± 0,0026	0,3723 a ± 0,0056
<b>Peso corporal inicial (g)</b>	34,4 a ± 0,37	40,5 b ± 0,52	47,8 c ± 0,81	33,3 a ± 0,44	40,5 b ± 0,54	47,6 c ± 0,59

Todos los valores corresponden a la media aritmética ± error estándar  
 Tamaño muestral: n = 20 aves por grupo.  
 a,b,c Valores con diferente letra difieren al menos al 0,05

Tabla 2. Efectos del grupo genético, el sexo y de la interacción simple (grupo genético x sexo) sobre los estimadores de los parámetros de la función exponencial creciente y sobre el peso corporal a la eclosión, en pollos con diferente edad al mismo peso objetivo de faena

	Efecto Grupo Genético	Efecto Sexo	Efecto Interacción
<b>Parámetro S</b>	F = 208 P < 0,0001	F = 1,28 P = 0,2612	F = 1,27 P = 0,2847
<b>Parámetro k</b>	F = 3,39 P = 0,037	F = 52,7 P < 0,0001	F = 3,00 P = 0,05
<b>Peso corporal inicial</b>	F = 304 P < 0,0001	F = 0,89 P = 0,3472	F = 0,54 P = 0,5825

un efecto significativo del grupo genético correspondiendo mayores valores a las aves Cobb 500, sin diferencias significativas entre Casilda CP y Campero INTA. El efecto sexo no fue significativo al igual que la respectiva interacción simple. Los tres efectos segregados resultaron estadísticamente significativos en el caso del parámetro k. La diferencia más notoria se observó entre sexos correspondiendo mayores valores a los machos. El efecto del grupo genético y el efecto de la interacción resultan del comportamiento de las hembras Cobb 500 que tendieron a parecerse más a los machos del mismo grupo que en el caso de las otras dos poblaciones consideradas.

Los ajustes lineales entre los valores individuales del estimador del parámetro S y el peso de los pollitos de un día indicaron, en todos los casos, ausencia de pendientes ( $b \pm Sb$ ) significativamente diferentes de cero (Machos - Casilda CP:  $1,416 \pm 1,167$ ; Campero INTA:  $0,3272 \pm 0,7435$  y Cobb 500:  $2,417 \pm 1,506$ ; Hembras - Casilda CP:  $0,0850 \pm 1,068$ ; Campero INTA:  $0,650 \pm 0,7435$  y Cobb 500:  $-0,1471 \pm 2,404$ ). La ausencia de diferencias significativas entre las pendientes (Machos:  $F = 1,140$ ,  $P = 0,323$ ; Hembras:  $F = 0,082$ ,  $P = 0,921$ ) permitió calcular una pendiente común para las aves de cada sexo (Machos:  $1,2635$ ; Hembras:  $0,270$ ) y comparar las alturas constatando un efecto significativo del grupo genético en cada uno de los sexos (Machos:  $F = 81,5$ ;  $P < 0,0001$  - Hembras:  $F = 70,2$ ;  $P < 0,0001$ ).

Las Figuras 1 y 2 muestran los ajustes exponenciales promedio correspondientes a machos y hembras, respectivamente.

Las Figuras 3 y 4 muestran la relación entre el valor del parámetro S y el peso corporal inicial en machos y hembras, respectivamente.

## DISCUSIÓN

Si bien el pollo Campero se considera un tipo de ave de crecimiento lento (12), dicha denominación se justifica en relación a la dinámica de crecimiento de las diferentes variantes genéticas

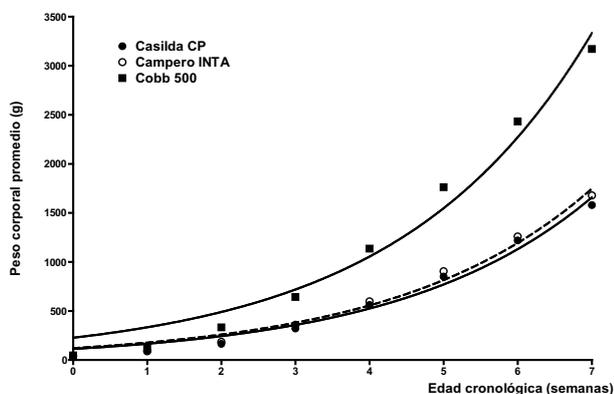


Figura 1. Crecimiento exponencial inicial en machos de tres grupos genéticos de aves con diferente edad al mismo peso objetivo de faena.

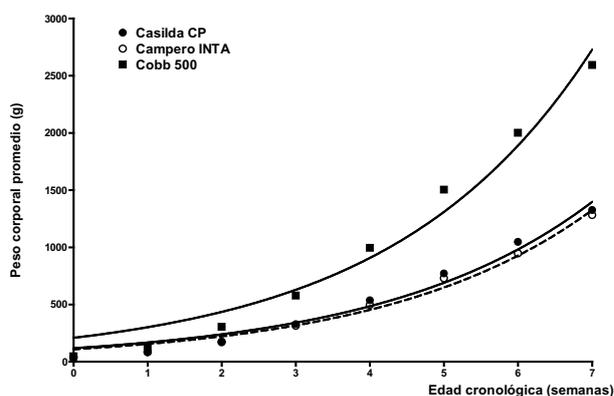


Figura 2. Crecimiento exponencial inicial en hembras de tres grupos genéticos de aves con diferente edad al mismo peso objetivo de faena.

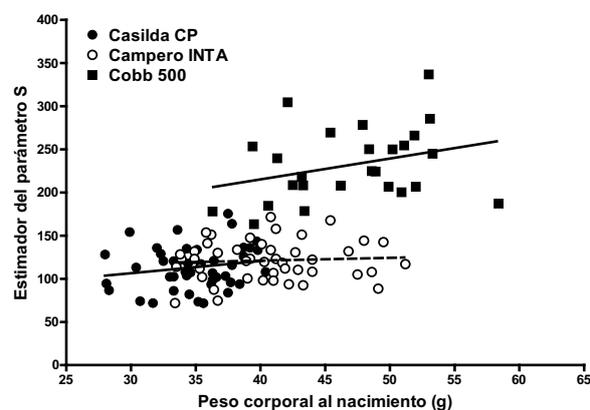


Figura 3. Relación entre el valor del parámetro S de la función exponencial y el peso corporal al nacimiento en machos de tres grupos genéticos de aves con diferente edad al mismo peso objetivo de faena.

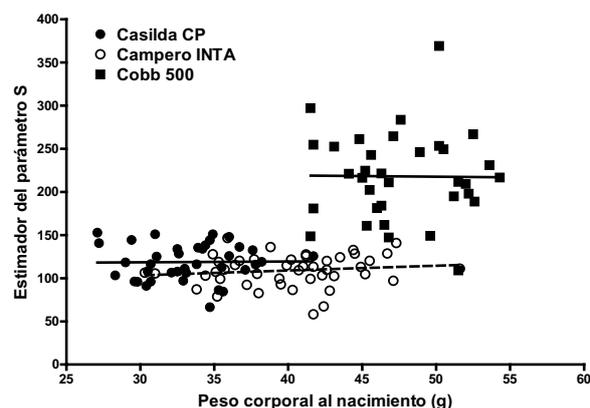


Figura 4. Relación entre el valor del parámetro S de la función exponencial y el peso corporal al nacimiento en hembras de tres grupos genéticos de aves con diferente edad al mismo peso objetivo de faena.

de parrilleros comerciales que, en todos los casos alcanzan el peso objetivo de faena a una menor edad cronológica. Esta observación es válida tanto para Campero INTA como para el híbrido simple experimental utilizado en este ensayo dado

que ambos requieren algo más de dos semanas (70 vs. 51 días) adicionales para ser faenados al mismo peso promedio que Cobb 500.

El comportamiento exponencial creciente del peso corporal en el intervalo de edades consideradas puede equipararse, utilizando una analogía ya clásica, a un caso de interés compuesto en el que dada una inversión inicial al cabo de un determinado tiempo el interés devengado se suma al capital disponible para que esa nueva cantidad acumulada genere más intereses. La particularidad del proceso biológico analizado es que los intereses se capitalizan no en plazos preestipulados sino en forma continua de manera tal que el peso corporal acumulado en un momento dado del ciclo de vida es igual al peso inicial (S) multiplicado por la constante  $k$  -que es función de la tasa de interés, es decir, de la tasa de crecimiento- y que es la base de una potencia del tiempo ( $k^t$ ).

Los resultados informados en este trabajo indican que los genotipos analizados no difieren en su tasa de crecimiento relativo es decir que incrementan su biomasa en una cantidad similar por unidad de peso corporal acumulado y por unidad de tiempo. La diferencia en la velocidad de crecimiento absoluta -mayor ganancia diaria de peso- puesta de manifiesto por Cobb 500, que le permite alcanzar el peso objetivo de faena a menor edad cronológica, se debe a que estas aves disponen de un mayor capital inicial a partir del cual acumulan intereses con la misma tasa.

Dada la imposibilidad de disponer de datos longitudinales peso corporal-edad cronológica previos al nacimiento, los ajustes analizados corresponden al período de crecimiento post-eclosión temprano y utilizan como valor correspondiente al tiempo cero, el peso corporal registrado dentro de las 24 h de vida.

Los tres grupos de aves comienzan la porción analizable del proceso con diferente peso. Ese valor de inicio puede pensarse con dos criterios. El primero de ellos, el más obvio, es que las diferencias observadas al nacimiento no son más que el reflejo de un proceso no accesible a la medición comenzado 21 días antes en el que, dadas las diferencias en el valor del parámetro S y la falta de diferencia en los valores del parámetro  $k$ , el capital disponible al nacimiento es diferente en cada caso. Si bien esta explicación puede resultar satisfactoria si se compara el comportamiento de Cobb 500 con el de cualquiera de los otros dos genotipos, deja de serlo si se comparan las dos poblaciones de crecimiento lento dado que en este caso se observan diferencias significativas en el peso corporal al nacimiento pese a la ausencia de diferencias significativas en los valores promedio de S.

El segundo criterio es menos evidente en tanto supone una inversión de la relación causa-

efecto analizada, no desde un punto de vista biológico sino en relación al ajuste analizado. El interrogante planteado es si el valor estimado del parámetro S es función del peso corporal registrado al inicio del ensayo y utilizado como primer dato en el ajuste. Los resultados derivados de este razonamiento indican que pese a las diferencias significativas observadas en los pesos corporales iniciales entre las dos poblaciones caracterizadas como de crecimiento lento, la relación estudiada puede resumirse en una ecuación común a ambas dada la ausencia de diferencias tanto en las pendientes como en las alturas de las respectivas rectas de regresión. La inclusión de Cobb 500 en esta comparación muestra que, si bien al igual que en el caso anterior las diferencias en el peso corporal inicial de las aves de este grupo genético no guardan relación con los valores de los estimadores del parámetro S (pendiente no significativa), hay una evidente diferencia en las alturas (ordenadas) de las rectas de regresión. De esta manera, aves de diferente grupo, con el mismo peso al nacimiento presentan diferencias marcadas en el valor del parámetro S. Esta particularidad permite especular que la diferente edad para alcanzar el mismo peso objetivo de faena estaría relacionada con determinantes propios de las líneas de reproductores pesados.

La selección artificial es una estrategia de mejoramiento que actúa como una caja negra. Conocemos la entrada en tanto definimos los criterios a utilizar y medimos la salida en términos de respuestas directas y correlacionadas, pero desconocemos la complejidad de los procesos que, en el interior del animal, llevan a ese resultado. En este contexto, la intensa selección por velocidad de crecimiento a la que se han visto sometidas las poblaciones de reproductores pesados destinadas a la producción de pollos parrilleros, es mensurable en su aspecto más obvio que es la tasa de crecimiento y, por ende, expresable en términos de un indicador simplificado como es el número de días requerido para alcanzar un determinado peso objetivo. Dicha estrategia pareciera haber alterado la regulación del proceso en un nivel muy primario de la cadena de eventos vinculados con la fenogénesis del peso corporal, fijando un nivel más elevado de esta variable respuesta, lo que explicaría la multiplicidad de modificaciones observadas. Esta modificación no es evidente en el caso de las poblaciones de crecimiento lento que, pese a expresar una velocidad de crecimiento relativo similar, no muestran los niveles de alteración de la homeostasis fisiológica descritos para las poblaciones de crecimiento rápido.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Marks HL. Growth rate and feed intake of selected and unselected broilers. Growth 1979; 43: 80-90.

**M. Romera y col.**

2. Chambers JR, Gavora, JS, Fortin A. Genetic changes in meat type chickens in the last twenty years. *Can. J. Anim. Sci.* 1981; 61: 555-563.
3. Havenstein GB, Ferket PR, Scheider SE, Larson BT. Growth, livability, and feed conversion of 1957 vs 1991 broilers when fed "typical" 1957 and 1991 broiler diets. *Poult. Sci.* 1994; 73: 1785-1794.
4. Scheele CW. Pathological changes in metabolism of poultry related to increasing production levels. *Vet. Q.* 1997, 19:127-130.
5. Yunis R, Ben-David A, Heller ED, Cahaner A. Immunocompetence and viability under commercial conditions of broiler groups differing in growth rate and in antibody response to *Escherichia coli* vaccine. *Poult. Sci.* 2000; 79:810-816.
6. Koenen ME, Boonstra-Blom AG, Jeurissen SHM. Immunological differences between layer- and broiler-type chickens. *Vet Immunol Immunopath* 2002; 89: 47-56.
7. Cheema MA, Qureshi MA, Havenstein GB. A comparison of the immune response of a 2001 commercial broiler with a 1957 randombred broiler strain when fed representative 1957 and 2001 broiler diets. *Poult. Sci.* 2003; 82:1519-1529.
8. Emmerson, DA. Commercial approaches to genetic selection for growth and feed conversion in domestic poultry *Poult. Sci.* 1997; 76: 1121-1125.
9. Bonino M, Canet ZE. *El pollo y el huevo campero*. INTA, 1999.
10. Bonino, M.F. *Pollo Campero. Protocolo para la certificación*. INTA EEA Pergamino, 1997.
11. Sheskin, D.J. *Handbook of parametric and nonparametric statistical procedures*. Chapman & Hall. USA. 2000.
12. Dottavio AM, Álvarez M, Canet ZE, Font MT, Di Masso RJ. Patrón de crecimiento de híbridos experimentales para la producción de pollo campero. *Rev. Arg. Prod. Anim.* 2007; 27 (2): 75-82.

# ESTANDARIZACIÓN DE LA ESPECTROFOTOMETRÍA PARA LA MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN SEMINAL EN EL PERRO DOMÉSTICO

Díaz JD, Valiente C, Corrada Y, Gobello C.

Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

**RESUMEN:** Los objetivos de este trabajo fueron: determinar la repetibilidad de las lecturas seminales realizadas con el espectrofotómetro y compararlas con aquellas del hemocitómetro, realizar una curva de estandarización de lectura espectrofotométrica de concentración seminal y, finalmente, correlacionar los resultados obtenidos por ambos métodos en la especie canina. Con este fin se evaluaron 9 eyaculados de 5 perros machos reproductivamente aptos. Cada uno de los eyaculados se fraccionó en cuatro partes iguales las que posteriormente se diluyeron 1:25, 1:50, y 1:75 en agua destilada, dejando una de las fracciones sin diluir. Se realizaron tres lecturas consecutivas con cada uno de los métodos. Se calculó la repetibilidad de cada método y el coeficiente de correlación entre ambos. Así, los coeficientes de variación fueron 7,8% y 16,9% para el espectrofotómetro y el hemocitómetro, respectivamente y el coeficiente de correlación entre la absorbancia y la concentración fue de  $r = 0,89$  ( $p < 0,01$ ). Estos hallazgos reivindican el uso de la espectrofotometría en la especie canina como un método no solo rápido y económico sino también con una precisión aceptable.

**Palabras Clave:** canino, espermatozoide, semen, hemocitometría, espectrofotometría.

## STANDARDIZATION OF SPECTROPHOTOMETRY FOR THE ASSESSMENT OF SPERM CONCENTRATION IN THE DOMESTIC DOG

**ABSTRACT:** The aims of this study were to determine the repeatability of semen measures carried out by spectrophotometry and to compare them with that of the hemocytometer, to design a standard spectrophotometric curve for canine seminal concentration, and to correlate results obtained by both methods. For these purposes, 9 ejaculates were obtained from 5 normal male dogs. Each ejaculate was divided into four parts, and then diluted 1:25, 1:50, 1:75 in distilled water; the last fraction was not diluted. All the samples were measured three consecutive times by each method. Repeatability and correlation coefficient were calculated for both methods. The coefficient of variation of the spectrophotometer and hemocytometer was 7.8 % and 16.9 %, respectively and the correlation between absorbance and sperm count was  $r = 0.89$  ( $p < 0.01$ ). These findings further present spectrophotometry not only as a rapid and low cost method but also precise for semen evaluation in this species.

**Key words:** canine, spermatozoo, semen, hemocytometry, spectrophotometry.

Fecha de recepción: 19/04/11

Fecha de aprobación: 20/11/11

**Dirección para correspondencia:** J. D. Díaz, Laboratorio de Fisiología Reproductiva. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

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

## INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de la hemocitometría produjo un hito en la evaluación de la calidad seminal del macho. Desde entonces esta técnica se ha llamado oficialmente por la OMS como el "gold standard" para el conteo espermático (1). No obstante, a pesar de la fe depositada en ella, son varias las limitaciones observadas desde su descubrimiento, tales como el tiempo insumido en la ejecución de la misma (2), la variación de resultados entre los diferentes hemocitómetros disponibles (3), e incluso entre dos conteos de una misma muestra en el mismo hemocitómetro (4) o entre distintos operadores (5). En base a esto, surge la necesidad de mejorar la técnica y las herramientas disponibles para el conteo espermático, lo que fomentó el desarrollo de dispositivos con un grado mayor de eficiencia. Es así, que hoy en día se ofrecen al mercado numerosos equipos; entre ellos pueden mencionarse como los más usados, el CASA (Computer-Assisted Semen Analyzer) y el Spermacue® de Minitub, como así también un nuevo y prometedor método, la citometría de flujo. Algunos de estos dispositivos han logrado vencer los inconvenientes de la hemocitometría, pero presentan otra importante restricción a tener en cuenta: su elevado costo.

El espermatocrito por ejemplo, es una técnica práctica y económica, pero no ha podido ser reproducida en caninos (6).

Por otra parte, el espectrofotómetro convencional además de ser un equipo de bajo costo, permite con un mínimo entrenamiento medir en pocos minutos (2 a 3 minutos, 7) la cantidad de luz que absorbe una muestra de semen, correlacionándola con un alto grado de precisión con la concentración seminal (8). Quizás con el surgimiento de dispositivos con mayor grado de desarrollo como los mencionados anteriormente, se ha llegado a desestimar la utilidad de la espectrofotometría para el conteo seminal. No obstante, es factible de demostrar que la espectrofotometría es uno de los métodos con mejores resultados para este fin; además, por su moderado costo, podría considerarse como una herramienta de considerable valor para laboratorios de bajos a medianos recursos.

Es sabido que las diferentes glándulas accesorias de las especies mamíferas secretan partículas (9) y que hay una variación biológica en la calidad y cantidad de estas entre las especies. Considerando estas diferencias, así como también las de tamaño y concentración seminal, resulta razonable validar y estandarizar el conteo seminal por espectrofotometría en cada una de las especies. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo fueron: determinar la repetibilidad de las lecturas realizadas con el espectrofotómetro y compararlas con aquellas del hemocitómetro,

realizar una curva de estandarización de lectura espectrofotométrica de concentración seminal canina y, finalmente, correlacionar los resultados obtenidos por ambos métodos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### ANIMALES Y RECOLECCIÓN DE LAS MUESTRAS SEMINALES

Se utilizaron un total de 5 caninos machos adultos de entre 2 y 5 años de edad, saludables y con parámetros reproductivos normales, que fueron proporcionados por sus propietarios previo consentimiento escrito. La recolección de las muestras se realizó en forma higiénica mediante masturbación (10); para dicho procedimiento se utilizaron recipientes de plástico, calibrados y limpios. Se realizaron dos extracciones de semen por animal con un intervalo de 3 días entre cada una de ellas. Uno de los eyaculados no pudo ser utilizado por derramarse fuera del recipiente, por lo que se procesaron un total de 9 eyaculados.

### DILUCIÓN DE LOS EYACULADOS

Cada uno de los eyaculados se fraccionó en 4 partes iguales las que posteriormente se diluyeron 1:25, 1:50, y 1:75 en agua destilada, dejando una de las fracciones sin diluir. De esta forma se generaron un total de 36 muestras. La finalidad de estas diluciones fue obtener distintos valores de concentración que permitieran crear una mayor variabilidad entre los datos a analizar y por consiguiente un rango más amplio de absorbancia.

