

Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias

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

ANALECTA VETERINARIA



Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA
Volumen 33 nº 2 año 2013



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 Académico de Gestión de Calidad

Méd.Vet. Julián Bover

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.

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

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).

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 33 n° 1, 2013

Artículos de Investigación/Research articles

- PATRÓN DINÁMICO DE CRECIMIENTO DE GAZAPOS DE CHINCHILLA (*Chinchilla lanigera*) DURANTE LA LACTANCIA.** DYNAMIC GROWTH PATTERN OF CHINCHILLA (*Chinchilla lanigera*) KITS DURING LACTATION. Nistal AJ, Zapata M, Bianchi F, Miranda J, Frana E, Di Masso RJ. 5-9
- LA INERVACIÓN DEL MIEMBRO TORÁCICO EN FELINOS.** FORELIMB INNERVATION IN CATS. Silva LB, Sánchez HL. 10-17
- EFFECTO DE LA GNRH ADMINISTRADA EN LA IATF A VAQUILLONAS SIN CELO SOBRE EL PORCENTAJE DE PREÑEZ.** EFFECT OF GNRH INJECTED AT TAI IN HEIFERS DID NOT SHOW ESTRUS ON PREGNANCY RATE. Novoa F, Preisseger G, Zangrilli G, Callejas S. 18-21
- ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS PARA REVERTIR LA MULTIRRESISTENCIA MEDIADA POR BOMBAS DE EFLUJO.** THERAPEUTIC ALTERNATIVES AGAINST MULTIDRUG RESISTANCE BY EFFLUX PUMP. Marchetti ML, Mestorino N. 22-32
- Revisiones/Review**
- POISONOUS PLANTS FOR CATTLE IN COLOMBIA: RESEARCH PERSPECTIVES.** PLANTAS TÓXICAS PARA LOS BOVINOS EN COLOMBIA: PERSPECTIVAS DE INVESTIGACIÓN. Lozano MC, Diaz GJ. 33-41
- ESTACIONALIDAD REPRODUCTIVA EN ANIMALES DOMÉSTICOS. NUEVAS PERSPECTIVAS EN EL GATO (*Felis silvestris catus*).** SEASONALITY OF REPRODUCTION IN DOMESTIC ANIMALS: NEW PERSPECTIVES IN DOMESTIC CATS (*Felis silvestris catus*). R Nuñez Favre, MC Bonaura, MC García Mitaceck, MC Stornelli, MA Stornelli, RL de la Sota. 42-49

Artículos de Investigación/Research articles

INFLUENCIA DE CONTAMINACIONES CAUSADAS POR MICROORGANISMOS OPORTUNISTAS EN RATONES DE LA CEPA BALB/C.FOX1NU TRANSPLANTADA CON LA LÍNEA TUMORAL HUMANA A549. INFLUENCE CONTAMINATION CAUSED BY OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS IN BALB/C.FOX1NU MICE TRANSPLANTED WITH THE HUMAN TUMOR LINE A549. Ayala M, Cagliada P, Milocco S, Carriquiriborde M, Laborde J, Gentil F, Resasco A, Maschi F, Principi G, Carbone C. 5-8

Escherichia coli CON RESISTENCIA A MÚLTIPLES ANTIMICROBIANOS EN GRANJAS DE PRODUCCIÓN PORCINA DE LA REPÚBLICA ARGENTINA. MULTIDRUG RESISTANCE Escherichia coli IN PIG'S FARM FROM ARGENTINA. Moredo FA, Colello R, Sanz M, Cappuccio JA, Carriquiriborde M, Etcheverría A, Perfumo CJ, Padola NL, Leotta GA. 9-13

EFECTO DE LA ADICIÓN DE DIMETILFORMAMIDA AL DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE ESPERMATOZOIDES FELINOS CONGELADOS-DESCONGELADOS. EFFECT OF DIMETHYLFORMAMINE ADDITION IN A TRIS EXTENDER ON VIABILITY OF FROZEN-THAWED CAT SPERMATOZOA. Bonaura MC, Nuñez Favre R, García Mitacek MC, Tittarelli CM, Stornelli MA. 14-19

Comunicación breve/Short communication

ESTUDIO PRELIMINAR DEL BORDE DORSAL DEL CUELLO EN CABALLOS DE PURA RAZA COLOMBIANA EN CARACAS-VENEZUELA. A PRELIMINAR STUDY OF DORSAL NECK EDGE IN HORSES OF PURE BREED COLOMBIAN IN CARACAS-VENEZUELA. Morales A, Méndez A, Pérez Arévalo J. 20-23

RELEVAMIENTO DE FACTORES DE RIESGO EN LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA. SURVEY OF RISK FACTORS IN THE FACULTY OF VETERINARY SCIENCES, NATIONAL UNIVERSITY OF LA PLATA. Bover J, Bonzo E, Vanini M, Ginart S. 24-28

INFLUENCIA DE CONTAMINACIONES CAUSADAS POR MICROORGANISMOS OPORTUNISTAS EN RATONES DE LA CEPA BALB/C.FOX1^{NU} TRANSPLANTADA CON LA LÍNEA TUMORAL HUMANA A549

Ayala M, Cagliada P, Milocco S, Carriquiriborde M, Laborde J, Gentil F, Resasco A, Maschi F, Principi G, Carbone C.

Laboratorio de Animales de Experimentación, Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: Entre las cepas de ratones inmunodeficientes se encuentra la BALB/c.Fox1^{nu} la cual se utiliza como modelo animal para el trasplante de tumores humanos. Estos ratones se producen bajo estrictas barreras sanitarias y deben estar libres de sus patógenos específicos; entre ellos, los oportunistas más frecuentes son *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* y *Citrobacter spp.* El objetivo de este trabajo fue evaluar la interferencia que causan los agentes patógenos oportunistas *Pseudomonas aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp.* en ratones BALB/c.Fox1^{nu} trasplantados con la línea tumoral humana A549. Cien ratones hembras BALB/c.Fox1^{nu} de 4 a 6 semanas se dividieron en diez grupos (G) de 10 animales cada uno: G1, trasplantados con la línea tumoral A549; G2 inoculados con *Pseudomonas aeruginosa*; G3, inoculados con *K. oxytoca*; G4, inoculados con *P. mirabilis*; G5, inoculados con *Citrobacter spp.*, G6 trasplantados con la línea tumoral e inoculados con *Pseudomonas aeruginosa*, G7 trasplantados con la línea tumoral e inoculados con *Klebsiella oxytoca*, G8 trasplantados con la línea tumoral e inoculados con *Proteus mirabilis*, G9 trasplantados con la línea tumoral e inoculados con *Citrobacter spp.* y G10 control. Siete de los 10 animales del G1 presentaron crecimiento tumoral, los ratones de los G2 al G 5 no mostraron signos clínicos; los de G6 al G9 no mostraron signología clínica y el desarrollo tumoral se comportó como en los 7 ratones del grupo el G1. Se concluyó que las infecciones por estos patógenos oportunistas no son fatales en ratones BALB/c.Fox1^{nu} y no interfieren en el desarrollo del tumor.

Palabras claves: Contaminaciones, causadas, línea, tumoral, ratones.

INFLUENCE CONTAMINATION CAUSED BY OPPORTUNISTIC MICROORGANISMS IN BALB/C.FOX1^{NU} MICE TRANSPLANTED WITH THE HUMAN TUMOR LINE A549

ABSTRACT Among immunodeficient mouse strains there is the BALB/c.Fox1^{nu} which is used as animal model for transplantation of human tumors. These mice are produced under strict sanitary barriers and should be free of their specific pathogens, among them, the most frequent opportunistic are *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* and *Citrobacter spp.* The aim of this study was to evaluate the interference caused by opportunistic pathogens *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* and *Citrobacter spp.* BALB/c.Fox1^{nu} hundred female mice of 4 to 6 weeks were divided into ten groups (G) of 10 animals each: G1, transplanted with tumor cell line A549, G2 inoculated with *Pseudomonas aeruginosa*, G3 inoculated with *K. oxytoca*; G4 inoculated with *P. mirabilis*, G5, inoculated with *Citrobacter spp.*, G6 tumor line transplanted and inoculated with *P. aeruginosa*, G7 transplanted tumor line and inoculated with *K. oxytoca*, G8 transplanted tumor line and inoculated with *P. mirabilis*, G9 transplanted tumor line and inoculated with *Citrobacter spp.* and G10 control. Seven of the 10 animals showed tumor growth in G1, G2 and G 5mice showed no clinical signs, animals from G6 to G9 showed no clinical symptoms and behaved as tumor growth in the 7 mice of G1. It was concluded that these infections are not fatal opportunistic pathogens in mice BALB/c.Fox1^{nu} and do not interfere with tumor development.

Key words: contamination, caused, line, tumor, mice.