### CONTEOS EN EL HEMOCITÓMETRO

Para el conteo en cámara de Neubauer (Neubauer improved, BOECO, Germany) cada una de las muestras generadas por dilución y las fracciones no diluidas, se mezclaron con solución fisiológica formolada (ClNa 0,9 g, agua destilada 100 ml y formol 40 %, 0,3 ml) en una proporción 1:20 ó 1:200. La elección de la dilución a utilizar se basó en el aspecto macroscópico de la muestra (grado de opacidad), teniendo así diluciones 1:200 para las muestras con mayor opacidad y 1:20 para aquellas translúcidas. Utilizando una micropipeta autoajustable (PZ HTL, Daniszewska 4, 03-230 Warsaw, Polonia) se tomó una alícuota de cada muestra por separado, se cargaron las cámaras, y se procedió al conteo bajo microscopio de luz a 40 aumentos. Fueron contabilizados los espermatozoides de 5 cuadrados equidistantes entre sí delimitados por 3 líneas paralelas. Se tuvo la precaución de no superar el 10% de diferencia de conteo entre ambas cámaras del hemocitómetro. Los conteos fueron realizados en 3 réplicas para calcular la repetibilidad de los resultados.

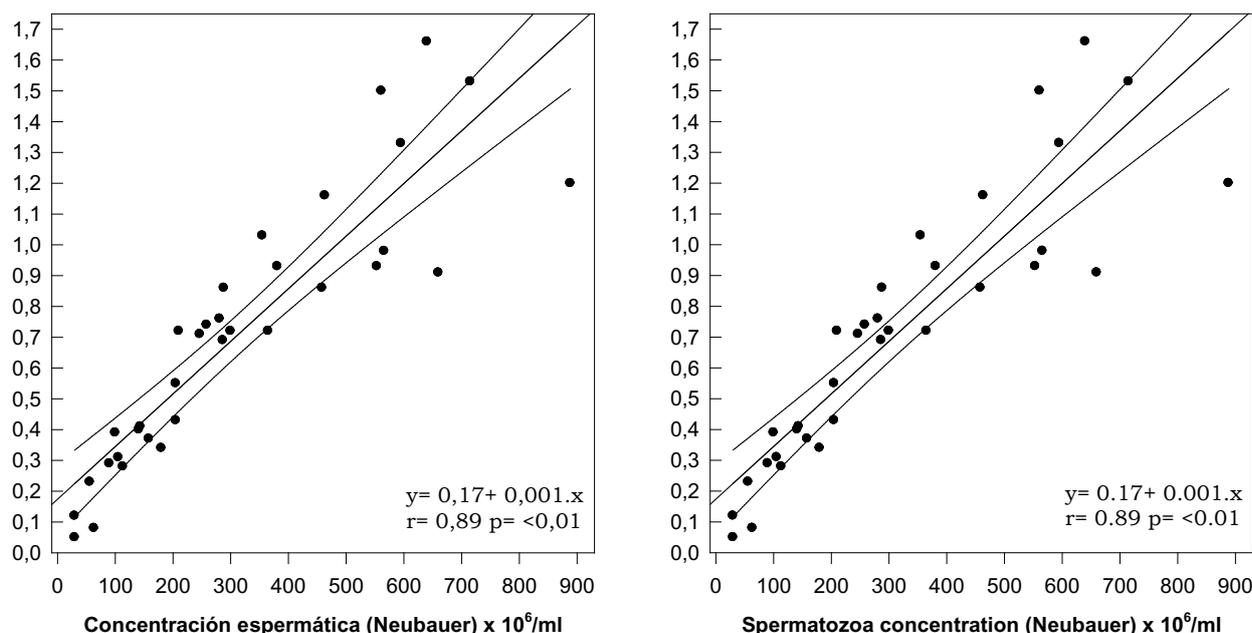


Figura I: Relación entre la concentración espermática medida por hemocitometría (cámara de Neubauer) y la absorbancia por espectrofotometría de muestras seminales caninas.

### LECTURAS EN EL ESPECTROFOTÓMETRO

Para la medición en el espectrofotómetro (Metrolab RC 325 junior, Argentina) la dilución se hizo en agua destilada 1:30 (0,05 ml de la muestra en 1,5 ml de agua destilada), y la longitud de onda utilizada en dicho procedimiento fue de 620 nm.

Previo a la lectura, el aparato fue calibrado a 0 de absorbancia y transmitancia utilizando como blanco un tubo de vidrio limpio y sin rayaduras, al cual se le agregó 1,5 ml de agua destilada en su interior. Luego a ese mismo tubo, se le colocó la muestra diluida como se detalló más arriba, se ajustó la longitud de onda indicada y se procedió a la lectura. Cada una de las lecturas se realizó 3 veces consecutivas.

### ANÁLISIS DE DATOS

Se calculó la repetibilidad de cada método mediante el análisis del coeficiente de variación ( $CV = \sigma/X \cdot 100$ ) de las tres réplicas realizadas en cada una de las muestras. Luego, se realizó una curva de estandarización entre los valores de absorbancia y de concentración mediante la utilización de la *ecuación de regresión lineal*, según la fórmula  $y = a + bx$ , donde "x" fue el conteo en cámara e "y" los valores de absorbancia. Por último, se compararon las concentraciones seminales obtenidas por cada equipo a través de un Test de Student. De no hallar diferencias significativas entre los conteos se calculó del coeficiente de correlación de Pearson para dichos datos.

### RESULTADOS

Los valores obtenidos a través del cálculo del CV fueron 7,8 % y 16,9 % para el espectrofotómetro y la cámara de Neubauer, respectivamente. Mediante la ecuación de regresión general se logró la alineación de la dispersión de los datos, lo cual permitió la estandarización de los valores tanto de absorbancia como de concentración (Figura I).

No se encontraron diferencias significativas entre los conteos espermáticos obtenidos con ambos equipos ( $p > 0,05$ ). El coeficiente de correlación entre la absorbancia y la concentración fue de  $r = 0,89$  ( $p < 0,01$ ).

### DISCUSIÓN

A nuestro conocimiento, no existen reportes acerca de la repetibilidad de las mediciones realizadas por espectrofotometría en semen canino. Este dato permite, no solo el conocimiento de la misma sino también comparar la repetibilidad con la de otros métodos, e incluso con la del "gold standard". Este conocimiento comparativo en la especie canina es de ayuda en la toma de decisiones para la elección y compra de equipamiento en un laboratorio de reproducción.

En nuestro trabajo la cámara de Neubauer mostró tener menos de la mitad de la precisión del espectrofotómetro. Similar proporción entre la precisión de ambos métodos fue previamente reportada en la especie bovina (11).

En este trabajo, al igual que en un estudio anterior en la misma especie ( $r = 0,99$ ; 12) y en otras especies como bovinos ( $r = 0,99$ ; 11), cerdos

( $r= 0,96$ ; 13) y conejos ( $r= 0,97$ ; 14) entre otros, se encontró una alta correlación para los conteos espermáticos obtenidos por ambos métodos.

Por otro lado, la alta correlación entre los aparatos permitió generar un índice de equivalencias para la lectura de la concentración en el espectrofotómetro a partir de los datos obtenidos por cámara de Neubauer. Debido a la dispersión de dichos datos fue necesario su alineamiento por medio de una ecuación de regresión lineal para la homogeneización de los mismos, como se realizó en anteriores trabajos (15,16), ya que su modelo de comportamiento fue similar. Estos hallazgos reivindican el uso de la espectrofotometría en la especie canina como un método no solo rápido y económico sino también con una precisión aceptable.

## BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press 1987; p. 14-7.
2. Mahmoud AM, Depoorter B, Piens N, Comhaire FH. The performance of 10 different methods for the estimation of sperm concentration. *Fertil Steril* 1997; 68 (2):340-345.
3. Christensen P, Stryhn H, Hansen C. Discrepancies in the determination of sperm concentration using Burker-Turk, Thoma and Makler counting chambers. *Theriogenology* 2005; 63:992-1003.
4. Johnson JE, Boone WR, Blackhurst DW. Manual versus computer-automated semen analyses. Part I. Comparison of counting chambers. *Fertil Steril* 1996; 65:150-155.
5. Brazil C, Swan SH, Tollner CR, Treece C, Drobnis EZ, Wang C, Redmon JB, Overstreet JW. Quality control of laboratory methods for semen evaluation in a multicenter research study. *J Androl* 2004b; 25:645-656.
6. Kustritz MV, Kilty C, Vollmer M. Spermocrit as a measure of the concentration of spermatozoa in canine semen. *Vet Rec* 2007; 161 (16):566-567.
7. Brillard JP, McDaniel GR. The reliability and efficiency of various methods for estimating spermatozoa concentration. *Poult Sci* 1985; 64:155-158.
8. Hansen C, Christensen P, Stryhn H, Hedeboe AM, Rode M, Boe-Hansen G. Validation of the FACSCount AF system for determination of sperm concentration in boar semen. *Reprod Domest Anim* 2002; 37:330-334.
9. Minelli A, Moroni M, Castellini C. Isolation of the IGF-I protein complex from rabbit seminal plasma: effects on sperm mobility and viability. *J Exp Zool* 2001; 290:279-290.
10. Linde Fosberg C. Artificial insemination with fresh, chilled extended and frozen thawed semen in the dog. *Semin Vet Med. Surge (Small Anim)* 1995; 10:48-58.
11. Prathalingam NS, Holt WW, Revell SG, Jones S, Watson PF. The precision and accuracy of six different methods to determine sperm concentration. *J Androl* 2006; 27 (2):257-262.
12. Rodríguez P, Franco E, Jiménez C. Estandarización de la prueba para espectrofotometría en la medición de concentración de semen bovino, equino, porcino, ovino y canino. *Rev Med Vet Zoot* 2008; 55:22-28.
13. Paulenz H, Grevle IS, Tverdal A, Hofmo PO, Andersen Berg K. Precision of the Coulter counter for routine assessment of boar-sperm concentration in comparison with the haemocytometer and spectrophotometer. *Reprod Dom Anim* 1995; 30:107-111.
14. Castellini C, Lattaioli P, Cardinali R, Dal Bosco A, Mourvaki E. Validation of a spectrophotometric method used for the measurement of spermatozoa concentration in rabbit semen. *World Rabbit Sci* 2007; 15:115-119.
15. Haag. Determination of the approximate sperm concentration of horse semen with the aid of a spectrophotometer. *J Am Vet Med Assoc* 1959; 134 (7):314-316.
16. Anzar M, Kroetsch T, Buhr M. Comparison of Different Methods for Assessment of Sperm Concentration and Membrane Integrity With Bull Semen. *J Androl* 2009; 30(6): 661-668.

## PENETRACIÓN DE FOSFOMICINA EN CÉLULAS HEP-2 Y SU INTERACCIÓN CON DEOXINIVALENOL

MARTÍNEZ G<sup>1,2</sup>, SORACI AL<sup>1,3</sup>, TAPIA MO<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Área Toxicología, Dpto. de Fisiopatología, Fac. Cs. Veterinarias, UNCPBA-Tandil

<sup>2</sup> CIC, Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

<sup>3</sup> CONICET, Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

**RESUMEN:** Fosfomicina (FOS) es un antimicrobiano utilizado en producción porcina para prevención y tratamiento de bacterias resistentes durante el post destete. Su presentación como sal cálcica permite incorporarse en el alimento o agua de bebida. Diversos estudios evidencian la presencia del antibiótico en tejidos y fluidos como pulmón y secreciones bronquiales. La línea celular HEP-2 (células laringeas) constituye un modelo para estudiar la penetración de FOS disponible sistémicamente. Deoxinivalenol (DON) es una micotoxina producida por *Fusarium* sp. que contamina las materias primas e influye negativamente el rendimiento de las pjaras. El objetivo del trabajo fue estudiar la penetración de FOS en líneas de cultivos celulares y evaluar el potencial efecto interactivo de DON sobre la penetración del antibiótico en líneas de cultivos celulares. Los resultados muestran que las concentraciones de antibiótico intracelular en células HEP-2 incubadas con 130 ppm de FOS cálcica, oscilaron entre 0.4 y 1.12 µg/ml con un  $t_{max}$  de 8 h. Cuando las células HEP-2 fueron incubadas con FOS y DON, la penetración celular del antibiótico no presentó variación significativa, en relación a la  $C_{max}$  (1.10 ppm) y  $t_{max}$  (12 h). Se concluye que la presencia de la micotoxina no modificaría la distribución celular de FOS en cerdos.

**Palabras claves:** fosfomicina, deoxinivalenol, células HEP-2, cerdos

## PENETRATION OF FOSFOMYCIN IN HEP-2 CELLS AND ITS INTERACTION WITH DEOXYNIVALENOL

**ABSTRACT:** Fosfomicin (FOS) is an antibiotic used in swine production for the treatment and prevention of resistant bacteria during the post weaning. The calcium salt form can be used in food or drinking water. Several studies showed the presence of this antibiotic in tissues and fluids such as lungs and bronchial secretions. The HEP-2 line cell is a model to study the penetration of systemically available FOS. Deoxynivalenol (DON) is a mycotoxin produced by *Fusarium* sp. that contaminates the raw materials and influences the performance of pigs negatively. The aim of this work was to study the penetration of FOS in cell culture lines and evaluate the interactive effect of DON on the penetration of the antibiotic in cell culture lines. The results showed that intracellular antibiotic concentrations in HEP-2 cells incubated with 130 ppm of calcium FOS oscillated between 0.4 and 1.12 mg/ml with a  $t_{max}$  of 8 h. When HEP-2 cells were incubated with FOS and DON, a significant variation was not observed on the cellular penetration of the antibiotic, as regard the  $C_{max}$  (1.10 ppm) and  $t_{max}$  (12 h). It is concluded that the presence of the mycotoxin would not alter the cellular distribution of FOS in pigs.

**Key Words:** fosfomicin, deoxynivalenol, HEP-2 cells, pigs

Fecha de recepción: 05/05/11

Fecha de aprobación: 20/10/11

**Dirección para correspondencia:** Martínez Guadalupe. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, Tandil, CP 7000, Buenos Aires, Argentina.

**E-mail:** [guadam@vet.unicen.edu.ar](mailto:guadam@vet.unicen.edu.ar)

## INTRODUCCIÓN

En producción animal intensiva con el fin de obtener buenos rendimientos, se utilizan, entre otros xenobióticos, a los antibióticos, ya sea como aditivos promotores del crecimiento (incorporados al alimento o agua de bebida a dosis subterapéuticas) o como agentes terapéuticos, metaflácticos y profilácticos (1, 2). La fosfomicina (FOS) es un antimicrobiano de naturaleza hidrosoluble muy utilizado en las producciones intensivas tal como ocurre en producción porcina donde es empleada como una alternativa clínica para la prevención y tratamiento de bacterias resistentes durante el post destete, período productivo crítico del lechón.

FOS ( $C_3H_7PO_4$ , PM 138.06 g/mol) es un antibiótico natural no relacionado estructuralmente con otros agentes antimicrobianos, descubierto en 1961 (3, 4, 5). El uso de FOS en animales y humanos es recomendado por presentar una baja toxicidad y excelente eficiencia y espectro antimicrobiano contra bacterias gram-positivas y gram-negativas (6). Su actividad bactericida es mediada por bloqueo de la biosíntesis de la pared celular en la primera etapa de la síntesis del peptidoglicano (7). FOS no posee resistencia cruzada con ningún otro antibiótico o quimioterápico (8). La molécula de FOS se encuentra disponible bajo diferentes sales, adaptadas a la vía enteral (FOS-cálcica y trometamol) y parenteral (FOS disódica) (9). En animales, su presentación en forma de sal cálcica permite ser utilizada fácilmente al incorporarse al agua de bebida o al alimento. Una vez que la droga es absorbida en intestino y alcanza la circulación sistémica, la unión de FOS a proteínas es insignificante. Su distribución dentro de las células es pobre predominando en el espacio extracelular. Algunos estudios han evidenciado la presencia del antibiótico en distintos tejidos como músculo, pulmón y secreciones bronquiales, ojo, hueso, líquido cefalorraquídeo, tejido linfático y fluidos purulentos. Una proporción pequeña de la molécula pasa por bilis, leche y calostro (10). Si bien se conoce que la fosfomicina llega a distintos tejidos, existe escasa información sobre la concentración de droga biodisponible que ingresa a las células de diferentes tejidos del organismo. Teniendo en cuenta que la droga se detecta en pulmón y secreciones bronquiales, la línea celular HEp-2 (células laringeas) puede representar un modelo adecuado para estudiar *in vitro* la penetración de fosfomicina biodisponible.

En cuanto a los factores asociados a la alimentación que pueden afectar la producción de una piara, la presencia de compuestos antinutricionales en la dieta influye negativamente en el rendimiento productivo. En esta región del país, las micotoxinas producidas por *Fusarium* entre ellas el deoxinivalenol (DON) son contaminantes comunes de materias primas, particularmente del

maíz, principal componente de la dieta del cerdo. Se ha reportado que concentraciones superiores a 1 mg DON/kg alimento desarrollan efectos depresivos sobre la performance en porcinos (11). La enfermedad clínica por efectos de DON en cerdos se caracteriza por menor consumo, rechazo del alimento, vómitos, inmunosupresión y hemorragias (12). DON actúa sobre las células inhibiendo la síntesis proteica y tiene acción citotóxica sobre tejidos de rápido crecimiento y recambio (13). Luego de ingresar por vía oral, DON se absorbe rápidamente en estómago y primera porción del duodeno (14, 15). Goyarts y Dänicke (16) demostraron que más del 50% de la concentración de DON presente en la dieta se absorbe rápidamente y distribuye a distintos tejidos donde pobremente es metabolizado. Luego de 24 h. de la administración oral de DON, la toxina no se encuentra en plasma. Si bien ha sido ampliamente estudiado el efecto de la toxina sobre las células del organismo en intoxicaciones agudas y crónicas, no se ha descrito las potenciales interacciones que podría ocurrir cuando la toxina se encuentra en bajas concentraciones (situaciones subclínicas) frente a otros xenobióticos de utilización frecuente en producción porcina, como lo son los antibióticos.

El objetivo de este trabajo fue estudiar *in vitro*, la penetración del antibiótico FOS en líneas de cultivos celulares y evaluar el potencial efecto interactivo de DON sobre la penetración del antibiótico en líneas de cultivos celulares.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1 CULTIVO DE CÉLULAS HEP-2

Para el cultivo, la línea celular HEp-2 (carcinoma laringeo humano) se incorporó en botellas con 80% de Medio Esencial Mínimo de Eagle (MEM) y 20% suero fetal bovino (SFB). A las 24 h. se cambio el medio para que continúe la multiplicación celular con crecimiento en monocapa (MEM Y SFB 10%). Cuando estuvieron en confluencia (ocupando el 100% de la superficie de crecimiento), fueron consideradas aptas para repicar (transferencia). En este punto se extrajo el sobrenadante, se lavó con solución salina de buffer fosfato (PBS) y se incorporó tripsina durante 10 min. a 37°C. Como consecuencia de la acción enzimática, se desprendieron las células de la superficie y se rompieron las uniones intercelulares. Posteriormente, las células se resuspendieron en PBS y fueron centrifugadas durante 5 min. a 1500 rpm. El pellet obtenido se resuspendió en MEM y SFB 10% y fue transferido a otras botellas. Las células se sembraron en placas de cultivo de 6 pocillos y se mantuvieron en estufa a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Los cultivos celulares fueron regularmente testeados. La confluencia de la monocapa celular fue mayor al 80% correspondiendo a una densi-

dad de  $1.2 \times 10^6$  células por pocillo, momento en el cual se consideraron aptas para ser empleadas en los experimentos.

## 2.2 TRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS CELULARES

Concentraciones de DON utilizadas en células HEP-2: se obtuvieron distintas soluciones de DON a partir de un estándar puro de 200 ppm (Sigma-Aldrich®). Se trabajó con concentraciones descendentes buscando el límite no tóxico del DON sobre las células. El límite no tóxico determinado fue de 1 ppm (1 µg/ml), a dicha concentración no se observó citotoxicidad (desprendimiento de la monocapa celular) transcurrida las 4 h de incubación.

Concentraciones de FOS utilizadas en células HEP-2: el antibiótico empleado fue Fosbac® (fosfomicina cálcica) provisto por el laboratorio Bedson S.A. La concentración de FOS para el tratamiento de los cultivos de células HEP-2 fue de 130 ppm. La misma fue estimada considerando que *in vivo*, la fosfomicina cálcica administrada a razón de 30 mg/Kg de PV en lechones post destete, se absorbe un 20 % (17) y que la volemia de un lechón de 15 Kg es de 0,69 L (4,6 % PV).