Fecha de recepción: 12/08/13

Fecha de aprobación: 10/10/13

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

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

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de modelos animales destinados a investigaciones científicas continúa siendo un tema de vanguardia en las ciencias biomédicas. El ratón es el modelo más utilizado debido a sus características biológicas, al conocimiento de su genoma, y a las posibilidades que brinda esta especie cuando se modifican genéticamente o se reproducen en forma dirigida.

Entre las cepas que se utilizan para diferentes estudios experimentales se encuentran las inmunodeficientes (1). Los ratones pertenecientes a esta categoría son muy importantes ya que se emplean en estudios oncológicos, enfermedades autoinmunes y en aquellas que provocan deficiencias en el sistema inmunitario. Estos individuos constituyen un modelo animal valioso para el trasplante y mantenimiento de tumores de otras especies incluyendo los humanos.¹ Entre las cepas de ratones inmunodeficientes disponibles en Argentina se encuentra la BALB/c.*Fox1^{nu}*, a partir de ahora *nude*, que se produce en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (FCV-UNLP) donde se los utiliza como modelo animal (2). Estos ratones, por sus características, se deben mantener bajo estrictas barreras sanitarias para evitar que se infecten con microorganismos específicos (3).

Debido a su condición de inmunodeficientes, es importante no solo el control de los microorganismos patógenos que deben estar ausentes en las colonias de ratones inmunocompetentes, sino también de aquellos que se consideran oportunistas, los que en estos animales pueden provocar infecciones graves capaces de diezmar las colonias (4, 5). Entre los patógenos oportunistas que infectan más frecuentemente a esta especie se encuentran: *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis* y *Citrobacter spp*. Estos causan inconvenientes a nivel mundial y producen pérdidas importantes tanto en la industria farmacéutica como en los centros de investigación.

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria Gram negativa que forma parte de la flora normal del ratón (6, 7), tiene motilidad unipolar, es aeróbica, es capaz de crecer a 42 °C y no son exigentes ya que desarrollan fácilmente en los medios de cultivos comunes. Esta bacteria es un patógeno oportu-

nista en individuos inmunocomprometidos. La vía de contagio se produce a través de aerosoles, agua de bebida y fomites contaminados. Infecta el pulmón, oído medio y externo, coloniza el tracto urinario y heridas.

Klebsiella oxytoca es una bacilo Gram negativo, de doble membrana e indol positivo. Se encuentra colonizando el colon, la nasofaringe y la piel. Produce neumonía en animales inmunodeficientes, pudiendo además provocar septicemia en casos graves.

Proteus mirabilis es una bacteria Gram negativa, móvil, produce aglutinación y un olor característico. Causa infecciones urinarias, contamina heridas, provoca septicemia y neumonía.

Citrobacter spp es un bacilo aerobio Gram negativo que se encuentra en el agua, suelo, alimentos y como flora saprófita en el tracto intestinal del hombre y de los animales. Causa infecciones graves en individuos inmunosuprimidos, especialmente en vías urinarias y en las meninges (8,9).

El objetivo de este trabajo fue evaluar la influencia que provocan las infecciones causadas por *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp* en ratones inmunodeficientes de la cepa *nude* trasplantados con la línea celular de adenocarcinoma de pulmón humano A549.

Todos los procedimientos sobre el cuidado y uso de los animales se realizaron de acuerdo con las recomendaciones internacionales indicadas por el Consejo Internacional de Organizaciones de Ciencias Médicas (CIOMS). Para los trasplantes del tumor se siguieron las recomendaciones del Canadian Council on Animal Care (CCAC) (10, 11).

MATERIALES Y MÉTODOS

ANIMALES

Se utilizaron 100 ratones hembras de la cepa BALB/c.*Fox1^{nu}*, libres de patógenos específicos (SPF) de 4 a 6 semanas de edad producidos bajo barreras sanitarias en el Bioterio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la U.N.L.P.

Durante la experiencia los animales se alojaron en microaisladores con lecho de viruta estéril, dentro de una cabina ventilada (con filtración absoluta de aire a través de filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air 99,97 %), a una temperatura de 23+/-1°C, humedad 50-55 % y un régimen lumínico de 12 h luz/ 12 h oscuridad. Se les suministró alimento balanceado comercial ad libitum, (Cooperación) y agua de bebida autoclavados suplementada con un complejo

vitamínico. Los cambios del lecho se realizaron dos veces por semana (12).

CÉLULAS TUMORALES

La línea celular de adenocarcinoma de pulmón A549 se mantiene desde hace seis años en nuestro laboratorio a través de trasplantes subcutáneos sucesivos en ratones hembras homocigotas de la cepa N:NIH (S)-*Fox1^{nu}*, de donde se obtuvieron las células para realizar la experiencia.

TRASPLANTE TUMORAL

Las células tumorales se trasplantaron por vía subcutánea, según el protocolo del diseño experimental, en los ratones anestesiados con ketamina/xilacina (100/10 mg/kg, i.p.), realizando una incisión en la piel del cuello con un trocar.

MICROORGANISMOS

Se utilizaron las cepas de *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp*, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Animales de Experimentación de la FCV-UNLP, una suspensión de cada una de estas bacterias se sembró en caldo cerebro corazón (Lab. Britania, Los Patos, Argentina), se incubó a 37 °C durante 24 horas, se realizó el recuento de bacterias repicando 0,1 ml en placas de agar Cetrimide en el caso de *P. aeruginosa* y *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp* en agar MacConkey (Lab. Britania, Argentina); incubándolas bajo las mismas condiciones de tiempo y temperatura (6, 7, 13). Luego, se realizó el recuento de las colonias por placa determinándose una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/ml. Seguidamente se fraccionó en tubos de centrifuga 1 ml de la suspensión del caldo, se centrifugó a 10 000 rpm durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado se utilizó para realizar las inoculaciones por vía oral.

DISEÑO EXPERIMENTAL

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

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

Grupo 2: ratones inoculados por vía oral con una suspensión de *P. aeruginosa* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/mL

Grupo 3: ratones inoculados por vía oral con una suspensión de *K. oxytoca* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/mL.

Grupo 4: ratones inoculados por vía oral con una suspensión de *P. mirabilis* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/mL.

Grupo 5: ratones inoculados por vía oral

con una suspensión de *Citrobacter spp* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/mL.

Grupo 6: animales con trasplante de tumor e inoculados por vía oral con *P. aeruginosa* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/ml.

Grupo 7: animales con trasplante de tumor e inoculados por vía oral con *K. oxytoca* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/ml.

Grupo 8: animales con trasplante de tumor e inoculados por vía oral con *P. mirabilis* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/ml.

Grupo 9: animales con trasplante de tumor e inoculados por vía oral con *Citrobacter spp* en una concentración bacteriana de 10⁶ UFC/ml.

Grupo 10: grupo control inoculados con solución fisiológica.

Todos los animales de sacrificaron con una mezcla de CO₂/O₂ (13) a los 10 días post-inoculación (PI) para realizar la necropsia.

RESULTADOS

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

Los ratones de los grupos 2, 3, 4 y 5 no desarrollaron signos clínicos de la enfermedad, habiéndose aislado *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp*. del ciego.

En los animales de los grupos 6, 7, 8 y 9, el tumor creció de la misma manera que en los animales del grupo 1 y al realizarles la necropsia se aislaron los microorganismos inoculados experimentalmente del ciego de todos los individuos.

En los ratones del grupo control no se aislaron microorganismos ni se observó manifestación clínica de enfermedad.

DISCUSIÓN

Los animales inoculados con *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp*. no desarrollaron signos clínicos producidos por la infección de estas bacterias. El crecimiento tumoral no se vio afectado por la presencia de los microorganismos oportunistas utilizados en el presente estudio ya que no se observaron diferencias en las respuestas entre los animales trasplantados con el tumor e inoculados con las bacterias y los que solamente tenían el tumor. Por lo tanto, se puede inferir que *P. aeruginosa*, *K. oxytoca*, *P. mirabilis* y *Citrobacter spp*. son microorganismos que no interfieren en el desarrollo del tumor A549 trasplantado en ratones BALB/c.*Fox1^{nu}*.

Sin embargo, estos microorganismos deben estar ausentes en las colonias ya que su grado de patogenicidad puede variar ante situaciones de estrés y por los cambios que se produzcan en el macro y microambiente o cuando se llevan a cabo procedimientos experimentales en los animales.