## 2.3 PENETRACIÓN INTRACELULAR DE FOSFOMICINA

Se validó una metodología adecuada para estudiar la penetración de fosfomicina en cultivos celulares a partir de modificaciones de la técnica reportada por Darouiche y Hamill en 1994 (18).

Los grupos experimentales fueron tres. Un grupo control de cultivos de células HEP-2 sin antibiótico ni toxina; un segundo grupo de placas de cultivos incubadas con FOS y un tercer grupo incubado con FOS y DON. Las concentraciones del antibiótico y micotóxina fueron solubilizadas en solución fisiológica y posteriormente incorporadas a los cultivos celulares. Las placas de cultivo fueron incubadas en estufa (37°C) a distintos tiempos (0, 5, 10, 15, 30 min, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18 y 24 h).

## 2.4 EXTRACCIÓN DE ANTIBIÓTICOS

Finalizada la incubación, las placas del cultivo fueron lavadas dos veces con 2 ml de agua HPLC, con el fin de eliminar el antibiótico que no penetró a las células. El agua de cada lavado fue recolectada en tubos de polipropileno, rotulados como antibiótico extracelular y centrifugadas a 3.500 rpm durante 6 minutos. Alícuotas de 30 µl del sobrenadante fueron recolectadas en viales y llevadas a 1 ml con agua HPLC (dilución 1:100) para ser analizados en HPLC masa/masa.

Por otro lado, para la determinación del antibiótico intracelular, se incorporaron 2 ml de agua HPLC a cada pocillo de las placas de cultivo. Las mismas se sellaron y sonicaron durante 30

minutos, con el fin de lisar las células y liberar la FOS intracelular. Posteriormente se centrifugaron a 10.000 rpm, 4 °C durante 6 minutos; el sobrenadante fue filtrado y 1 ml del mismo incorporado en viales para su posterior análisis.

## 2.5 ANÁLISIS

Las concentraciones intracelular y extracelular de fosfomicina fueron determinadas por triplicado en cromatografía líquida de alta performance masa-masa (HPLC MS/MS) según el método de Soraci et al (2010) (17). El volumen celular en células HEP-2 fue calculado multiplicando el número de células HEP-2 por pocillo ( $1,2 \times 10^6/1$  ml de agua HPLC) con el volumen promedio de agua intracelular de células mononucleares ( $3,75 \times 10^{-6}$  µl) (19).

Los resultados correspondientes a los distintos grupos experimentales fueron analizados estadísticamente bajo test t- student con el empleo del programa SAS.

## RESULTADOS

Las concentraciones de antibiótico intracelular en las placas incubadas con 130 ppm de FOS cálcica, oscilaron entre 0,4 y 1,12 µg/ml en los distintos tiempos de incubación. Se observó que el antibiótico ingresa y sale de las células en forma continua, alcanzando la concentración máxima (Cmax) de 1,12 ppm a un tiempo (tmax) de 8 h (figura 1). Bajo esta forma detectamos que solo menos del 1 % del antibiótico tratado logró ingresar a las células; permaneciendo en mayor proporción en el espacio extracelular. La sumatoria de las concentraciones obtenidas de FOS intracelular y extracelular para cada tiempo de incubación, coincidió con la concentración inicial del antibiótico (130 ppm) que se incorporó a los cultivos celulares (figura II).

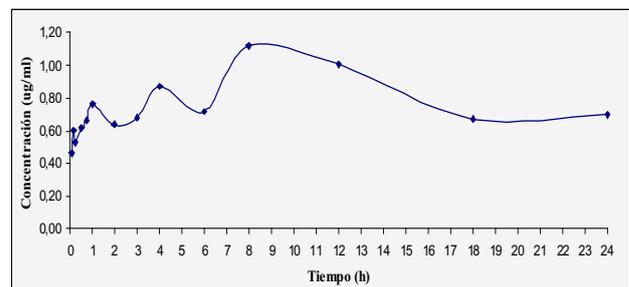


Figura 1. Comportamiento intracelular FOS en HEP-2 correspondiente a placas de cultivo incubadas con 130 ppm FOS cálcica.

Las placas de cultivo incubadas con 130 ppm FOS cálcica y 1 ppm DON, mostraron una concentración de FOS intracelular que fluctuó entre 0,3 y 1,10 ppm (figuras 3 y 4). Se obtuvo un comportamiento muy similar a las observadas en las células HEP-2 incubadas sin toxina. En este

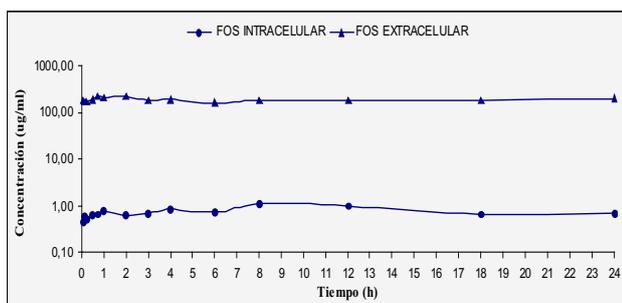


Figura 2. Comportamiento intracelular y extracelular FOS en HEP-2 correspondiente a placas de cultivo incubadas con 130 ppm FOS cálcica.

grupo experimental la Cmax de FOS intracelular fue de 1,10 ppm vs. 1,12 ppm de FOS intracelular de las placas incubadas únicamente con antibiótico. La diferencia radicó en que el pico de Cmax (1,10 ppm) se presentó con un tmax de 12 h, significando 4 h posteriores al tmax obtenido en células HEP-2 tratadas sin toxina. A pesar de ello, el análisis estadístico indicó que no existen diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), las diferencias sólo se deben al azar.

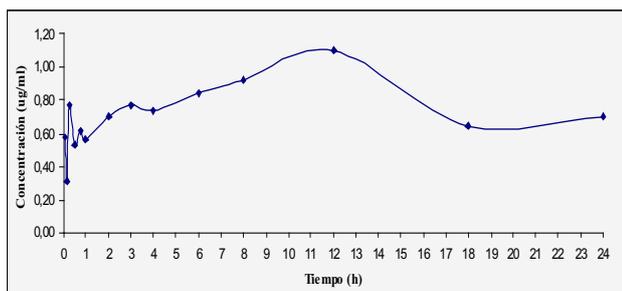


Figura 3. Comportamiento intracelular FOS en HEP-2 correspondiente a placas de cultivo incubadas con 130 ppm FOS cálcica y 1 ppm DON.

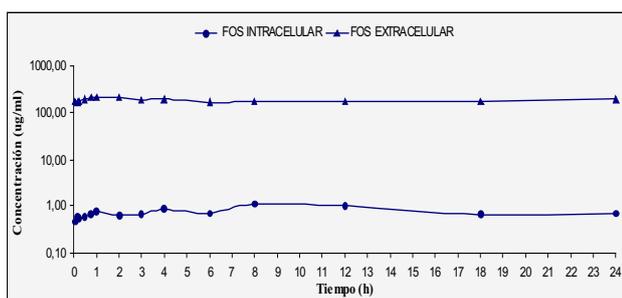


Figura 4. Comportamiento intracelular y extracelular FOS en HEP-2 correspondiente a placas de cultivo incubadas con 130 ppm FOS cálcica y 1 ppm DON.

## DISCUSIÓN

La concentración de fosfomicina intracelular en células HEP-2 es baja permaneciendo en alta proporción como antibiótico extracelular. La escasa concentración de antibiótico dentro de las células se debería a la naturaleza hidrosoluble de FOS (8) lo que dificultaría el pasaje por difusión

pasiva a través de la membrana celular. En base a ello, su presencia en el interior de las células podría ser explicada a partir de una difusión activa de transmembrana. Kahan y cols. en 1974 (20) demostraron la existencia de mecanismos activos de transporte para FOS que permiten su entrada a las bacterias. Uno de ellos es el que transporta el L- $\alpha$ -glicerol-fosfato y otro, inducible, que lleva a la D-glucosa-6-fosfato al interior de la célula bacteriana (8, 10). En nuestro estudio se demostró la presencia FOS dentro de las células HEP-2 y ello podría deberse a un mecanismo de transporte similar al que se describe en las bacterias. Además, la escasa proporción de FOS intracelular podría estar relacionada en forma directa por el escaso número de transportadores de membrana en las células HEP-2. La presencia de FOS dentro de las células también fue demostrada por Höger et al. en 1985 (21) al trabajar con células polimorfonucleares humanas.

Por otro lado, es conocido que DON afecta la síntesis de proteínas (16, 22) y por ende interfiere con proteínas transportadoras como GLUT, SGLT-1 y transportadores de aminoácidos (23). Si bien no existieron diferencias significativas entre las placas de cultivo incubadas con FOS y aquellas incubadas con FOS y DON, el comportamiento de entrada celular activa del antibiótico podría verse comprometido cuando se acompaña con concentraciones potencialmente tóxicas de micotoxina.

El empleo de cultivos de células HEP-2 significó ser una herramienta útil para evaluar la proporción de antibiótico que ingresaría a células sistémicas a partir de la fosfomicina biodisponible en plasma porcino.

## AGRADECIMIENTOS

Nuestro agradecimiento dirigido a Guillermo H. Arroyo, Personal de Apoyo de CONICET, por su ayuda técnica en los cultivos celulares. También el agradecimiento a Denisa S. Pérez, Becaria de CONICET, por su colaboración en los diferentes ensayos realizados.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Carro MD, Ranilla MJ. Los aditivos antibióticos promotores del crecimiento de los animales: situación actual y posibles alternativas. 2002. Disponible en: <http://www.midiatecavipec.com>.
2. Torres C, Zarazaga M. Antibióticos como promotores del crecimiento en animales. ¿Vamos por el buen camino? Gac Sanit 2002; 16 (2): 109-112.
3. Hendlin D, Stapley EO, Jackson M, Wallick H, Miller AK, Wolf FJ, et al. Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of Streptomycetes. Sci 1969; 166 (901): 122-123.
4. Gattinger R, Mayer B, Heinz G, Guttman C, Zeitlinger M, Joukhadar C, et al. Single-dose pharmaco-

- kinetics of fosfomicin during continuous venovenous haemofiltration. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58 (2): 367-371.
5. Sumano LH, Ocampo CL, Gutierrez OL. Intravenous and intramuscular pharmacokinetics of a single-daily dose of disodium-fosfomicin in cattle, administered for 3 days. *J Vet Pharmacol Ther* 2007; 30 (1): 49-54.
  6. Gallego A, Rodriguez A, Mata JM. Fosfomicin: pharmacological studies. *Drugs Today* 1974; 10: 161-168.
  7. Hernández S, García J, Muñoz J. Actividad *in vitro* de fosfomicina frente a enterobacterias de origen urinario productoras de betalactamasas de espectro extendido. *Rev Esp Quimioter* 2009; 22 (1): 25-29.
  8. Gobernado M. Fosfomicina. *Rev Esp Quimioter* 2003; 16 (1): 15-40.
  9. Escolar-Jurado M, Azanza-Perea JR, Sádaba-Díaz de Rada B, Honorato-Pérez J. Tetraciclinas, cloranfenicol y fosfomicina. *Med* 1998; 7 (76): 3524-3532.
  10. Popovic M, Steinort D, Pillai S, Joukhadar C. Fosfomicin: an old, new friend?. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2010; 29: 127-142.
  11. Avantiaggiato G, Havenaar R, Visconti A. Evaluation of the intestinal absorption of deoxynivalenol and nivalenol by an *in vitro* gastrointestinal model, and the binding efficacy of activated carbon and other adsorbent materials. *Food Chem Toxicol* 2004; 42 (5):817-824
  12. Lawlor P, Brendan-Lynch P. Mycotoxins in pig feeds 2: clinical aspects. *Ir Vet J*. 2001; 54 (4):172-176
  13. Desjardins AE. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology. APS Press. St. Paul, Minnesota. 2006 .
  14. Eriksen GS, Pettersson H, Lindberg JE. Absorption, metabolism and excretion of 3-acetyl DON in pigs. *Arch Anim Nutr* 2003; 57 (5):335-345.
  15. Dänicke S, Valenta H, Klobasa F, Döll S, Ganter M, Flachowsky G. Effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated wheat in diets for fattening pigs on growth performance, nutrient digestibility, deoxynivalenol balance and clinical serum characteristics. *Arch Anim Nutr* 2004; 58:1-17.
  16. Goyarts T, Dänicke S. Bioavailability of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol (DON) from naturally contaminated wheat for the pig. *Toxicol Lett* 2006; 163 (3):171-182.
  17. Soraci AL, Pérez DS, Martínez G, Dieguez SN, Tapia MO. Disodium-fosfomicin pharmacokinetics and bioavailability in post weaning piglets. *Res Vet Sci* 2010. Disponible en: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003452881000247X> .
  18. Darouiche RO, Hamill RJ. Antibiotic penetration of a bactericidal activity within endothelial cells. *Antimicrob Agents Chemother* 1994; 38(5):1059-1064.
  19. Kiem S, Schentag JJ. Interpretation of antibiotic concentration ratios measured in epithelial lining fluid. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; 52(1): 24-36.
  20. Kahan FM, Kahan JS, Cassidy PJ, Kropp H. The mechanism of action of fosfomicin (phosphonomycin). *Ann NY Acad Sc* 1974; 235: 364-386.
  21. Höger PH, Seger RA, Schaad UB, Hitzig WH. Chronic granulomatous disease: uptake and intracellular activity of fosfomicin in granulocytes. *Pediatr Res* 1985; 19 (1): 38-44.
  22. Dänicke S, Goyarts T, Döll S, Grove N, Spolders M, Flachowsky G. Effects of the *Fusarium* toxin deoxynivalenol on tissue protein synthesis in pigs. *Toxicol Lett* 2006; 165 (3): 297-311.
  23. Awad WA, Aschenbach JR, Setyabudi FMCS, Razzazi-Fazeli E, Böhm J, Zentek J. *In vitro* effects of Deoxynivalenol on small intestinal D -glucose uptake and absorption of Deoxynivalenol across the isolated jejunal epithelium of laying hens. *Poult Sci* 2007; 86: 15-20.

## SEROPREVALENCE OF *Toxoplasma gondii* AND *Neospora caninum* IN SHEEP IN URUGUAY

Suzuki K<sup>1</sup>, Corva SG<sup>1</sup>, Travería G<sup>1</sup>, Cattáneo M<sup>2</sup>, Puentes R<sup>2</sup>,  
Martinicorena M<sup>2</sup>, Moreno J<sup>2</sup>, Furtado A<sup>2</sup>, Freyre A<sup>2</sup>,  
Satragno D<sup>2</sup>, Acevedo C<sup>2</sup>, Nuñez R<sup>2</sup>, Bermúdez J<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

<sup>2</sup>Facultad de Veterinaria. Universidad de la República. Uruguay.

**ABSTRACT:** The objective of this study was to estimate the true prevalence of seropositive individual sheep against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Uruguay using the Rogan–Gladden estimator in combination with Monte Carlo simulation. Ten herds were kept under observation in 2008. Each study herd was randomly selected at different farms recruited from the Departments of Artigas, Salto and Canelones. The required total sample size was determined by power analysis, and blood samples collected were analysed using a commercial ELISA for the detection of antibody to the two pathogens mentioned above. The overall seroprevalence of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* were estimated at 38.9% (5<sup>th</sup> percentile of 36.5%; 95<sup>th</sup> perc. of 41.4%; N = 1361) and 0.7% (5<sup>th</sup> percentile of 0.1%; 95<sup>th</sup> perc. of 1.4%; N = 1357), respectively. Establishing prevalence distributions using Monte Carlo simulation could be useful for further risk assessment.

**Key Words:** epidemiology, ovine, South America

## SEROPREVALENCIA DE *Toxoplasma gondii* Y *Neospora caninum* EN OVINOS DE URUGUAY

**RESUMEN:** El objetivo del presente estudio fue estimar la prevalencia verdadera de ovejas seropositivas a *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* en Uruguay, mediante el uso del estimador Rogan–Gladden en combinación con la simulación Monte Carlo. Diez rebaños fueron observados durante el año 2008. Cada rebaño bajo estudio fue seleccionado al azar de establecimientos pertenecientes a los Departamentos de Artigas, Salto y Canelones. El tamaño de muestra fue determinado por el poder estadístico del análisis. Las muestras de sangre fueron analizadas mediante un ELISA comercial para la detección de anticuerpos contra los dos parásitos mencionados anteriormente. La seroprevalencia global para *Toxoplasma gondii* y *Neospora caninum* fue estimada en 38.9% (36.5% para el percentil 5; 41.4% para el percentil 95; N = 1361) y 0.7% (0.1% para el percentil 5; 1.4% para el percentil 95; N = 1357), respectivamente. Establecer la distribución de prevalencia mediante la simulación de Monte Carlo podría ser de utilidad para futuros análisis de riesgo.

**Palabras clave:** epidemiología, ovino, Sudamérica.

Fecha de recepción: 24/06/11

Fecha de aprobación: 20/10/11

**Dirección para correspondencia:** Kuniaki Suzuki, #632 1–10–5 Akasaka, Tokio, 107-8420, JAPÓN. Fax: +81 3 3224 5291.  
E-mail: provetsur.net@gmail.com

## INTRODUCTION

The quality of sheep farming in Uruguay is relatively high and the close interaction between producers, the extension services and the veterinary services acts a significant role in maintaining this condition. There is a growing concern that low reproductive performance in ovine populations may progressively obstruct the industry. This is normally recognised as the single most significant problem associated with the increasing numbers of sheep and concomitant increase in stocking rate (1).

*Toxoplasma gondii* is a protozoan parasite which infects humans as well as other warm-blooded animals including sheep. If ewes become infected with *Toxoplasma gondii*, they do not usually appear sick. But if they contract the disease early in gestation, resorption or mummification results; if late in gestation, abortions or perinatal deaths occur (2).

*Neospora caninum* is another protozoan parasite which has been confused previously with *Toxoplasma gondii*. While an early record of *Neospora caninum* congenital infection in sheep dates back earlier, *Neospora caninum* has been recently shown to be a cause of abortions of sheep (3).

Prevalence is a scale of animal disease frequency that concentrates on existing status rather than new events. Diagnostic tests are regularly used for prevalence studies and, preferably, true prevalence (TP) should be estimated from apparent prevalence or percentage of samples classified as test-positive (Pos) by adjusting for test sensitivity (Se) and specificity (Sp) (4). The objective of this study was to estimate the TP of seropositive individual sheep against *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in Uruguay using the Rogan-Gladen estimator in combination with Monte Carlo simulation.

## MATERIALS AND METHODS

### STUDY AREA

Uruguay is located in the south-eastern part of South America bordering the South Atlantic Ocean, between Argentina in the west and Brazil in the northeast. Seventy-seven percent of the total land area of 175,020 km<sup>2</sup> is occupied by permanent pasture that is suitable for livestock production (5). Beef cattle (11 million animals), dairy cattle (0.7 million animals) and sheep (10 million animals) compose the majority of the agricultural economic product. Livestock accounts for three quarters of agricultural GDP (6). Uruguay has a sheep meat production of 27,000 tonnes per year and a sheepskin production of 9,800 tonnes per year (7). The north side of the country (Artigas and Salto Departments) had the concentration of sheep population (about 31 % of the total population) (5,7). These two

departments and Canelones Department north to the capital city Montevideo were selected as the study area.

### SAMPLE COLLECTION

Ten herds of sheep were included in the study. Each study herd was randomly selected at different farms recruited from the Artigas (no. of the study herds = 1), Salto (no. of the study herds = 8) and Canelones (no. of the study herds = 1) Departments. To our knowledge, nothing has been reported on seroprevalence of a *Toxoplasma gondii* / *Neospora caninum* infection for at least a year. None of the sheep had been vaccinated against *Toxoplasma gondii* / *Neospora caninum* prior to sampling. The required total sample size of 1067 from a sheep population of 10 million was sufficient to produce a 95 % confidence interval with a desired precision of  $\pm 3$  % when the percentage of samples classified as test-positive was 50 % (8). The sample size in each of the herds was proportionally allocated (10 % each of the total number of sheep at study herds) by the accessible financial, human and material means. The field investigation was conducted in 2008, consisted of data collection through questionnaire interviews for each farm selected, in conjunction with blood sample collections for each sheep (questionnaire results were not dealt with hereinafter).

### LABORATORY EXAMINATIONS

Blood samples collected were used for diagnostic investigations. Sera were analysed using a commercial ELISA for the detection of antibody to *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in sheep serum (CHEKIT<sup>®</sup> *Toxoplasma gondii* Antibody Test Kit and *Neospora caninum* Antibody Test Kit, IDEXX Laboratories, Liebefeld-Bern, Switzerland). Positive and negative controls were included for each series of samples analysed. Absorbance was read on an ELISA reader at 450 nm. On the basis of the instruction manual of the ELISA kits, each serum sample was determined as positive, suspect or negative.

### DATA ANALYSIS

Data were entered into a database using the spreadsheet software Microsoft Excel 2007 (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA). Seroprevalence estimates based on the use of an imperfect test, which is a nature of ELISA tests, must be corrected to take account of test performance. The calculations per study herd were done with the following distributions for Pos, Se and Sp:

$$\text{Pos} \sim \text{Beta}(d_h + 1, n_h - d_h + 1),$$

$$\text{Se} \sim \text{Beta}(d + 1, n - d + 1),$$

$$\text{Sp} \sim \text{Beta}(d + 1, n - d + 1)$$

where d = the number of desired (positive or negative) outcomes, n = the number of samples

tested per study herd, and the subscript 'h' indicates a herd-specific value. Based on the published ELISA sensitivity (93.4%) and specificity (100 %) values for *Toxoplasma gondii* (2), and the published ELISA sensitivity (96.6%) and specificity (99.5 %) values for *Neospora caninum* (9), estimated TP of antibodies among study sheep at each herd were calculated. TPs for each herd were derived from the percentage of samples classified as test-positive using the Rogan–Gladen estimator (10) and information about the Se and Sp:

$$TP = (Pos + Sp - 1) / (Se + Sp - 1)$$

For estimation of TP above, the Microsoft Excel 2007 in combination with the Monte Carlo simulation add-in software ModelRisk Standard

version 4.0.0.2 (Vose Software, Gent, Belgium) with 10,000 iterations were used.

## RESULTS

The 1361 (for testing *Toxoplasma gondii*) and 1357 (for testing *Neospora caninum*) sheep studied accounted for about 7.9 % of the study sheep population and 0.01 % of the total sheep population in Uruguay then. Of all, 0.5 % (95 % CI: 0.2–1.1 %) of the samples had test-positive against both *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. The proportion of all for test-negative against both the two disease pathogens was 63.2 % (95 % CI: 60.5–65.7 %). Table 1 displays the estimated seroprevalence against *Toxoplasma gondii* among the study sheep categorised by

Table 1. Estimated seroprevalence against *Toxoplasma gondii* among sheep in Uruguay  
Tabla 1. Seroprevalencia estimada en ovejas de Uruguay contra *Toxoplasma gondii*

Herd ID	No. of sheep sampled	% of test-positive	True seroprevalence (%)	Percentiles (%)	
				5th	95th
<b>A</b>	245	46.9	50.3	44.6	56.0
<b>B</b>	55	14.5	16.8	9.1	26.1
<b>C</b>	43	11.6	14.1	6.3	23.7
<b>D</b>	100	15.0	16.7	10.8	23.5
<b>E</b>	29	34.5	37.9	23.1	53.5
<b>F</b>	368	56.0	59.9	55.2	64.6
<b>G</b>	84	34.5	37.3	28.4	46.6
<b>H</b>	82	54.9	58.7	49.1	68.1
<b>I</b>	49	53.1	56.9	44.7	69.2
<b>J</b>	306	11.8	12.7	9.6	16.2
<b>Total</b>	1361	36.4	38.9	36.5	41.4

Table 2. Estimated seroprevalence against *Neospora caninum* among sheep in Uruguay  
Tabla 2. Seroprevalencia estimada en ovejas de Uruguay contra *Neospora caninum*

Herd ID	No. of sheep sampled	% of test-positive	True seroprevalence (%)	Percentiles (%)		% of simulated data removed*
				5th	95th	
<b>A</b>	245	5.7	5.7	3.1	8.6	0
<b>B</b>	54	0	1.9	0.1	5.5	31
<b>C</b>	43	0	2.3	0.1	6.9	25
<b>D</b>	98	0	1.0	0.1	3.1	47
<b>E</b>	28	0	3.5	0.2	10.3	18
<b>F</b>	368	0	0.3	0.0	0.9	86
<b>G</b>	82	1.2	2.1	0.2	5.4	13
<b>H</b>	81	1.2	2.1	0.2	5.5	12
<b>I</b>	50	0	2.0	0.1	5.9	29
<b>J</b>	308	0	0.3	0.0	1.0	81
<b>Total</b>	1357	1.2	0.7	0.1	1.4	13

\*Data less than zero were not included for the estimation of true seroprevalence.

herds. The numbers of sheep sampled between the 10 study herds were varied from 29 to 368. All the 10 herds had percentage of samples classified as test-positive of greater than 11%, between 11.6 % and 56.0 %. All the point estimates of TP were greater than 12 %, between 12.7 % and 59.9 %. All the point estimates of TP in each herd were consistently greater than the percentages of test-positive samples. All the values for the percentage of test-positive were well within the interval of 5<sup>th</sup> and 95<sup>th</sup> percentiles of the estimated TPs. The simulating means for the Se and Sp, estimated from the study, were 93.2 % (5<sup>th</sup> percentile of 91.4 %; 95<sup>th</sup> percentile of 94.8 %) and 99.8 % (5<sup>th</sup> percentile of 99.5 %; 95<sup>th</sup> percentile of 99.9 %), respectively. Table 2 shows the estimated seroprevalence against *Neospora caninum* among the study sheep categorised by herds. The numbers of sheep sampled between the 10 study herds were varied from 28 to 368 (similar to Table 1). Only three out of the 10 herds had percentage of test-positive of greater than 0 %, between 1.2 % and 5.7 %. All the point estimates of TP were greater than 0 %, between 0.3 % and 5.7 %. All the percentages of test-positive in each herd were adjusted greater by Monte Carlo simulations. The simulating means for the Se and Sp, estimated from the study, were 95.7% (5<sup>th</sup> percentile of 91.7%; 95<sup>th</sup> percentile of 98.5%) and 99.3 % (5<sup>th</sup> percentile of 98.5 %; 95<sup>th</sup> percentile of 99.8 %), respectively. Out of the 10,000 simulations for the current *Neospora caninum* seroprevalence study, 12 to 86 % of the data (a value of < 0) for each study herd except Herd A were removed prior to estimating the TPs. The respective statistical precisions for *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* were improved from  $\pm 3$  % to  $\pm 2.6$  % and 0.6 %, because of the eventual total number of samples of 1361 and 1357 (larger than planned) and the overall percentage of samples classified as test-positive of 36 % and 1 % (smaller than expected).

## DISCUSSION

The present studies in Uruguay have investigated the seroprevalence estimates of *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. Prevalence of *Toxoplasma gondii* in sheep were reported at 28.7–38.5 % in Uruguay (11) and 51.5 % in Brazil (12). Workers observed prevalence of *Neospora caninum* in sheep at 0.625 % in New Zealand (3) and 9.5 % in Brazil (12). Detection of these two disease infections can be limited by the sample size used during herd surveys. If the survey programme includes fewer than 30 samples per herd, the risk of missing the detection of the first infected animal (first index case) is increased (13). Early detection of a recent infection is dependent on the frequency of sampling, sample size and the Se of the test. Also, there is not a serological test

that has both 100 % Se and 100 % Sp available for *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum*. To commence a periodical monitoring programme in an unknown situation, the necessary initial step should be to determine the prevalence of the *Toxoplasma gondii* and *Neospora caninum* in each herd, farm or region. Except for the smallest sample size of 29 for *Toxoplasma gondii* and 28 for *Neospora caninum* (the Herd E), the sample sizes in this study met the expectations above. Therefore, almost all the TPs estimated in this study can be used to know the situation in each farm. The authors used a Rogan–Gladen estimation in combination with Monte Carlo simulation. The Rogan–Gladen approach has the advantage that it is widely known and also can be used as a simple deterministic function (entering fixed values for Pos, Se and Sp) which is not needed any specific software for calculation. On the other hand, there is a disadvantage of Rogan–Gladen estimator that can yield negative results (< 0) in the case of certain combinations of Pos, Se and Sp, even if Monte Carlo simulation is used simultaneously. Using Bayesian inference based on Markov chain Monte Carlo methods, that can be conducted in the software WinBUGS (<http://www.mrc-bsu.cam.ac.uk/bugs>), improves the disadvantage, and it should be considered as further risk assessment.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was conducted as part of the project for the capacity development for improvement of livestock hygiene in the southern part of South America through regional cooperation [in Spanish: Proyecto de desarrollo profesional continuo para los veterinarios del Sur (PROVETSUR)] funded by the Japan International Cooperation Agency.

## BIBLIOGRAPHY

1. Bonino J, Cavestany D. Aspectos de pérdidas reproductivas de origen infeccioso en ovinos. Producción Ovina. 2005, 17: 69–76.
2. Samra NA. Sero-prevalence and zoonotic implication of toxoplasmosis in sheep in South Africa. MVSc dissertation submitted to University of Pretoria, Pretoria (South Africa), 2006, p. 102, <http://upetd.up.ac.za/thesis/available/etd-04112008-161617/unrestricted/dissertation.pdf>, accessed on 23 June 2011.
3. Reichel MP, Rossa GP, McAllister MM. Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the serological diagnosis of *Neospora caninum* infection in sheep and determination of the apparent prevalence of infection in New Zealand. Vet. Parasitol. 2008, 151 (2–4): 323–326.
4. Martin SW, Meek AH, Willeberg P. Veterinary epidemiology. Iowa State University Press, Ames (USA), 1987, p. 343.
5. FAO–AGAL. Livestock sector brief–Uruguay. <http://>

**K Suzuki y col.**

[www.fao.org/ag/againfo/resources/en/publications/sector\\_briefs/1sb\\_URY.pdf](http://www.fao.org/ag/againfo/resources/en/publications/sector_briefs/1sb_URY.pdf), accessed on 23 June 2011.

6. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca (MGAP). Division Contralor de Semovientes (DI.CO.SE.). <http://www.mgap.gub.uy/dgsg/DICOSE/dicose.htm>, accessed on 23 June 2011.

7. FAO. FAOSTAT. <http://faostat.fao.org/default.aspx>, accessed on 23 June 2011.

8. Hintze J. PASS 2008 software. Kaysville(USA), 2008.

9. IDEXX. Controlling reproduction losses in herds—impact and diagnostics of four major abortive diseases: *Neospora caninum*. Animal Health Updates. 2007, [http://www.idexx.com/view/xhtml/en\\_us/livestock-poultry/newsletter/2007/200708.jsf#fnn](http://www.idexx.com/view/xhtml/en_us/livestock-poultry/newsletter/2007/200708.jsf#fnn), accessed on 23 June 2011.

10. Rogan WJ, Gladen B. Estimating prevalence from results of a screening—test. Amer. J. Epidemiol. 1978, 107(1): 71-6.

11. Freyre A, Bonino J, Falcón J, Castells D, Correa O, Casaretto A. The incidence and economic significance of ovine toxoplasmosis in Uruguay. Vet. Parasitol. 1997, 73 (1–2): 13–15.

12. Romanelli PR, Freire RL, Vidotto O, Marana ER, Ogawa L, De Paula VS, Garcia JL, Navarro IT. Prevalence of *Neospora caninum* and *Toxoplasma gondii* in sheep and dogs from Guarapuava farms, Paraná State, Brazil. Res. Vet. Sci. 2007, 82: 202-207.

13. Dohoo I, Martin W, Stryhn H. Veterinary epidemiologic research, 2nd ed. AVC Inc., Charlottetown (Canada), 2000, p. 865.

## DEGENERACIÓN CORNEAL EN UN CANINO COMO ÚNICO SIGNO DE HIPOTIROIDISMO, DESCRIPCIÓN DE UN CASO

Meana MV<sup>1</sup>, Cassagne PN<sup>2</sup>, Zapata GL<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Auxiliar, Hospital de Clínicas <sup>2</sup> Becaria, Hospital de Clínicas

<sup>3</sup> Docente, Hospital de Clínicas. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

**RESUMEN:** los depósitos corneales pueden ser causa de lesiones crónicas locales o enfermedades sistémicas. Esta alteración en la transparencia corneal se denomina degeneración corneal y ocurre como consecuencia del depósito de lípidos, calcio o su combinación. Los autores reportan un caso de degeneración corneal bilateral en un canino macho de 4 años asociado a una presentación atípica de hipotiroidismo. Donde se demuestra el diagnóstico y su posterior respuesta al tratamiento.

**Palabras clave:** Córnea, degeneración corneal, hipotiroidismo, dislipidemia, canino.

## CORNEAL DEGENERATION IN A CANINE AS ONLY SIGN OF HYPOTHYROIDISM, REPORT OF A CASE

**ABSTRACT:** corneal deposits may be caused by local chronic injuries or systemic diseases. This alteration in corneal transparency is called corneal degeneration and occurs as a result of lipid deposition, calcium or their combination. The authors report a case of bilateral corneal degeneration in a 4 year old male dog associated with an atypical presentation of hypothyroidism. Where it shows the diagnosis and subsequent treatment response.

**Key Words:** cornea, corneal degeneration, hypothyroidism, dyslipidemia, canine.

Fecha de recepción: 17/04/11

Fecha de aprobación: 25/04/11

---

**Dirección para correspondencia:** Gustavo Zapata, Hospital de Clínicas. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

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

## INTRODUCCIÓN

La transparencia corneal es mantenida por factores tales como la disposición del entramado de las fibras de colágeno, el estado de relativa deshidratación aportado por el endotelio, la ausencia de vasos sanguíneos, como así también de queratina y pigmentos y una superficie óptica lisa (1).

Dentro de las causas de pérdida de transparencia corneal, pueden encontrarse acúmulo de sustancias lipídicas o calcáreas, o su combinación, ubicadas en las diferentes capas corneales aunque la presentación subepitelial es la más común (2, 3, 4).

Estos infiltrados cristalinos no celulares pueden ser procesos primarios denominados distrofias corneales o depósitos secundarios como consecuencia de afecciones corneales crónicas o enfermedades sistémicas (2, 5). Dentro de las afecciones corneales crónicas podemos nombrar: queratitis, uveítis, phthisis bulbi y glaucoma. En las enfermedades sistémicas se incluyen todas aquellas que alteren la lipemia o calcemia (5, 6). La queratoconjuntivitis seca también puede ser un factor predisponente (7, 8).

Las distrofias corneales se presentan con cierta predisposición racial y se describen como opacidades ovals, de ubicación central, generalmente bilaterales simétricas, sin respuesta inflamatoria y no asociadas con enfermedad sistémica que comprometen diferentes estructuras (1, 2), afectan mínimamente la visión y por lo general no requiere tratamiento (1).

La degeneración corneal por su parte es un trastorno adquirido precedido o acompañado por manifestaciones de inflamación ocular y asociados por lo general a enfermedades sistémicas (3, 5, 9, 10, 11). Las lesiones se pueden presentar de manera unilateral o bilateral, con una forma que varía de acuerdo a la causa desencadenante

(9, 12). El estroma corneal es el lugar donde se depositan los diferentes componentes con mayor frecuencia. Es una enfermedad de diagnóstico más frecuente en caninos que en felinos (1, 9).

En el siguiente trabajo se describe la signología oftalmológica, metodología diagnóstica y tratamiento de un canino con pérdida de transparencia corneal arribando al diagnóstico final de hipotiroidismo, con presentación atípica.

## REPORTE DEL CASO

Fue presentado a consulta un paciente canino mestizo Collie, macho de cuatro años de edad. El motivo de consulta fue la presencia de opacidad ocular bilateral. El propietario comentó que dichas manchas tenían una progresión de seis meses, sin presentar molestia ocular. Había recibido tratamiento con diferentes productos en el transcurso de cuatro meses, sin resultados exitosos. No reportó otro tipo de alteraciones, físicas ni de comportamiento.

Al examen neuro-oftalmológico el paciente presentó respuestas normales y no se observaron alteraciones anatómicas a nivel palpebral. La conjuntiva bulbar manifestó una leve hiperemia.

Al realizar el test de Schirmer (Showa Yakuhin Kako Co., Japón) se observa una producción normal de lágrimas (20 mm/min en ojo derecho y 19 mm/min en el ojo izquierdo). La tinción con fluoresceína y Rosa de Bengala dieron resultado negativo. La presión intraocular medida mediante tonómetro de aplanación (TONO-PEN XL, Medtronic Solan, EE.UU.) se halló dentro de valores normales (13 mm Hg en ojo derecho y 12 mm Hg en ojo izquierdo).

En ambas córneas se evidencia una opacidad blanquecina con forma de arco ubicada en región paraaxial temporal sin invadir limbo corneal, asociada a neovascularización severa. (Figura 1 a y b).



**Figura 1 a y b:** Obsérvese la opacidad corneal blanco-nacarada en forma de medialuna en la región lateral con neovascularización, siendo esta última mas severa en el ojo izquierdo.



**Figura 2 a y b:** Nótese el aspecto de ambos ojos; a los 30 días de tratamiento; se observa una disminución marcada de la opacidad corneal y no se observan neovasos corneales.

Mediante el examen con lámpara de hendidura (Kowa SL-14, Japón) se observó que la opacidad ocupaba el estroma anterior mientras que la parte posterior de la córnea y la cámara anterior eran normales. Otros tejidos oculares no presentaron particularidades.

Al examen físico del paciente las constantes fisiológicas se encontraron dentro de parámetros normales.

Se solicitó análisis de sangre a fin de evaluar la presencia de dislipidemias y alteraciones en la calcemia, orientando el diagnóstico hacia un proceso sistémico.

Hasta obtener los resultados se realizó un tratamiento en forma empírica con prednisolona tópica cada 8 horas (PREDNEFRIN FORTE® 1 %, LABORATORIO ALLERGAN) y ácido etilendiaminotetracético (EDTA) en una dilución de 4 % en lágrimas artificiales (BIOTEARS, alcohol polivinílico 1,4 g, Biotech Pharma).

Los resultados del análisis de laboratorio evidenciaron un valor disminuido de L-Tiroxina (T4) de 0,8 ug/dl (valor normal 1,5- 4 µg/dl), T4 libre de 0,44 ng/dl (valor normal 1,6- +- 0,9 ng/dl) y hormona estimulante de tiroides (TSH) 0,53 ng/dl (valor normal 0,03-0,35); estos datos asociados a valores de colesterol (456 mg/dl con un rango normal de 100-300) y triglicéridos (145 mg/dl con un rango normal hasta 100 mg/dl) permitieron arribar al diagnóstico de hipotiroidismo. Se descartaron enfermedades tales como hiperadrenocorticismo al obtenerse valores de Fosfatasa Alcalina de 120 µ/l (rango normal hasta 200 µ/l), calcemia de 9,4 mg/dl (normal hasta 12 mg/dl). El resto de los datos de laboratorio resultaron normales, excluyendo así los demás diagnósticos diferenciales (diabetes mellitus, pancreatitis).

Al arribar al diagnóstico final de hipotiroidismo se suspendió el ácido etilendiaminotetracético, continuando con la aplicación de prednisolona tópica, e instaurándose en adición un tratamiento

con levotiroxina a una dosis de 0,02 mg/Kg.

Al mes de evolución el paciente evidencia una marcada disminución tanto en la opacidad corneal como en la neovascularización, lo cual se asoció a una normalización de datos de laboratorio: L- Tiroxina (T4) 1,1 µg/dl, T4 libre 0,95 ng/dl, hormona estimulante de tiroides (TSH) 0,13; colesterol 270 mg/dl y triglicéridos 45 mg/dl (Figura 2 a y b).

La signología ocular remitió luego de seis meses de iniciado el tratamiento.

## DISCUSIÓN

La presencia de opacidad corneal blanquecina en la región para-axial bilateral con severa neovascularización fue consecuencia del proceso hiperlipidemia producido por la alteración en la función tiroidea; hipotiroidismo. Estudios raciales no evidenciaron que perros de raza Collie y sus cruza, como es nuestro paciente, tengan mayor predisposición a padecer dicha enfermedad (13).

En nuestro caso el canino solo presento alteraciones corneales considerándose un caso poco frecuente de hipotiroidismo. Los pacientes que padecen esta enfermedad exhiben una gran variedad de signos clínicos. Los de mayor incidencia son aumento de peso (48 %), letargia (35 %), alteraciones dermatológicas (33 %) y neuromusculares (12 %). Las manifestaciones oculares son infrecuentes en esta enfermedad endócrina, entre las cuales se citan alteraciones intraoculares (uveítis, humor acuoso lipémico, lipemia retiniana) y de superficie ocular como queratoconjuntivitis seca y degeneración corneal (1, 8, 10, 13, 14, 15, 16). La incidencia de los depósitos lipídicos corneales es descripta en el 1 % de los perros hipotiroideos (13).

La disminución de la hormona tiroidea produce una reducción en el metabolismo lipídico, la excreción fecal del colesterol y la conversión de

lípidos en ácidos grasos por consiguiente estas alteraciones metabólicas aumentan los niveles en sangre produciendo un cuadro hiperlipémico (13).

Diferentes trabajos demostraron la predisposición de tejidos con colágeno y elastina a padecer depósitos de lípidos, componentes que forman gran parte de la córnea e íntima de vasos sanguíneos (3, 11, 16). Según estudios realizados las partículas lipídicas depositadas en estos tejidos se agregan formando cristales de un mayor tamaño que las plasmáticas; este cambio en las partículas produce una disminución en la capacidad de difundir, lo que favorece su acúmulo (17, 18, 19).

Los lípidos pueden arribar a la córnea por diferentes vías, tales como capilares limbo-esclerales superficiales y profundos, película lagrimal y humor acuoso (3). Estos depósitos son más extensos si están asociados a neovascularización como respuesta a un proceso inflamatorio (10).

El hipotiroidismo en el canino es una enfermedad que responde en forma favorable a la suplementación oral con levotiroxina de por vida. La normalización de los niveles hormonales conlleva a la normolipemia. La administración de esta droga asociada a corticoides tópicos produjo en el paciente la restauración de la transparencia corneal conjuntamente con la desaparición de los neovasos.

En conclusión; los autores consideran que el diagnóstico de degeneración corneal en el canino amerita un examen semiológico completo del paciente. Esto permitirá; como en nuestro caso; el diagnóstico de enfermedades sistémicas que alteren la lipidemia. Esto posibilita la instauración de un tratamiento tanto específico como ocular, logrando así mantener la normolipemia y la transparencia corneal.

## BIBLIOGRAFIA

1. Maggs D. Cornea y esclera. En Slatter, Fundamentos de oftalmología veterinaria. 4° ed. Elsevier. Barcelona (España) 2009. p. 179-206.
2. Samson J, Blunden T. Calcareous degeneration of the canine cornea. *Vet Ophthalmol* 2010; 13 (4): 238-243.
3. Laus JL, Dos Santos C, Talieri IC, Oriá AP, Bechara GH. Combined corneal lipid and calcium degeneration in a dog with hyperadrenocorticism: a case report. *Vet Ophthalmol* 2002; 5 (1): 61-4.
4. Bedford PGC, Careth Jones R. Aspecto anormal. En: *Oftalmología de pequeños animales: un enfoque orientado a la resolución de problemas*. 3° ed. Elsevier. 2002 p.59-102.
5. Aroch I, Ofri R, Sutton G. Manifestaciones oculares de enfermedades sistémicas. En: *Slatter, Fundamentos de oftalmología veterinaria*. 4° ed. Elsevier. Barcelona (España) 2009. p. 381-425.

6. Halenda MR, Moore C. Presumed lipid retinopathy in a diabetic dog. *Vet Ophthalmol* 1998; 1 (2 - 3): 171-174.

7. Quimby MA, Schwartz RS, Poskitt T, Lewis RM. A disorder of dogs resembling Sjogren's syndrome. *Clin Immunol Immunopathol* 1979; 12: 471-476.

8. Williams DL, Pierce V, Mellor P, Heath MF. Reduced tear production in canine endocrinopathies. *J Small Anim Pract* 2007 May; 48(5):252-6.

9. Crispin SM. La película lagrimal preocular y las alteraciones de córnea y conjuntiva. En: *Manual de oftalmología de pequeños animales*. Harcourt Brace. Barcelona (España) 1999. p. 141-76.

10. Kouchi M, Ueda Y, Horie H, Tanaka K. Ocular lesions in Watanabe heritable hyperlipidemic rabbits. *Vet. Ophthalmol.* 2006 May-Jun; 9 (3): 145-8.

11. Reddy C, Stock E, Mendelsohn AD, Nguyen HS, Roth SI, Ghosh S. Pathogenesis of experimental lipid keratopathy: corneal and plasma lipids. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1987 Sep; 28 (9): 1492-6.

12. Harrington GA, Kelly DF. Corneal lipoidosis in a dog with bilateral thyroid carcinoma. *Vet Pathol* 1980; 17 (4): 490-517.

13. Feldman E, Nelson R. Hipotiroidismo, sección 2, cap. 3. En: *Feldman E., Nelson R. Endocrinología y reproducción canina y felina*. 3° ed. Inter-médica. Buenos Aires (Argentina) 2007 p. 98-170.

14. Martin C. Ocular manifestation of systemic disease. In: *Gelatt K. Veterinary ophthalmology* 3° ed. 1999. Lippincott Williams & Wilkims. Philadelphia (USA) p. 1401-1448.

15. Collins BK, Moore C. Disease and surgery of the canine anterior uvea. In: *Gelatt K. Veterinary ophthalmology* 3° ed. 1999. Lippincott Williams & Wilkims. Philadelphia (USA) p. 755-795.

16. Fernandez A, Sorokin A, Thompson PD. Corneal arcus as coronary artery disease risk factor. *Atherosclerosis* 2007; 193 (2): 235-40.

17. Waters LL. The effect of heparin clearing on the removal of chylomicron lipids from the living cornea. *Yale J Biol Med* 1968; 41 (3): 268-72.

18. Sprangler WL, Waring GO, Morrin LA. Oval lipid corneal opacities in Beagles. *Vet Pathol* 1982; 19 (2): 150-9.

19. Roth AM, Ekins MB, Waring GO 3<sup>rd</sup>, Gupta LM, Rossenblatt LS. Oval corneal opacities in Beagles. III. Histochemical demonstration of stromal lipids without hyperlipidemia. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 1981; 21 (1pt1): 95-106.

## CHRONIC OSTEOARTHRITIS IN A CAPTIVE MOUNTAIN LION (*Felis concolor*)

Briceño AM<sup>1</sup>, Garcia F<sup>1</sup>, Gómez M<sup>2</sup>, Alvizu E<sup>3</sup>, Morales I<sup>3</sup>, Chiachio N<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Department of Veterinary Pathology. Faculty of Veterinary Science

<sup>2</sup>Faculty of Agronomic, Central University of Venezuela. Aragua State.

<sup>3</sup>Zoological Park "El Pinar", Caracas-Venezuela.

**ABSTRACT:** A 23-year-old male Mountain Lion (*Felis concolor*) died after developing chronic lameness in the Zoological Park "El Pinar", Caracas-Venezuela. Were practice euthanasia. Grossly, the radio-ulnar- humeral joint had severe bilateral lesions on the surface of the articular cartilage, with erosion of the cartilage and exposure of subcondral bone. There was approximately 1 ml of synovial fluid that was yellowish, and had a decreased viscosity. Histopathology revealed severe erosion and ulceration of the articular cartilage, with variable degrees of exposure of the subcondral bone. Bone tissue had defective osteoid matrix formation, and mineralization failure, resulting in loss of bone lamellae. Radiographic changes included decreased cortical density, trabecular growth pattern, fractures and microfractures. Failure in the formation of bone callus, and presence of osteophytes. These reports support the osteoarthritis and degenerative disease joint under conditions of captivity in a mountain lion.

**Key Words:** Osteoarthritis, Mountain lion, *Felis concolor*, pathology, articular

## OSTEOARTRITIS CRONICA EN UN LEON DE MONTAÑA (*Felis concolor*) EN CAUTIVERIO

**RESUMEN:** Un león de montaña (*Felis concolor*), macho de 23 años de edad Montaña desarrollo una claudicación crónica en el parque zoológico "El Pinar", Caracas-Venezuela. Se le practico eutanasia. Macroscópicamente, la articulación humero-radio-cubital, presento severas lesiones bilaterales en la superficie del cartilago articular, con erosión del cartilago y exposición del hueso subcondral. Aproximadamente 1 ml de líquido sinovial presento de color era amarillento y una viscosidad disminuida. La histopatología reveló una severa erosión y ulceración del cartilago articular, con grados variables de exposición del hueso subcondral. El tejido óseo presento defectuosa formación de la matriz osteoide, con fallas en la mineralización, lo que resulta en la pérdida de laminillas óseas. Los cambios radiográficos incluyen disminución densidad cortical, el patrón de crecimiento trabecular, las fracturas y microfracturas. Fallas en la formación de callo óseo, y la presencia de osteofitos. Estos resultados son consistentes con artrosis y enfermedad degenerativa que son comunes en condiciones de cautiverio en el león de montaña.

**Palabras clave:** Artrosis, puma, *Felis concolor*, patología articular.

Fecha de recepción: 06/07/11

Fecha de aprobación: 06/12/11

**Dirección para correspondencia:** Jabelardo Morales Briceño Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Central University of Venezuela, ADDRESS Maracay, Aragua State Venezuela

**Email:** aamorales13@gmail.com

## A. Moralesy col.

Osteoarthritis is a chronic degenerative disorder that is defined as the progressive degeneration of the cartilage in a joint (3, 4, 6). This noninflammatory disorder may follow a trauma or it may be a complication of malformations. Osteoarthritis affects the articular cartilages. Healthy cartilages are smooth and prevent friction when the joint surfaces rub each other. It has a cushioning effect in the joint, acting as a shock absorber during movement. In osteoarthritis, also called wear and tear arthritis, the cartilage wears off and the surfaces of the bones become rough (5). Under those conditions, friction causes pain, swelling, and loss of motion of the joint. Pieces of bones or cartilage can also break off and float in the joint space. There is also the possibility of bone spurs or osteophyte formation (2). The aim of this study was to describe osteoarthritis in a Mountain Lion (*Felis concolor*).

A 23-year-old male Mountain Lion (*Felis concolor*) died after chronic lameness in the Zoological Park "El Pinar", Caracas-Venezuela. Were practice euthanasia by prostration and anorexia. Grossly, there was xanthomatosis of subcutaneous tissue, the liver was swollen, friable and there was a nodular hyperplastic post necrotic lesion. The radio-ulnar-humeral joint had severe bilateral lesions on the surface of the articular cartilage, with erosion and exposure of subcondral bone (Fig. 1). There was approximately 1 ml of synovial fluid that was yellowish, and had a decreased viscosity. Histopathology revealed severe fatty degeneration, micronodular post necrotic hyperplasia with multifocal hepatic necrosis. The histological section of joint tissue revealed erosion and ulceration of articular cartilage, with variable degrees of exposure of the subcondral bone (Fig. 2). Bone tissue had defective osteoid matrix formation, and mineralization failure (Fig. 3), resulting in loss of bone lamellae. Radiographic changes included decreased cortical density, trabecular growth pattern, fractures and microfractures. Failure in the formation of bones callus, and presence of osteophytes.

These findings support the diagnosis of osteoarthritis and degenerative joint disease in a mountain lion kept in captivity. Nutritional problems are common in wild animals in captivity. There is abundant evidence that diet and health are intimately related. Feed intake is essential for normal metabolic function and deletions are inappropriate diet in disease. A disease is often a primary effect of a deficit or excess nutrients. The diet-deficit or excess of nutrients influence the course of diseases (3, 4). Hyperthyroidism in young adult cats is associated to secondary hyperparathyroidism due to increase of PTH and decrease of ionized calcium (7). Combined effects of thyroid hormones and PTH contribute to the reduction of bone mineral density (1).



Figure 1.- Macroscopic aspect of the radio-ulnar-humerus joint of a mountain lion. There is severe damage in the articular cartilage with congestion, erosion and exposure extensive of subcondral bone bilateral.

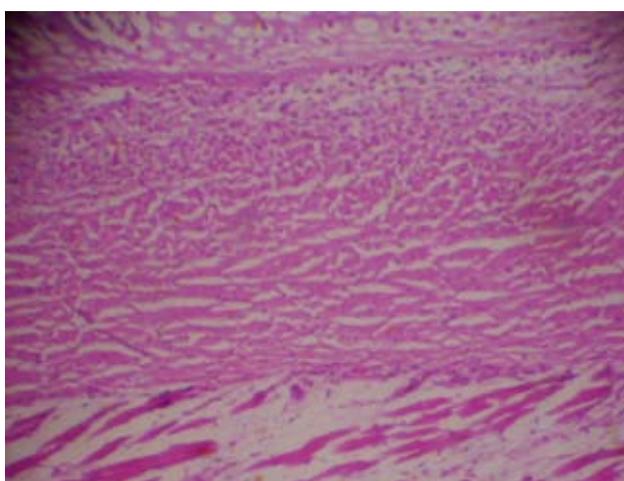


Figure 2.- The histological section of joint tissue revealed erosion and ulceration of articular cartilage, with varying degree of exposure of subcondral bone (H&E, obj. 10x).

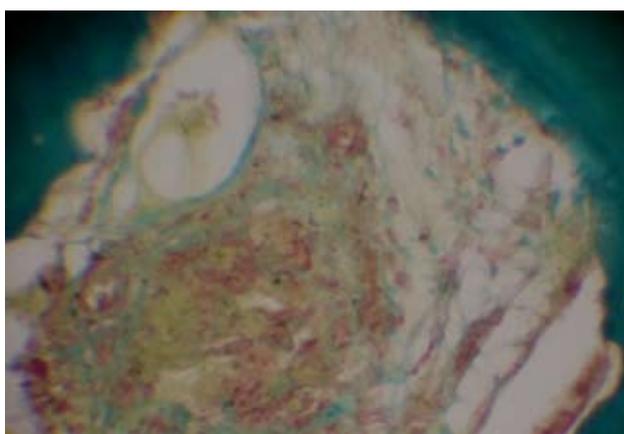


Figure 3.- The histological section of joint tissue revealed erosion and ulceration of articular cartilage, with varying degree of exposure of subcondral bone. (Von Kossa, obj. 10x).

In conclusion, were report describes a case of severe chronic osteoarthritis in a Mountain Lion (*Felis concolor*) kept in captivity. This is the first report on syndrome of osteoarthritis and degenerative joint disease in a mountain lion in a Zoological Park in Venezuela.

**REFERENCES**

1. Cardoso M, Costa F, Muniz L, Valerio M, Melussi M. Hyperparathyroidism in cats with experimental hyperthyroidism. *Arq Bras Med Vet Zootec.*, 2008. 60: 620-625.
2. Chesnev Rw, Hedberg G. Rickets in lion cubs at the London Zoo in 1889: some new insights. *Pediatrics.*, 2009. 123: 948.
3. Fowler, M. *Zoo & Wild Animal Medicine*. Second edition. W.B. Saunders Company. Philadelphia USA. 1986. pp. 71-96 pages.
4. Fowler M, Miller E. *Zoo & Wild Animal Medicine*. Current therapy 4. Philadelphia USA. 1999. pp. 63-82.
5. Hand M, Thatcher C, Remillard R, Roudebush P. *Small animal clinical nutrition*. Fourth edition. Mark Morris Institute. Santa Fe de Bogota Colombia. 2000. pp. 1097-1118.
6. Jubb K, Palmer N. *Pathology of Domestic Animals*. Second edition. Academic Press. New York. United State. 1985. pp. 126-138. Fifty edition available.
7. Herz V, Kirberger RM. Nutritional secondary hyperparathyroidism in a white lion cub (*Panthera leo*), with concomitant radiographic double cortical line. *J S Afr Vet Assoc.* Mar., 2004. 75: 49-53.

## RESISTENCIA BACTERIANA A LOS ANTIMICROBIANOS OCASIONADA POR BOMBAS DE EFLUJO. IMPACTO EN LA MULTIRRESISTENCIA

Marchetti ML<sup>1,2</sup>, Errecalde J\*<sup>1</sup>, Mestorino N<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

<sup>2</sup>Beca Doctoral del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, CONICET.

**RESUMEN:** La resistencia a los antimicrobianos representa un severo problema a nivel mundial. Se han descrito variados mecanismos de resistencia, entre los cuales se encuentran las bombas de eflujo. Estas son proteínas transportadoras de membrana, organizadas en superfamilias y distribuidas ubicuamente entre organismos procariotas y eucariotas. Los genes que codifican para las bombas de eflujo pueden estar localizados en el cromosoma bacteriano o bien en elementos genéticos transmisibles como los plásmidos. Algunos sistemas tienen la capacidad de expulsar antimicrobianos estructuralmente disímiles (Multiple Drug Resistance: MDR). La presencia de los mismos en combinación con otros mecanismos genera altos niveles de resistencia entre patógenos y comensales originando un consecuente fracaso terapéutico. Debido a la creciente importancia de este mecanismo de defensa microbiano se están investigando diversas estrategias para modificar y revertir la resistencia bacteriana por eflujo.

**Palabras clave:** Multirresistencia – antimicrobiano – bomba de eflujo – bacterias

## BACTERIAL ANTIBIOTIC RESISTANCE BY EFFLUX PUMPS. MULTIDRUG RESISTANCE IMPACT

**ABSTRACT:** Bacterial antimicrobial resistance is a serious problem worldwide. Several mechanisms of resistance have been described, among which are efflux pump systems. These systems are constituted by protein transporters organized in superfamilies and ubiquitously distributed among eukaryote and prokaryote organisms. The genes encoding efflux pumps can be found in the bacterial chromosome or in transmissible genetic elements such as plasmids. Some efflux pump systems may transport structurally dissimilar antimicrobial agents (Multiple Drug Resistance: MDR). Antibiotic efflux in association with other resistance mechanisms could confer high resistance level in commensal and pathogen bacteria causing consequent therapeutic failures. Due to the increasing importance of this microbial defense mechanism, several strategies to modify and reverse bacterial resistance by efflux pumps are currently being explored.

**Key words:** Multidrug resistance – antimicrobial – efflux pump – bacteria

Fecha de recepción: 09/05/11

Fecha de aprobación: 20/10/11

**Dirección para correspondencia:** Nora Mestorino, Cátedra de Farmacología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

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

## INTRODUCCIÓN

Poco tiempo luego del inicio de la era de los antimicrobianos, cuando los efectos de los antibióticos sobre las bacterias fueron descritos por primera vez, el fenómeno de resistencia microbiana comenzó a ser notado por diferentes investigadores. Sin embargo, fue tomado más como una curiosidad que como un hecho clínico de trascendencia (1).

Ante la llegada de un nuevo antimicrobiano a la clínica, es muy probable que ya existan variedades bacterianas capaces de resistir a su acción, o que estas aparezcan y se seleccionen con velocidad variable, la que únicamente podrá ser controlada y demorada a través del uso racional de los antimicrobianos, ya que seguramente no se podrá evitar su emergencia (1, 2).

Actualmente, la antibióticorresistencia genera preocupación en los más elevados niveles de decisión mundial, pues resulta un problema extremadamente severo para la salud pública. La OMS, OIE y FAO han emitido documentos conjuntos fijando posición y haciendo recomendaciones a los países miembros (Joint Workshops Ginebra 2003, Oslo 2004, Seúl 2006, Roma 2007).

Básicamente la transmisión de la resistencia se produce por mutación, pero fundamentalmente por adquisición de material genético exógeno tanto en bacterias patógenas como en aquellas pertenecientes a la flora comensal de hombres y animales (3, 4). La transmisibilidad de los factores de resistencia, sumado a la aparición de fenotipos bacterianos que expresan resistencia a un amplio rango de quimioterápicos químicamente disímiles al mismo tiempo, puede dar lugar a un problema aún mayor que es la *multirresistencia* (5, 6).

Existen determinados tipos de infecciones en seres humanos, generadas por gérmenes multirresistentes, para las que ya no hay terapia eficaz. Las causas provienen de la mala utilización de los antimicrobianos (uso innecesario, dosis bajas, intervalos incorrectos, tratamientos cortos, etc.), a lo que se le suma en Medicina Veterinaria el uso de los antimicrobianos como promotores del crecimiento, sobre todo en explotaciones intensivas.

El objetivo central de esta revisión es describir el mecanismo de resistencia bacteriana a los antimicrobianos por bombas de eflujo, a los efectos de conocer su estructura, regulación, localización e importancia, para así concientizar acerca del verdadero impacto de estos sistemas como generadores de multirresistencia tanto en microorganismos comensales, como en patógenos.

## MECANISMOS DE RESISTENCIA

Los microorganismos viven íntimamente en contacto con el medio ambiente. Tanto los

comensales como los patógenos deben protegerse frente a los agentes agresores específicos e inespecíficos del huésped. Por ello, no resulta sorprendente que las especies unicelulares hayan desarrollado una amplia y elaborada gama de defensas frente a los mismos a fin de reducir o prevenir la acumulación de sustancias nocivas no deseadas.

A través de la evolución de los microorganismos se han ido seleccionando verdaderos mecanismos de defensa frente a los efectos tóxicos de los antimicrobianos y otros fármacos. Uno de estos mecanismos involucra la producción de enzimas hidrolíticas capaces de inactivar directamente al antimicrobiano en cuestión como es el ejemplo de las  $\beta$ -lactamasas, o bien enzimas que transforman a la molécula en un derivado sin actividad intrínseca como ocurre con las enzimas que fosforilan o acetilan a los aminoglucósidos (7, 8). Otro mecanismo es la alteración química de la diana sobre la que actúa el antibiótico por mutación o modificación enzimática, que usualmente suele ser una enzima metabólica esencial de la bacteria, o la expresión de una molécula diana alternativa no factible de ser inhibida por la acción del principio químico (9, 10). El tercer mecanismo es la modificación de la permeabilidad, ya sea por disminución de la permeabilidad natural de la membrana externa con modificaciones en el tamaño o número de las porinas, o bien por excreción activa del antibiótico acumulado en la célula a través de las proteínas que conforman los sistemas de eflujo (11, 12).

## ¿QUE SON LAS BOMBAS DE EFLUJO?

Las bombas de eflujo son transportadores de membrana involucrados generalmente en la extrusión de sustancias tóxicas desde el interior de las células hacia el medio externo. Estas proteínas se encuentran presentes en microorganismos grampositivos, gramnegativos y eucariotas. Las células bacterianas y las eucariotas tienen variados sistemas transportadores de membrana con múltiples funciones vitales como ingreso de nutrientes, excreción de sustancias tóxicas y mantenimiento de la homeostasis (12, 13).

En las bacterias productoras de antibióticos, los sistemas de eflujo les confieren autoinmunidad, así como también les otorga protección contra las sustancias agresoras con capacidad antimicrobiana presentes en su medio ambiente natural. Sin embargo, la mayoría de los sistemas bacterianos de eflujo parecen tener roles en otros procesos como la comunicación intercelular y la exportación de sustancias tóxicas como se mencionó previamente (14).

Todos los genomas bacterianos estudiados contienen diversidad de bombas de eflujo, claro indicio de su origen ancestral. Se ha estimado que

entre el 5 -10% de todos los genes están involucrados en el transporte y una gran proporción de los mismos codifica para bombas de eflujo (6).

Las bombas de eflujo pueden ser específicas para un sustrato, o bien pueden transportar una amplia variedad de compuestos químicamente diferentes, incluyendo antimicrobianos de múltiples clases (de allí el término Multiple Drug Resistance: MDR). En este último caso las bombas pueden estar asociadas con múltiple resistencia antimicrobiana. Estas han resultado ser un grave problema en la antibioterapia, ya que la presencia de bombas tipo MDR en una célula bacteriana puede implicar disminución de la susceptibilidad a un amplio rango de quimioterápicos químicamente disímiles al mismo tiempo (6).

Una característica llamativa de estos sistemas es su ubicuidad. Hay sistemas que solo están presentes en algunas cepas de una especie bacteriana, pero la gran mayoría se encuentran en el genoma de todos los individuos pertenecientes a dicha especie (15).

Reconocen un gran número de compuestos farmacológicos no relacionados entre sí, debido a que la identificación del sustrato está basada en las propiedades físico-químicas (hidrofobicidad, aromaticidad, capacidad de ligar hidrógeno y carácter ionizable) y no en propiedades químicas definidas, como ocurre en el caso de enzima-sustrato o reconocimiento de ligando-receptor (16).

El hecho de que los sistemas MDR sean ubicuos e intervengan en el bombeo de numerosos antibióticos los convierte en blancos ideales para la búsqueda de nuevos inhibidores bacterianos, que hagan que las bacterias que portan estos sistemas sean más sensibles a los antibióticos actualmente existentes en el repertorio clínico. Se ha demostrado que la inactivación de dichos sistemas mutantes de *Escherichia coli*; *Staphylococcus aureus*; *Haemophilus influenzae* y *Pseudomonas aeruginosa* produce un descenso en las concentraciones mínimas inhibitorias (CIMs) de distintos antibióticos (17).

## **SISTEMAS DE EFLUJO FAMILIAS DE BOMBAS Y ORGANIZACIÓN**

Los sistemas de eflujo están agrupados en familias de proteínas transportadoras basadas en la homología de las secuencias de aminoácidos, las similitudes en el tamaño y las estructuras secundarias (12).

Filogenéticamente las bombas de eflujo pertenecen a cinco superfamilias denominadas: (1) familia de casete de unión al ATP (ABC, por sus siglas en inglés, *ATP binding cassette*); (2) superfamilia del facilitador mayor (MFS, *major facilitator superfamily*); (3) familia de extrusión de multifármacos y tóxicos (MATE, *multidrug*

*and toxic-compound extrusion*); (4) familia de resistencia pequeña a multifármacos (SMR, *small multidrug resistance*); y (5) familia de resistencia a división por nodulación (RND, *resistance nodulation division*). ABC y MFS son las familias mayores y se piensa que pueden tener un origen común. La primera está conformada por transportadores activos primarios cuya actividad depende de la captación e hidrólisis de ATP, mientras que las superfamilias SMR, MATE, MFS, RND son transportadores secundarios, pues su actividad se lleva a cabo por gradiente de protones (6, 18). Un mínimo de 12 segmentos de transmembrana en su estructura son requeridos para poder llevar a cabo dicha actividad (18).

Dos de estas superfamilias: la familia de casete de unión al ATP (ABC, por sus siglas en inglés, *ATP binding cassette*) y la superfamilia del facilitador mayor (MFS, *major facilitator superfamily*), se encuentran distribuidas ubicuamente entre organismos procariontes y eucariotes. RND, SMR y MATE están descritas únicamente en procariontes. Sin embargo, cabe destacar que muchos transportadores han sido recientemente identificados, en consecuencia no sería extraño que se descubran más familias que pertenezcan tanto a los procariontes como a los eucariotes (16).

Las bombas de la superfamilia ABC (*ATP Binding Cassette*), son transportadores primarios presentes en las células eucariotas, eubacteria, archaeabacteria. Estas bombas utilizan como fuente de energía la hidrólisis de moléculas de ATP. Esta superfamilia comprende dos clases de proteínas diferentes, las denominadas tipo-procarionte (PK-type) y las tipo-eucariota (EK-type). Muchos estudios se enfocan principalmente en la caracterización de este último tipo debido al gran potencial en el campo médico y farmacológico humano. Ambas clases se distinguen en cuanto a su organización genética y sus dominios. PK-type consiste en tres componentes: (1) dos proteínas integrales con seis segmentos transmembranosos, (2) dos proteínas periféricas que capturan e hidrolizan ATP, y (3) una proteína periplásmica donde se une el sustrato. Por otro lado, en un transportador ABC EK-type, la proteína de transmembrana y la que se une al ATP están fusionadas y el transportador consiste en dos cadenas polipeptídicas conteniendo cada una un dominio de transmembrana y un dominio de unión a ATP. Quedan finalmente dos dominios hidrofóbicos de localización membranosa y dos hidrofílicos localizados en la interfase citoplasmática. En las bacterias, los transportadores tipo ABC poseen alta especificidad por el sustrato que incluye azúcares, aminoácidos, cationes metálicos, complejos orgánicos de hierro, vitaminas y antimicrobianos. En el hombre, las proteínas ABC que confieren resistencia a los antitumorales

incluyen a la P-glicoproteína (MDR1) y las proteínas de multirresistencia 1 y 2 (MRP1 y MRP2) (Tabla I) (14, 16, 19, 20).

Los transportadores secundarios de la superfamilia MFS, al igual que los anteriores pueden observarse en bacterias grampositivas, gramnegativas y células eucariotas de algunos mamíferos (21). Se han identificado más de 300 proteínas pertenecientes a esta familia. Representa uno de los grupos más extensos dentro de los transportadores secundarios. Estudios recientes demuestran que en general tienen una estructura conformada por dos dominios proteicos que constituyen un poro de translocación central. Tienen de 12 a 14 segmentos de transmembrana con un sitio de unión al sustrato simple conteniendo un residuo cargado para la unión del protón que será intercambiado por dicho sustrato. Este podría ser un residuo conservado de arginina involucrado en el reconocimiento de las cargas positivas (18).

En cuanto a la familia de resistencia a división por nodulación (RND, *resistance nodulation division*), esta es exclusiva de microorganismos gramnegativos, contando con un espectro de acción amplio, pudiendo reconocer una amplia variedad de sustratos entre ellos antibióticos, así

como también otros agentes farmacológicos como detergentes y antisépticos (22). Los miembros de la superfamilia RND muestran características topológicas comunes, tienen dos lazos, prolongaciones extracitoplasmáticas o "loops" y 12 segmentos de transmembrana (18). Están organizados a modo de sistemas multicompuestos, en los cuales la bomba de eflujo propiamente dicha se encuentra ubicada en la membrana interna y trabaja conjuntamente con una proteína periplásmica de fusión (MFP o Membrana Fusion Protein) que actúa como nexo de unión entre la bomba de eflujo y una proteína de la membrana o porina (OMP: Outer Membrane Protein) situada como su nombre lo dice en la membrana externa (Fig 1) (21, 23, 24, 25).

Un ejemplo de sistema de eflujo perteneciente a la familia RND es el de *acrAB* en *E. coli*. Su sobreexpresión implica un incremento en el número presente de bombas de eflujo con resistencia a variados sustratos como sales biliares y antimicrobianos entre otros. *AcrA* es la proteína periplásmica de fusión miembro de la familia de las proteínas de fusión de membrana (MFP: Membrana Fusion Protein) y *AcrB* es el transportador transmembrana (CMP) perteneciente a la

Tabla I. Clasificación y distribución de los sistemas de eflujo en los organismos procariotas y eucariotas. Adaptado de Van Bambeke et al, 2003.

PROCARIOTA	EUCARIOTA
<b>MFS (Major Facilitator Family)</b>	
DHA1 (TetA, B, E de <i>E. coli</i> ); NorA de <i>S. aureus</i> DHA2 (EmrB de <i>E. coli</i> ) DHA3 (MeE de <i>P. aeruginosa</i> ) SET (SetA de <i>E. coli</i> )	
<b>RND (Resistance Nodulation Division)</b>	
HAE1 ( <i>Acr</i> de <i>E. coli</i> ) Mex de <i>P. aeruginosa</i> HAE2	
<b>DTM (Drug Metabolite Transporter H<sup>+</sup> - antiporter)</b>	
SMR (Small Multidrug Resistance)	
<b>POT (Multidrug/Oligosaccharidyl-lipid/Polysaccharide Flippase)</b>	
MATE (Multi Antimicrobial Extrusion)	
<b>ABC (ATP Binding Cassette)</b>	
Drug E1 Drug E2 Drug E3 Drug RA2 MacB	MDR CT2'

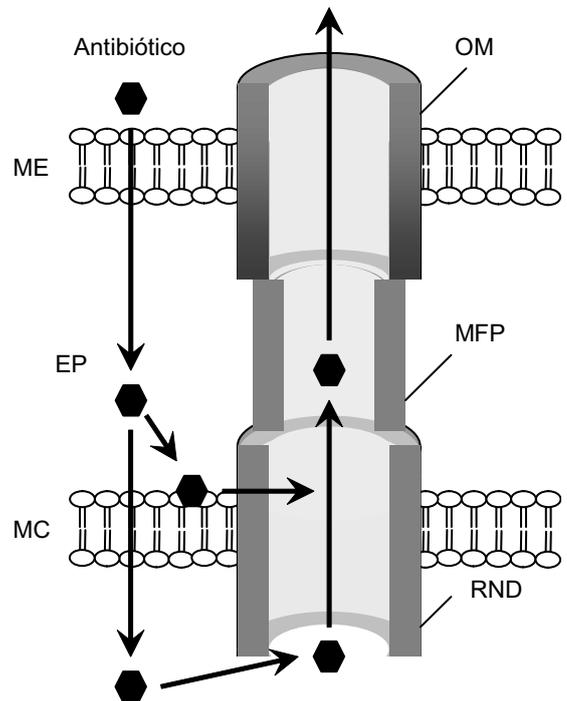


Figura 1. Representación esquemática de la estructura y función de los sistemas de eflujo RND en bacterias gramnegativas. Los antimicrobianos pueden ser capturados desde el espacio periplásmico (EP), la membrana citoplasmática (MC) y/o el espacio citoplásmico (EC) por este tipo de transportadores. ME: membrana externa. OM: proteína de membrana externa tipo porina. MFP: proteína periplásmica de fusión. RND: proteína transportadora (23).

familia RND. AcrAB de *E.coli* son cercanamente homólogas a MexAB de *P. aeruginosa*. El operon *acrAB* no contiene ningún gen que codifique para una proteína de membrana externa (OMP: Outer Membrane Protein). Sin embargo, AcrAB se encuentra asociado a un OMP denominado TolC que sirve como canal o porina para más de un sistema de exportación de tipo proteico. El sistema AcrAB-TolC constituye un sistema proteico tripartito encargado del eflujo de sustratos a través de las dos membranas de los microorganismos gramnegativos (17, 26).

AcrAB-TolC es capaz de transportar a más de cinco antibióticos diferentes. Fisiológicamente es un transportador de sales biliares, esto ilustra bien el concepto de que los antibióticos no son sustratos oportunistas de sistemas de transporte indispensables para la vida bacteriana en el medio ambiente natural (24).

## ESTRUCTURA GENERAL DE LOS SISTEMAS DE EFLUJO - EFLUJO A TRAVÉS DE UNA MEMBRANA SIMPLE

El sistema descrito en las bacterias grampositivas consta de una única proteína situada en la membrana (CMP: Proteína de Membrana Citoplasmática). Esta proteína expulsa los fármacos del interior celular, ya sea acoplada al potencial de membrana, o bien mediante la energía obtenida por hidrólisis de ATP. Este sistema de bombeo tiene como limitación la especificidad de sustrato, pues para garantizar su eficiencia es indispensable que la velocidad de ingreso del fármaco no supere en ningún momento a la de la expulsión (21, 25).

En el caso particular de los microorganismos gramnegativos, existen transportadores de eflujo de *membrana simple*, las bombas mueven agentes desde el citoplasma hacia el espacio periplásmico. Esta es una operación ineficiente porque las moléculas lipofílicas inhibitoras difundirán espontáneamente de regreso al citoplasma a través de la bicapa lipídica. Sin embargo, se ha demostrado que la bomba Tet bombea tetraciclina al espacio periplásmico de *E. coli*. Podría crear altos niveles de resistencia solamente por tener una velocidad de eflujo que supere altamente al retorno de la droga hacia el citoplasma. Este tipo de bomba tiene un espectro reducido en general a un único antimicrobiano (25).

Es decir pueden encontrarse dos tipos de proteínas transportadoras según el microorganismo al que pertenecen:

Proteína transportadora con un solo componente en su estructura que cataliza el eflujo de drogas a través de la membrana citoplasmática de bacterias grampositivas. Las cuales pueden ser específicas para un sustrato o bien MDR. Este a su vez es energizado por gradiente de protones o bien por hidrólisis de ATP (transportadores ABC) (Fig. 2A) (14, 25).

Un transportador con un solo componente en su estructura que cataliza el eflujo de drogas a través de la membrana citoplasmática de bacterias gramnegativas. Este tipo de bombas excreta las drogas dentro del espacio periplásmico. Pueden pertenecer tanto a la familia MFS (proteínas Tet) o bien a la SMR (MvrC). Ambas energizadas por gradiente de protones (Fig. 2B) (14, 25).

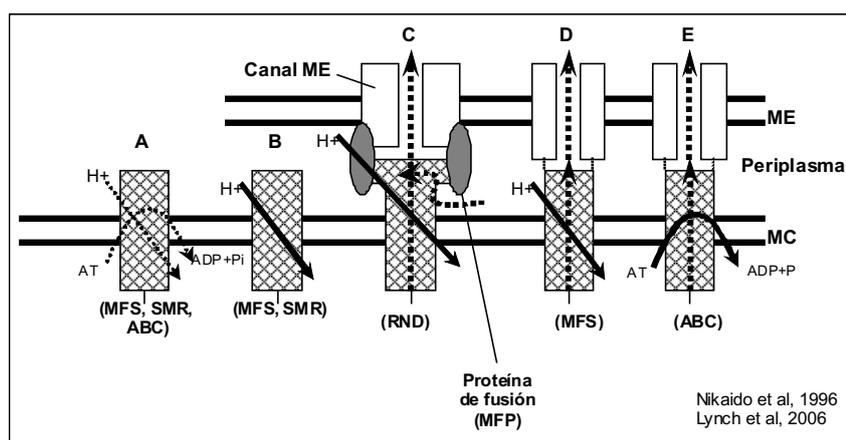


Figura 2. Representación esquemática de los diferentes tipos de transportadores. (A) Transportador simple que cataliza el eflujo a través de la membrana citoplasmática (MC) en bacterias grampositivas, energizado por gradientes de protones (MFS –SMR) o bien por hidrólisis de ATP (ABC). (B) Transportador simple en bacterias gramnegativas que excretan los sustratos hacia el espacio periplásmico (MFS-SMR). (C) Transportador multicompuesto tipo RND en bacterias gramnegativas, energizado por gradiente de protones y estructura tripartita con canales de membrana externa (canal ME) y proteínas de fusión periplásmica. (D) Transportadores multicompuesto tipo MFS en bacterias gramnegativas. (E) Transportador multicompuesto tipo ABC energizado por hidrólisis de ATP (14, 25).

## - EFLUJO A TRAVÉS DE UN SISTEMA DOBLE DE MEMBRANAS

En el caso del eflujo en *sistemas de doble membrana*, la droga es conducida desde el citoplasma hacia el exterior de la célula por el sistema de tres proteínas que forman el canal de salida. Estos sistemas multicompuestos, incluyen a AcrAB-TolC de *E. coli* y MexAB-OprM de *P. aeruginosa* perteneciente a la superfamilia RND, con capacidad de bombear al exterior una extraordinaria variedad de antibióticos, detergentes, secantes y agentes quimioterápicos (25).

En este grupo pueden encontrarse:

Proteínas transportadoras MDR tipo RND en bacterias gramnegativas. Cuya estructura esta dada por una bomba de eflujo que puede pertenecer ya sea a la familia RND (Fig. 2C) o bien a la MFS (Fig. 2D), una porina de membrana externa (OM) y una proteína periplásmica de conexión entre las dos anteriores. Están energizadas por gradientes de protones (14, 25).

Proteínas transportadoras MDR tipo ABC en bacterias gramnegativas. De estructura similar a la anterior excepto que la bomba de eflujo pertenece a la familia ABC, y se encuentra energizada por hidrólisis de ATP (Fig. 2E) (14, 25).

## MECANISMOS DE ACCION DE LAS BOMBAS

Han sido propuestos muchos modelos para explicar las posibles rutas de los transportadores:

La hipótesis de “la aspiradora hidrofóbica” asume que los transportadores están embebidos en los fosfolípidos de la bicapa membranosa, el sustrato se mueve libremente en la fase lipídica, desde allí alcanzan el canal central de la bomba proteica ya sea desde el lado interno o externo de la membrana y por último, son “aspirados”, activamente expulsados hacia el exterior (12, 18).

La segunda hipótesis, es la de “flippase” que sostiene que el sustrato alcanza la bomba proteica también desde dentro de la membrana y simplemente difunde hacia el exterior pasando desde la porción interna hacia la externa (12, 18).

La tercera hipótesis es la del “poro acuoso” en la cual se asume que la traslocación incluye el transporte del sustrato desde el citoplasma hacia el medio externo a través de poros acuosos con sitios flexibles de reconocimiento de sustrato (12).

El mecanismo de acción de los sistemas de eflujo puede incluir los siguientes pasos, según un modelo de mutagénesis realizado sobre transportadores de la familia SMR:

intercambio entre la droga sustrato y un protón unido a un residuo cargado en el lado

interno de la membrana

traslocación del sustrato tras una serie de cambios conformacionales de la proteína transportadora, que conducen al mismo a través de un canal hidrofóbico

reemplazo del sustrato por el protón en el medio externo y retorno al estado conformacional inicial. El resultado final es un intercambio entre el sustrato y el protón (antiporte)

En los transportadores de la familia SMR el residuo cargado puede ser un glutamato conservado. Este mismo mecanismo puede ser aplicado para los transportadores MFS, pero el residuo cargado es de tipo arginina. Estos modelos que involucran a un residuo ácido, explicarían porque ambos grupos de transportadores expulsan preferentemente, moléculas catiónicas. En cuanto a los miembros de la superfamilia RND se conoce menos acerca de esta característica, sin embargo, estos poseen grandes residuos cargados conservados en sus segmentos transmembranosos, que seguramente juegan un importante rol en la captación e intercambio del sustrato como se encuentra representado en la figura 2 (18).

Por otra parte, se ha sugerido que el transporte de sustratos en estos sistemas ocurre no solamente desde la fase citosólica de la membrana, como ha sido descrito en eucariotas o bacterias grampositivas, sino que también ocurre tanto desde la porción interna como de la externa de la membrana citoplasmática de los microorganismos gramnegativos. Esto sugiere un movimiento de sustratos no solamente desde el citosol, sino también desde el periplasma (18).

Sucesivos estudios han demostrado que la especificidad por los sustratos y el sitio de unión a los mismos en los transportadores de la superfamilia RND, se encuentran presumiblemente en el dominio periplásmico (prolongaciones “loops”) del transportador y no en su dominio de localización transmembranosa (25).

## ORGANIZACIÓN GENÉTICA, EXPRESION Y REGULACION DE LAS BOMBAS DE EFLUJO MDR

La manifestación de un fenotipo MDR no siempre se debe a la expresión de funciones codificadas en un locus simple, ni tampoco necesariamente es resultado de un sistema específico para bombas de eflujo.

En muchos casos los elementos genéticos que codifican la expresión de las bombas se encuentran localizados en plásmidos (transportadores Tet en bacterias grampositivas), o en transposones conjugativos o transformables localizados en dichos plásmidos (transportadores Tet de bacterias gramnegativas) (16).

Pero también ocurre que los genes pueden localizarse en el cromosoma bacteriano como ocurre con los transportadores Acr de *E. coli*

y Mex de *P. aeruginosa* (16). En este caso, la localización en el DNA cromosómico confiere a las bacterias un mecanismo intrínseco que les permite sobrevivir en medios hostiles (en presencia de antibiótico). Las bacterias mutantes que puedan sobreexpresar los genes de las bombas pueden ser seleccionadas sin la adquisición de nuevo material genético (6).

En muchos casos, los genes que codifican para las bombas de eflujo forman parte de un operón, con genes reguladores que controlan la expresión de los mismos. En *E. coli* el operón *acrAB* codifica la proteína de fusión de membrana AcrA y el transportador AcrB, y el gen *tolC*, la proteína de membrana externa TolC, constituyendo así el sistema tripartito funcional RND, mencionado previamente (17, 26, 27).

La organización de los genes que codifican sistemas tripartitos de eflujo es relativamente similar en diferentes especies bacterianas. Típicamente, los genes se encuentran agrupados en operones: los genes reguladores se ubican adyacentes a los que codifican la proteína periplásmica de fusión, la cual a su vez está junto a los que codifican la bomba de eflujo propiamente dicha o transportador, y por último a su lado se encuentran aquellos de la OMP. La proteína periplásmica de fusión es usualmente cotranscripta con la del transportador. Por el contrario, para algunos sistemas y/o especies, la OMP no esta colocada en conjunto con los otros genes mencionados (27).

Se han realizado numerosos estudios sobre los mecanismos de regulación de las bombas de eflujo en cepas mutantes de laboratorio que permiten describirlos en cuatro grupos diferentes (27):

*Mutaciones en un gen represor local:* La sobreexpresión de las bombas de eflujo pueden ser el resultado de mutaciones en un gen represor. Muchos genes que codifican para la expresión de bombas de eflujo MDR se encuentran localizados dentro de operones que están bajo el control de genes represores locales. El gen regulador local se sitúa generalmente adyacente al gen o genes del transportador MDR. Por ejemplo, en el caso de *E. coli*, AcrA y AcrB se hallan cotranscriptos y bajo la regulación de *acrR*. Mutaciones en *acrR*, desreprimen la expresión de *acrB*. Lo mismo puede ocurrir con genes *acr* de otras especies bacterianas que sufren mutaciones de este tipo como *Salmonella enterica* serovar Typhimurium y *Enterobacter aerogenes* (28, 29).

*Mutaciones en genes reguladores globales:* Otra manera que permite que se produzca la sobreexpresión de bombas de eflujo es mediante la activación de un regulón u operón, controlado por un regulador transcripcional. En *E. coli*, por ejemplo, la expresión de *acrAB* en cepas mutantes

con fenotipo MDR, está controlada por el operón *marRAB* o *soxRS*. La expresión constitutiva de *marRAB* en *E. coli*, produce un fenotipo MDR por medio de la activación de locus genéticos múltiples en respuesta a las proteínas reguladoras del operón. Normalmente *marRAB* es reprimido por el represor transcripcional MarR, proteína que produce una acción reguladora negativa sobre el operón. Pero por otra parte, puede ser desreprimido por activadores transcripcionales globales como MarA o SoxS, así como por varios compuestos tales como tetracilinas, cloranfenicol y salicilatos. La función de MarB todavía no se conoce (17, 27, 30, 31).

*Mutaciones en regiones promotoras de los genes que codifican transportadores:* El gen *norA* localizado en el cromosoma de *S. aureus* codifica la bomba de eflujo MDR NorA. Se ha identificado que su sobreexpresión por mutación de la región de control transcripcional o promotora en aislamientos clínicos de *S. aureus*, confiere resistencia frente a fluoroquinolonas y antisépticos (27, 32).

*Secuencias de inserción:* En algunos aislamientos clínicos han sido identificadas secuencias de inserción (SI) localizadas cerca de genes que codifican componentes estructurales de bombas de eflujo o bien insertadas dentro de genes represores. Algunas SI tienen promotores o secuencias promotoras que incrementan la expresión de genes de bombas de eflujo cercanos. Una SI fue descrita insertada dentro del gen represor *mexR* que codifica la proteína represora transcripcional MexR en un aislamiento clínico de *P. aeruginosa* (27).

## IMPACTO DEL EFLUJO EN LA RESISTENCIA

La resistencia intrínseca o natural de muchas bacterias a los antimicrobianos depende de la expresión inducible o constitutiva de los sistemas de eflujo activos. Como se mencionó previamente, las bombas de eflujo tienen la capacidad de expulsar aquellas sustancias que resultan nocivas para la supervivencia del microorganismo. Es por ello que actualmente está aceptado que la "resistencia intrínseca" de las bacterias gramnegativas a ciertos antimicrobianos comparada con las grampositivas es resultado de la presencia de dicho eflujo (6, 16).

En *E. coli*, por ejemplo, se han observado incrementos adicionales en la concentración inhibitoria mínima de los antibióticos luego de que ocurra la sobreexpresión de bombas de diferentes clases, resultando altamente resistente (6).

Por sí solos los sistemas de eflujo confieren de bajos a moderados niveles de resistencia (incrementos de la CIM de 1 a 64 veces). Razón por la cual su relevancia fue cuestionada. Sin

embargo, esa bacteria estará mejor equipada para sobrevivir bajo la presión de los antimicrobianos y desarrollar posteriores mutaciones en sus genes. En general estos sistemas de resistencia se presentan en cooperación con otros mecanismos para conferir, no solamente elevados niveles de resistencia, sino también un mayor espectro de acción (6, 16).

La barrera externa de membrana y el sistema de eflujo deben actuar sinérgicamente para lograr disminuir las concentraciones de los agentes antibacterianos a nivel del citoplasma y periplasma. Las bombas AcrAB de *E. coli* pueden producir resistencia intrínseca únicamente a agentes lipofílicos de largas cadenas que atraviesan con dificultad los eficientes canales porínicos, como es el caso de la eritromicina, el ácido fusídico, secantes y detergentes; pero el organismo permanece susceptible a antibióticos pequeños capaces de difundir rápidamente a través de dichos canales, como las tetraciclinas, cloranfenicol y fluoroquinolonas. Este eficiente sinergismo implica que los sistemas de eflujo por multicomponentes pueden producir niveles de resistencia significativos aún cuando la velocidad máxima ( $V_{max}$ ) de sus transportadores sea baja, siempre que su membrana externa funcione como una efectiva barrera (25).

Otro ejemplo típico de cooperación es entre el eflujo a las penicilinas y la acción de las enzimas  $\beta$ -lactamasas. El eflujo permite que el sistema enzimático no se sature. Estas bacterias muestran un fenotipo con altos niveles de resistencia a las penicilinas sin ser grandes productoras de  $\beta$ -lactamasas (18).

Así puede observarse en un trabajo realizado en *P. aeruginosa* donde la resistencia a penem aumenta como resultado de la acción simultánea de tres mecanismos de resistencia combinados: la barrera externa de membrana, el activo sistema de eflujo MexAB-OprM y la  $\beta$ -lactamasa AmpC (33, 34).

Otro ejemplo se observa con el estudio del rol de la  $\beta$ -lactamasa cromosómica AmpC y el sistema de eflujo AcrAB a nivel de la resistencia intrínseca y susceptibilidad en *E. coli*. La expresión de  $\beta$ -lactamasas clase C confiere resistencia a cefalosporinas de primera y segunda generación. Las bombas de eflujo, generan resistencia a penicilinas. El resultado global de la combinación de ambos mecanismos es que su susceptibilidad queda restringida solamente a cefalosporinas de tercera y de cuarta generación (35).

Para el caso de las fluoroquinolonas, la resistencia resulta de una mutación puntual a nivel de DNAGirasa/topoisomerasa IV. Una simple mutación en general, da lugar a bajos niveles de resistencia y la bacteria puede seguir siendo considerada como sensible. Para lograr niveles mayores debe pasar por dos o más mu-

taciones. Datos recientes han demostrado que la combinación de una mutación puntual más la presencia de bombas de eflujo para fluoroquinolonas, produce efecto sinérgico con altos niveles de resistencia (18).

Esto fue particularmente demostrado para levofloxacina en *P. aeruginosa* donde la disrupción de genes de tres tipos de bombas de la familia RND, no solamente logra una disminución de la CIM desde 0.25 a  $< 0.02$  mg/L, sino que también disminuye la frecuencia de aparición de mutantes de  $2 \times 10^{-7}$  a  $< 10^{-11}$ . Cabe destacar que todas las bombas deberían ser inactivadas simultáneamente para obtener dicho resultado (36).

También se encuentran datos que indican que la expresión de varias bombas de eflujo de diferentes familias en una especie bacteriana determinada puede dar un aparente fenotipo de elevada resistencia cuando se consideran los sustratos compartidos (18).

En bacterias gramnegativas como *E. coli* y *P. aeruginosa* se estudiaron los efectos de la expresión simultánea de sistemas de eflujo en variadas combinaciones: 1) expresión simultánea de bombas de eflujo con estructura simple, de un solo componente que exportan antimicrobianos al periplasma, en combinación con bombas de eflujo multicomponentes que completan la expulsión de los sustratos al medio externo; 2) combinación de dos bombas de eflujo de componente simple; y 3) expresión combinada de dos bombas complejas, multicomponentes. Como resultado se observó que en el primer caso, el nivel de resistencia expresado fue significativamente mayor en comparación con los otros dos.

La resistencia cruzada sucede cuando un organismo, al volverse resistente a un antibiótico, se transforma en resistente a otro diferente. La resistencia cruzada es común entre los macrólidos y las fluoroquinolonas. Este es un problema que surge con este tipo de mecanismo de resistencia por el amplio rango de sustratos que posee. La exposición a cualquier antimicrobiano o sustrato puede servir como inductor o regulador de la expresión de bombas de eflujo, favorecer a la sobreexpresión de esta, y producir, en consecuencia, resistencia cruzada con todos los otros sustratos posibles (6, 16).

Un ejemplo de resistencia cruzada ocurre en *Enterobacter aerogenes* donde el nivel de expresión del regulador MarA, involucrado en el control genético de la permeabilidad de membrana vía porinas y de la expresión de la bomba de eflujo AcrAB-TolC, es afectado por la presencia de imipenem. Por lo tanto, la exposición a estos carbapenemes, que no son sustratos de la bomba, está acompañada de una disminución de la susceptibilidad a quinolonas, tetraciclinas y cloranfenicol (34).

Otro caso citado en la bibliografía, es el de

pacientes hospitalizados infectados con *P. aeruginosa*, tratados únicamente con  $\beta$ -lactámicos antipseudomoniales que desarrollaron multi-resistencia post tratamiento. En varios de los aislamientos estudiados, curiosamente existían niveles basales de  $\beta$ -lactamasa AmpC. Estos resultados indican que en el curso de la terapia ocurrieron mutaciones en genes reguladores (*mexR*) de la expresión de sistemas de eflujo tipo MDR con consecuente sobreexpresión de bombas de eflujo MexA-MexB-OprM. Como resultado final las cepas manifestaron resistencia no solamente a  $\beta$ -lactámicos sino también a fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y trimetoprima (37).

La resistencia por bombas de eflujo puede ser fácilmente diseminada entre especies bacterianas filogenéticamente disímiles. Como ya fue mencionado, los elementos genéticos que codifican la expresión de las bombas pueden hallarse presentes en plásmidos (Tet grampositivas), o en transposones conjugativos o transformables localizados en dichos plásmidos (Tet gramnegativas) (16). Así como también en el DNA cromosómico (Acr de *E. coli* y Mex de *P. aeruginosa*) (6).

Sin embargo, es importante remarcar que la sobreexpresión ilimitada de sistemas de eflujo en la membrana bacteriana es potencialmente desventajosa para la bacteria, existe riesgo de expulsar no solamente sustancias nocivas en su accionar, sino también nutrientes esenciales para su crecimiento (16).

## **BOMBAS DE EFLUJO MDR Y PRINCIPALES SUSTRATOS EN CEPAS BACTERIANAS PATÓGENAS Y COMENSALES**

El fenotipo MDR es aquel observado en cepas mutantes que sobreexpresan bombas de eflujo y que manifiestan resistencia (o menor susceptibilidad) frente a por lo menos tres clases diferentes de antimicrobianos, desinfectantes (biocidas), detergentes y/o colorantes. Este amplio espectro de sustratos generalmente incluye a quinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol, bromuro de etidio, acriflavina, dodecil sulfato de sodio (SDS), Triton X-100, y triclosan; pero los agentes considerados sustratos de cada bomba en particular son levemente diferentes dependiendo de la bomba y de la especie bacteriana (27).

Cabe señalar que el valor de la CIM de cepas MDR que sobreexpresan bombas de eflujo es típicamente de dos a ocho veces mayor comparado con una cepa susceptible típica. Del mismo modo, si a una cepa mutante con sobreexpresión de bombas se le practica delección de los genes involucrados en dicha expresión, la CIM decrece notablemente dando lugar a un fenotipo hipersusceptible (37).

Un cuestionamiento importante es para qué

especies bacterianas las bombas de eflujo tipo MDR confieren resistencia con relevancia clínica, especialmente en referencia a antimicrobianos que se usen rutinariamente en medicina humana y veterinaria. Son muchas las bacterias que expresan sistemas de eflujo en su membrana, a continuación se mencionan algunos ejemplos de microorganismos de importancia:

### **BACTERIAS GRAMNEGATIVAS:**

*Pseudomonas aeruginosa*: En este microorganismo además del conocido sistema de eflujo MexAB-OprM, se han caracterizado tres más: MexXY-OprM, MexCD-OprJ y MexEF-OprN. Tanto MexAB-OprM como MexXY-OprM, se expresan constitutivamente y confieren resistencia intrínseca con fenotipo MDR. Por el contrario, MexCD-OprJ y MexEF-OprN son inducibles por ciertos sustratos. Además de expulsar fluoroquinolonas, tetraciclinas, cloranfenicol y algunos  $\beta$ -lactámicos, también pueden expulsar bromuro de etidio, acriflavina, triclosan, SDS, solventes orgánicos y otros. A pesar del incremento que ocurre en la CIM cuando se sobreexpresan estos sistemas, para algunos antimicrobianos como la ciprofloxacina, ese valor no supera la concentración de referencia recomendada por la CLSI. Recientemente se ha descrito también en *P. aeruginosa* un sistema de eflujo MATE, denominado PmpM. Este utiliza como sustrato a fluoroquinolonas, cloruro de benzalconio, bromuro de etidio, acriflavina y tetrafenilfosfonio clorado (38).

Cho y col (39) determinaron la frecuencia de resistencia mediada por bombas de eflujo en 409 aislamientos clínicos de *P. aeruginosa* fluoroquinolona-resistente obtenidos en 12 países, entre ellos Japón, Canadá, Grecia, Venezuela y Argentina. MexAB fue la bomba de eflujo detectada con mayor prevalencia (72%). Sin embargo, hubo importantes variaciones entre los perfiles hallados en cada región. Ese mismo fenotipo con bombas tipo MexA-MexB-OprM fue identificado en 11 aislamientos de *P. aeruginosa* provenientes de pacientes hospitalizados en un estudio realizado en Francia. Estos habían sido tratados con  $\beta$ -lactámicos antipseudomoniales y desarrollaron multiresistencia (37).

*Escherichia coli*: A pesar que este microorganismo es reconocido como comensal, es también causa frecuente de infecciones urinarias en humanos. *E. coli* enteropatógena y enterotoxigénica son importantes agentes responsables de ocasionar diarrea con elevada morbimortalidad entre individuos inmunocomprometidos y niños. En *E. coli* el sistema AcrAB-TolC de la familia RND es homóloga a MexAB-OprM de *P. aeruginosa*. El perfil de sustratos de este sistema de eflujo esta representado por: cloranfenicol,  $\beta$ -lactámicos, fluoroquinolonas, tetraciclinas, rifampicina,

novobiocina, ácido fusídico, ácido nalidíxico, bromuro de etidio, acriflavina, sales biliares, ácidos grasos de cadena corta, SDS, Triton-100 y triclosan. Los operones *acrD* y *acrEF* también codifican genes para la expresión de bombas de eflujo. *AcrD* provoca resistencia frente a amino-glucósidos (40).

Everet y col. (41) analizaron 36 aislamientos de *E. coli* provenientes de hombres y animales de Argentina, España y Gran Bretaña que presentaban valores de CIM entre 2 y >128 µg/ml para ciprofloxacina. Se demostró la presencia de bombas de eflujo mediante el uso de un inhibidor de bombas en 22 de ellos.

*Salmonella entérica*: Otra área donde las cepas MDR juegan un rol importante es en la resistencia a los antimicrobianos de los patógenos transmitidos por alimentos. Como fue mencionado previamente es bien conocido el riesgo de transferencia de resistencia a los antimicrobianos entre el hombre y los animales, particularmente en relación a bacterias animales con capacidad zoonótica (*Campylobacter jejuni* y varios serovares de *Salmonella entérica*). El consumo de pollo en estos casos particulares es de relevante importancia como ruta de transmisión. *S. entérica* serovar Typhimurium, posee varias clases de bombas de eflujo. Entre estas, se encuentra *AcrAB* semejante a la descrita para *E. coli* y con igual rango de sustratos. Su expresión esta controlada por un regulador específico denominado *RamA* e inducida por la presencia de indol y bilis en el medio (42). Se ha demostrado un papel importante de la bomba de eflujo *AcrAB-TolC* en aislamientos MDR de *S. entérica* serovar Typhimurium DT104 provenientes de ganado bovino en Bélgica y Francia (42, 43).

*Campylobacter* spp.: En *C. jejuni* se ha demostrado que *CmeABC* media el eflujo y confiere a este organismo un fenotipo MDR. *CmeA* tiene gran semejanza con *AcrA* de *E. coli* y *MexA* de *P. aeruginosa*, mientras que *CmeB* es similar a *AcrB* y *MexB* de las mismas especies. *CmeABC* confiere resistencia frente a ciprofloxacina y eritromicina (ambos usados para el tratamiento terapéutico de este microorganismo), ampicilina, tetraciclina y cloranfenicol. Produce también susceptibilidad reducida frente a triclosan, sales biliares, y Triton X-100. Un segundo sistema de eflujo descrito para esta especie bacteriana, *CmeDEF* no expresa resistencia frente a ciprofloxacina ni a eritromicina (44).

Pumbwe y col estudiaron la expresión de *cmeB*, *cmeF* y *porA* en 32 aislamientos de cepas MDR de *C. jejuni* obtenidas de muestras humanas y animales (pollos). La sobreexpresión de *cmeB*, hallada en un tercio de los aislamientos analizados, demostró su asociación con el fenotipo MDR (45).

Otros sistemas de eflujo homólogos a *Acr*

y *Mex* de la familia RND han sido descritos en otras bacterias gramnegativas como por ejemplo *Enterobacter aerogenes* (34), *Proteus mirabilis* (46).

### BACTERIAS GRAMPOSITIVAS:

*Bacillus subtilis* posee un sistema de eflujo MDR que pertenece a la familia MFS, denominado *Bmr*. A pesar que existe escasa significancia clínica para esta bomba en medicina humana y veterinaria, ha sido demostrado que la bomba de eflujo *NorA* de *S. aureus* y *PmrA* de *S. pneumoniae* presentan significativa similitud con ella. Por lo cual, se han realizado numerosas analogías entre las propiedades de *Bmr* y las bombas mencionadas (27).

En *S. aureus*, por ejemplo, la sobreexpresión del sistema de eflujo *NorA* con fenotipo MDR posee como sustratos a fluoroquinolonas, cloranfenicol, antisépticos, tinturas y desinfectantes. Un dato de importancia es que *NorA* se encuentra presente tanto en *S. aureus* meticilino-sensibles (MSSA), así como en los meticilino resistentes (MRSA). Por otra parte, la sobreexpresión de *NorB*, otra bomba de eflujo descrita en este microorganismo, confiere únicamente susceptibilidad reducida frente a fluoroquinolonas, tetraciclinas, desinfectantes y tinturas (27).

### ESTRATEGIAS PARA MODIFICAR LA RESISTENCIA BACTERIANA POR EFLUJO

Existe creciente evidencia sobre la importancia de las bombas de eflujo en la resistencia bacteriana a los antimicrobianos. A pesar de no generar elevados niveles de resistencia por sí solas, la sobreexpresión de las mismas en combinación y cooperación con otros mecanismos de resistencia adquiere significancia clínica. Razón por la cual se analizan diversas estrategias para modificar y revertir la resistencia bacteriana por eflujo:

*Evasión de los mecanismos de bombas de eflujo*: A pesar que no han sido totalmente elucidados los determinantes moleculares responsables del reconocimiento de antibióticos por bombas de eflujo, pueden observarse diferencias en el transporte de miembros estructuralmente análogos de una familia de antimicrobianos. Se han desarrollado nuevas moléculas que poseen menor susceptibilidad al eflujo si se las compara con las moléculas originarias de los principales grupos de antibióticos. Así se ha demostrado para las quinolonas de tercera y cuarta generación versus las de primera y segunda; cetólidos versus macrólidos o gliciliclinas versus tetraciclinas (16).

*Inhibición biológica de la actividad de eflujo:* Otra estrategia para inhibir la actividad de las bombas, puede ser mediante bloqueo de las proteínas responsables del eflujo por medio del uso de anticuerpos neutralizantes; o bien, bloqueando los genes correspondientes responsables de la expresión de las mismas. La utilización de esta estrategia está basada en la demostración de que la delección del gen *acrAB* en *E. coli* restaura la sensibilidad a los antibióticos, mientras que la mutación en el regulador genético Mar tiene el efecto contrario (47, 48).

*Inhibición farmacológica del eflujo:* La inducción de una competencia por la bomba de eflujo es probablemente el mecanismo de acción más razonable de los inhibidores de bomba. La reserpina es el inhibidor más popular, aunque también se han descrito otras drogas con similares efectos como fenotiazinas, antagonistas de calcio, inhibidores selectivos de serotonina o bien, inhibidores de las bombas de protones. La mayor limitación de combinar estas drogas con los antibióticos es que ellas necesitan ser utilizadas en concentraciones significativamente elevadas como inhibidores en comparación con la concentración usada para ejercer sus efectos farmacológicos más conocidos; lo cual las hace no viables por razones de seguridad (22).

Una primera categoría de inhibidores originales son las moléculas antibióticas análogas a los antibióticos de uso clínico, pero con menor efecto antibacteriano. Tres familias han sido patentadas, análogas de tetraciclinas, aminoglucósidos y quinolonas, las cuales logran disminuir el eflujo de los antibióticos respectivos (22).

Una segunda categoría la conforman los inhibidores no relacionados estructuralmente a antibióticos conocidos, es decir, totalmente nuevos. Algunos de ellos logran inhibir bombas que efluyen múltiples clases de antibióticos (22).

Basándose en observaciones empíricas de las propiedades de estos inhibidores puede concluirse que la estructura química de varios de ellos, tiene características recurrentes como por ejemplo: *anillos aromáticos* presentes en todas las moléculas (con excepción de análogos de los aminoglucósidos) y *grupos ionizables* encontrados en muchos de ellos. Esto es consistente con el hecho de que las bombas de eflujo transportan preferentemente sustancias anfífilas como sustrato y poseen afinidad de unión a grupos con cadenas aminoácidas de superficie, propensas a establecer uniones hidrofóbicas, uniones aromáticas e interacciones van der Waals (22).

Algunos de los inhibidores también pueden modular transportadores de células eucariotas como P-glicoproteína, MRP o BCRP, como se demostró con el verapamilo, VX-710, VX-853 y GF120918. Por otra parte, otros inhibidores

como MC207 o el MC110 no interactúan con los transportadores de las células eucariotas, sino que son específicos de las bombas procariotas. Esto favorece la especificidad de acción y minimiza efectos indeseables que involucran inhibición de funciones fisiológicas (22).

## LA MULTIRRESISTENCIA Y LA ACTUALIDAD

El impacto clínico de la multirresistencia por bombas de eflujo es difícil de establecer debido a que no contamos con estadística internacional ni nacional a gran escala, que permita comparar la prevalencia de este mecanismo de resistencia con otros. Existen numerosas publicaciones referentes a la descripción de las bombas y los sistemas de eflujo en los diferentes microorganismos pero muy poco referente a su importancia en la clínica.

Varios autores (22, 49, 50, 51, 52, 53, 54) evalúan la aplicación de inhibidores de bomba como posibles alternativas para revertir o reducir la resistencia a los antimicrobianos involucrados.

En cuanto a microorganismos patógenos, en diferentes lugares del mundo se han publicado diversos trabajos sobre multirresistencia ocasionada por bombas de eflujo, en su mayoría pertenecientes a la familia de resistencia a división por nodulación (RND, *resistance nodulation division*). En muchos de ellos, se evalúa la importancia de la utilización de inhibidores de bombas de eflujo como herramienta para bloquear la sobreexpresión de estos sistemas de eflujo (responsables de dar origen a cepas MDR), así como la prevalencia de la resistencia de tales microorganismos en aislamientos de origen animal y del hombre. Entre los microorganismos más estudiados pueden mencionarse *Campylobacter* (31, 44, 51), *Pseudomonas* (36, 52), *Enterobacter* (50), *Klebsiella* (55) y *Salmonella* (56).

Por otra parte, en cuanto a las cepas comensales, es sabido que el intestino es el principal sitio de transferencia de la antibióticorresistencia. *E. coli* es una de las bacterias comensales con mayores posibilidades de generar resistencias en el campo humano y veterinario. Uno de los mecanismos de multirresistencia de *E. coli* a antibióticos lipofílicos/anfífilicos, como mencionamos en párrafos anteriores está representado por la sobreexpresión de bombas de eflujo (25, 57). Su monitoreo permite conocer que antimicrobianos están generando resistencia, evitar riesgos en salud pública, disminuir el fracaso terapéutico y por lo tanto evitar pérdidas económicas al productor (58, 59). Por esta razón se están realizando diversos estudios donde se evalúa el efecto de los inhibidores de bombas sobre esta cepa comensal. La mayoría de ellos se realiza en aislamientos de origen humano o mutantes experimentales (49, 53, 54, 60).

En diversos países ya se han puesto en marcha numerosos programas de monitoreo de la resistencia en animales y en el hombre orientados principalmente a la vigilancia de la resistencia en patógenos humanos, microorganismos zoonóticos y bacterias indicadoras de la microbiota intestinal normal de los animales.

## CONCLUSIONES

La resistencia a múltiples fármacos es un fenómeno que amenaza la salud pública. Los sistemas de eflujo como mecanismo de resistencia a múltiples drogas pueden transformarse en un promotor blanco farmacológico para restaurar la actividad de los antimicrobianos que resulten sustrato de ese sistema. Sin embargo, existe aún escasa información tanto a nivel nacional como internacional acerca de la prevalencia de la sobreexpresión de bombas de eflujo en aislamientos clínicos de hombres y/o animales y su vinculación con la incidencia en el fracaso terapéutico por multirresistencia.

La sospecha de la presencia de bombas de eflujo como mecanismo de resistencia debería ser confirmada fenotípica y genotípicamente como una herramienta de rutina, con el propósito de anticiparnos a la aparición de resistencia cruzada. Lamentablemente aún no existe una técnica específica que permita la identificación fenotípica temprana, por lo cual todos los estudios encaminados a esclarecer esta problemática serán bien recibidos.

Por otra parte, en la actualidad, la investigación se focaliza también en desarrollar nuevas alternativas terapéuticas. Tales como el descubrimiento de nuevos antimicrobianos que no sean sustrato de las bombas o desarrollar nuevos sinergismos con sustancias que en asociación con los antimicrobianos provoquen bloqueo de los transportadores facilitando y mejorando la acción de los últimos.

Finalmente, debemos remarcar, que el esclarecimiento de los mecanismos de multirresistencia, el desarrollo de nuevas técnicas diagnósticas y la implementación de alternativas terapéuticas sin el manejo prudente de los antimicrobianos, solo ayudará a generar conocimiento pero no a controlar y minimizar la emergencia y diseminación de resistencia. Es de importancia fundamental no perder de vista la estrategia más eficaz contra la resistencia a los antimicrobianos: *el uso racional*. El uso racional de los antimicrobianos tiene como objetivo fundamentalmente limitar el desarrollo de microorganismos resistentes para obtener el mayor beneficio para el enfermo.

Partiendo de una buena utilización de los antimicrobianos y de la mano de las nuevas herramientas terapéuticas las bacterias empezarán a estar en desventaja en la interminable guerra contra la multirresistencia.

## BIBLIOGRAFIA

- Davies J. Inactivation of antibiotics and the dissemination of resistance genes. *J Dairy Sci* 1994; 264: 375-82.
- Miller P, Rather P. Global response systems that cause resistance. En Lewis R, Sayers A, Taber H, Wax R, editors. *Bacterial resistance to antimicrobials*. New York, Basel, 2002, p. 60-82.
- European Agency for Evaluation of Medicinal Products. Antibiotic resistance in the European Union associated with therapeutic use of veterinary medicines, 1999, EMEA/CVMP/342/99, London, UK.
- Levy S. Emergence of antibiotic-resistance bacteria in the intestinal flora of farm inhabitants. *J Infect Dis* 1978, 137: 689-90.
- Errecalde J. Uso de antimicrobianos en animales de consumo. Incidencias del desarrollo de resistencias en salud pública, Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación FAO. Roma, Italia, 2004.
- Webber M, Piddock L. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance. *J Antimicrob Chemother* 2003, 51: 9-11.
- Livermore D. Beta-lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 1995; 8: 557-84.
- Mingeot-Leclercq M, Glupczynski Y, Tulkens P. Aminoglycosides: activity and resistance. *Minireview. Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 727-37.
- Ruiz J. Mechanisms of resistance to quinolones: target alterations, decreased accumulation and DNA gyrase protection. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1109-17.
- Spratt R. Resistance to antibiotic mediated by target alterations. *Science* 1994, 264: 388-93.
- Delcour A. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794: 808-16.
- Scatamburlo Moreira M, Chartone de Souza E, Alencar de Moraes C. Multidrug efflux systems in gram - negative bacteria. *Braz J Med Biol Res* 2004; 35: 19-28.
- Thanassi D, Cheng L, Nikaido H. Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1997; 179: 2512-18.
- Lynch A. Efflux systems in bacterial pathogens: An opportunity for therapeutic intervention? An industry view. *Biochem Pharmacol* 2006; 71: 949-56.
- Saier M, Paulsen I, Sliwinski M, Pao S, Skuffay R, Nikaido H. Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *FASEB J* 1998; 12: 265-74.
- Van Bambeke F, Glupczynski Y, Plesiat P. Antibiotic efflux pumps in prokaryotic cells: occurrence, impact for resistance and strategies for the future of antimicrobial therapy. *J Antimicrob Chemother* 2003; 51: 1167-73.
- Okusu H, Ma D, Nikaido H. AcrAB efflux pump plays a major role in the antibiotic resistance phenotype of *Escherichia coli* multiple-antibiotic-resistance (mar) mutants. *J Bacteriol* 1996; 178:306-08.

18. Van Bambeke F, Balzi E, Tulkens P. Antimicrobial efflux pumps. *Biochem Pharmacol* 2000; 60: 457-70.
19. Igarashi Y, Aoki K, Mamitsuka H, Kuma K, Kanehisa M. The evolutionary repertoires of the Eukaryotic-Type ABC transporters in terms of the phylogeny of ATP-binding domains in eukaryotes and prokaryotes. *Mol Biol Evol* 2004; 21: 2149-60.
20. Shilling R, Balakrishnan L, Shahi S, Venter H, van Veen H. A new dimer interface for an ABC transporter. *Int J Antimicrob Agents* 2003; 22: 200-4.
21. Paulsen I, Brown M, Skurray R. Proton-dependent multidrug efflux systems. *FEMS Microbiol Rev* 1996; 60: 575-608.
22. Van Bambeke F, Pages J, Lee V. Inhibitors of bacterial efflux pumps as adjuvants in antibiotic treatments and diagnostic tools for detection of resistance by efflux. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov* 2006, 1: 157-75.
23. Aeschlimann J. The role of multidrug efflux pumps in the antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa* and other gram-negative bacteria. *Pharmacotherapy* 2003; 23: 916-24.
24. Mesaros N, Van Bambeke F, Glupczynski Y, Vanhoof R, Tulkens P. L'Efflux des antibiotiques: Un mécanisme ubiquitaire conduisant à la résistance. Etat de la question et implications microbiologiques et cliniques. *Louvain Medical* 2005; 124, 8: 308-20.
25. Nikaido H. Multidrug efflux pumps of gramnegative bacteria. *J Bacteriol* 1996; 178: 5853-59.
26. Pos K. Drug transport mechanism of the AcrB efflux pump. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1794: 782-93.
27. Piddock L. Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria. *Clin Microbiol Rev* 2006; 19: 382-402.
28. Olliver A, Valle M, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. Role of an *acrR* mutation in multidrug resistance of in vitro-selected fluoroquinolone-resistant mutants of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *FEMS Microbiol Lett* 2004; 238: 267-72.
29. Pradel E, Pagès J. The AcrAB-TolC pump contributes to multidrug resistance in the nosocomial pathogen *Enterobacter aerogenes*. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 2640-43.
30. Putman M, van Veen H, Konings W. Molecular properties of bacterial multidrug transporters. *Microbiol Mol Biol Rev* 2000; 64: 672- 93.
31. Randall L, Ridley A, Cooles S, Sharma M, Sayers A, Pumbwe L et al. Prevalence of multiple antibiotic resistance in 443 *Campylobacter* spp. isolated from humans and animals. *J Antimicrob Chemother* 2003; 52: 507-10.
32. Noguchi N, Okada H, Narui K, Sasatsu M. Comparison of the nucleotide sequence and expression of *norA* genes and microbial susceptibility in 21 strains of *Staphylococcus aureus*. *Microbial Drug Resistance* 2004; 10: 197-203.
33. Okamoto K, Gotoh N, Nishino T. *Pseudomonas aeruginosa* reveals high intrinsic resistance to penem antibiotics: penem resistance mechanisms and their interplay. *Antimicrob Agents Chemother* 2001; 45: 1964-71.
34. Bornet C, Davin-Régli A, Bosi C, Pagès J, Bollet C. Imipenem resistance of *Enterobacter aerogenes* mediated by outer membrane permeability. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 1048-52.
35. Mazzariol A, Cornaglia G, Nikaido H. Contributions of the AmpC  $\beta$ -lactamase and the AcrAB multidrug efflux system in intrinsic resistance of *Escherichia coli* k-12 to  $\beta$ -lactams. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 1387-90.
36. Lomovskaya O, Lee A, Hoshino K, Ishida H, Mistry A, Warren M et al. Use of a genetic approach to evaluate the consequences of inhibition of efflux pumps in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 1340-46.
37. Ziha-Zarifi I, Llanes C, Kohler T, Pechere JC, Plesiat P. In vivo emergence of multidrug-resistant mutants of *Pseudomonas aeruginosa* overexpressing the active efflux system MexA-MexB-OprM. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43: 287-91.
38. Kriengkauykiat J, Porter E, Lomovskaya O. Use of an efflux pump inhibitor to determine the prevalence of efflux pump-mediated fluoroquinolone resistance and multidrug resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 2005; 49: 565-70.
39. Cho D, Blais J, Tangen K, Ford C, Lee A, Lomovskaya O et al. Prevalence of efflux pump overexpression among clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999, Abstract 1267, p 327, San Francisco, CA.
40. Elkins C, Nikaido H. Substrate specificity of the RND-type multidrug efflux pumps AcrB and AcrD of *Escherichia coli* is determined predominantly by two large periplasmic loops. *J Bacteriol* 2002; 184: 6490-98.
41. Everett M, Jin Y, Ricci V, Piddock L. Contribution of individual mechanisms to fluoroquinolone resistance in 36 *Escherichia coli* isolates from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2380-86.
42. Nikaido E, Yamaguchi A, Nishino K. AcrAB multidrug efflux pump regulation in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium by RamA in response to environmental signals. *J Biol Chem* 2008; 283: 24245-53.
43. Baucheron S, Tyler S, Boyd D, Mulvey M, Chaslus-Dancla E, Cloeckaert A. AcrAB-TolC directs efflux-mediated multidrug resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. *Antimicrob Agents Chemother* 2004; 48: 3729-35.
44. Lin J, Martinez A. Effect of efflux pump inhibitors on bile resistance and in vivo colonization of *Campylobacter jejuni*. *J Antimicrob Chemother* 2006; 58: 966-72.
45. Pumbwe L, Randall L, Woodward M, Piddock L. Expression of the efflux pump genes *cmeB*, *cmeF* and the porin gene *porA* in multiply antibiotic-resistant *Campylobacter* spp. *J Antimicrob Chemother* 2004; 54: 341-47.
46. Visalli M, Murphy E, Projan S, Bradford P. AcrAB

- multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47: 665-9.
47. Kern W, Oethinger M, Jellen-Ritter A. Non-target gene mutations in the development of fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 10-13.
48. Oethinger M, Kern W, Jellen-Ritter A. Ineffectiveness of topoisomerase mutations in mediating clinically significant fluoroquinolone resistance in *Escherichia coli* in the absence of the AcrAB efflux pump. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44: 814-20.
49. Bohnert J, Kern W. Selected arylpiperazines are capable of reversing multidrug resistance in *Escherichia coli* overexpressing RND efflux pumps. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49: 849-52.
50. Chevalier J, Bredin J, Mahamoud A. Inhibitors of antibiotic efflux in resistant *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* strains. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 1043-46.
51. Hannula M, Hänninen M. Effect of putative efflux pump inhibitors and inducers on the antimicrobial susceptibility of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. J Med Microbiol 2008; 57: 851-55.
52. Hendricks O, Butterworth T, Kristiansen J. The in-vitro antimicrobial effect of non-antibiotics and putative inhibitors of efflux pumps on *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*. Int J Antimicrob Agents 2003; 22: 262-64.
53. Sáenz Y, Ruiz J, Zarazaga M, Teixidó M, Torres C, Vila J. Effect of the efflux pump inhibitor Phe-Arg- $\beta$ -naphthylamide on the MIC values of the quinolones, tetracycline and chloramphenicol, in *Escherichia coli* isolates of different origin. J Antimicrob Chemother 2004; 53: 544-45.
54. Schumacher A, Steinke P, Bohnert J, Akova M, Jonas D, Kern W. Effect of 1-(1-naphthylmethyl)-piperazine, a novel putative efflux pump inhibitor, on antimicrobial drug susceptibility in clinical isolates of Enterobacteriaceae other than *Escherichia coli*. J Antimicrob Chemother 2006; 57: 344-48.
55. Hasdemir U, Chevalier J, Nordmann P. Detection and prevalence of active drug efflux mechanism in various multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* strains from Turkey. J Clin Microbiol 2004; 42: 2701-06.
56. Thorrold C, Letsoalo M, Dusé A, Marais E. Efflux pump activity in fluoroquinolone and tetracycline resistant *Salmonella* and *E. coli* implicated in reduced susceptibility to household antimicrobial cleaning agents. Int J Food Microbiol 2007; 113: 315-20.
57. Sáenz Y, Briñas L, Dominguez E, Ruiz J, Zarazaga M, Vila J, Torres C. Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal and food origins. Antimicrob Agents Chemother 2004; 48: 3996-4001.
58. Pantozzi FL, Moredo FA, Vigo GB, Giacoboni GL. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. Rev Argent Microbiol 2010; 42: 49-52.
59. Suk-Kyung L, Hee-Soo L, Hyang-Mi N, Yun-Sang C, Jong-Man K, Si-Wook S, et al. Antimicrobial resistance observed in *Escherichia coli* strains isolated from fecal samples of cattle and pigs in Korea during 2003-2004. Int J Food Microbiol 2007; 116: 283-86.
60. Elkins C, Mullis L. Substrate competition studies using whole-cell accumulation assays with the major tripartite multidrug efflux pumps of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother 2007; 51: 923-29.

# 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 \$ 100 (o 50 U\$S si el lugar de trabajo del primer principal proviene del exterior) hasta 5 hojas (publicadas) y \$ 50 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>