BIBLIOGRAFIA

1. Dooley, TP, Stamp-Cole M, Ouding R. Evaluation of a *Nude* Mouse Tumor Model Using b-Galactosidase-expressing Melanoma Cells. *Lab Anim Sci*. Vol. 43 (1): 48-57; 1993.
2. Carriquiriborde M, Milocco SN, Principi G, Cagliada P, Carbone C. *Pasteurella pneumotropica* causa la regresión de tumores humanos trasplantados en ratones inmunodeficientes. *Revista Medicina (Buenos Aires)*. Vol. 66: 242-244; 2006.
3. Flynn RJ, Brennan PC, Fritz TE. Pathogen Status of commercially produced laboratory mice. *Lab. Anim. Care*. vol. 15: 440-448; 1965.
4. Kraft V, Deeny AA, Blanchet HM, Boot R, Hannsen AK, Hem A, von Herck H, Kunstyr I, Milite G, *et al.* Report of the FELASA Working Group on Animal Health: Recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, guinea pig and rabbit breeding colonies. *Laboratory Animals*. Vol. 28 (1): 1-12; 1994.
5. Won YS, Jeong ES, Park HJ, et al. Microbiological contamination of laboratory mice and rats in Korea from 1999 to 2003. *Exp Anim*. Jan;55(1):11-6; 2006.
6. Axel Fornerup Hansen. *Handbook of Laboratory Animal Bacteriology*, CRC Press LLC. 200.
7. Williams & Wilkins. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Baltimore, USA. 1984.
8. Weisbroth SH, Beker HJ, Lindsey RJ. *Bacterial and micotic diseases. The Laboratory Rat*. Vol I. New York. Academic Press. 1979.
9. Canadian Council on Animal Care "Guide to the care and use of experimental animals". CCPA, Manual Vol. 1. (2nda edición) 1998.
10. Guía para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina. 1999. Copyright National Academy Press, Washington, D.C. 1996.
11. Hume CW. *The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals*. UFAW. 5^{ta} Edición. UFAW. Great Britain by T. & A. Constable Ltd., Edinburgh. Vol. 16: 172-192. 1976.
12. *Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals*. NIH publication USA. 1986.
13. American College of Laboratory Animal Medicine (ACLAM) "Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animals", Columbia Inn, Columbia, MD, 1990.

Escherichia coli CON RESISTENCIA A MÚLTIPLES ANTIMICROBIANOS EN GRANJAS DE PRODUCCIÓN PORCINA DE LA REPÚBLICA ARGENTINA

Moredo FA¹, Colello R², Sanz M², Cappuccio JA³, Carriquiriborde M⁴,
Etcheverría A², Perfumo CJ³, Padola NL², Leotta GA⁵

¹Microbiología I y II, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

²Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, CIVETAN-CONICET-CIC-FCV-UNCPBA.

³Cátedra de Patología Especial, FCV-UNLP. ⁴Bioterio, FCV-UNLP. ⁵IGEVET CCT-La Plata Conicet.

Resumen: Los objetivos del presente trabajo fueron: i) monitorear la resistencia de *E. coli* frente a diversos antimicrobianos frecuentemente utilizados con fines terapéuticos y profilácticos en explotaciones porcinas; ii) aislar y caracterizar fenotípica y genotípicamente *E. coli* toxigénicos provenientes de cerdos con diarrea pre y posdestete; iii) determinar la presencia de integrones clase 1 y 2 como posible mecanismo de diseminación de resistencia. Se procesaron 216 hisopados rectales de cerdos clínicamente sanos y con diarrea, de 15 granjas de producción porcina. El 46,6 % de los aislamientos presentó resistencia a múltiples antimicrobianos. El 93 % fueron resistentes a tetraciclina, el 59 % a ciprofloxacina, el 52 % a florfenicol, 8 % a amoxicilina/ác. clavulánico y 0,6 % a gentamicina. No se observó resistencia a colistina. De 56 *E. coli*, 34 portaron al menos uno de los genes *int1* o *int2*. Se aisló *E. coli* toxigénico a partir del 53 % de los cerdos con diarrea. El uso inadecuado de antimicrobianos con fines profilácticos o terapéuticos en medicina veterinaria, implica un riesgo para la salud pública.

Palabras clave: *Escherichia coli*, resistencia antimicrobiana, integrones, cerdos

MULTIDRUG RESISTANCE *Escherichia coli* IN PIG'S FARM FROM ARGENTINA

Abstract: The objectives of this study were: i) to control the resistance of *E. coli* against various commonly used antimicrobials for therapeutic and prophylactic in pig farms ii) to isolate and characterize phenotypic and genotypic *E. coli* toxigenic diarrhea from pigs pre and post weaning, iii) to determinate the presence of class 1 and 2 integrons as possible resistance mechanism of spread of *E. coli* from porcine. Rectal swabs were processed from 216 clinically healthy and diarrheic pigs, from 15 pig farms. 46.6% of the isolates were resistant to multiple antimicrobials, 93% were resistant to tetracycline, 59% to ciprofloxacin, 52% to florfenicol, 8% to amoxicillin/clavulanic acid and 0.6% to gentamicin. No resistance to colistina was observed. Out of 56 *E. coli*, 34 carried at least one gene *int2* or *int1*. Toxigenic *E. coli* was isolated from 53% of pigs with diarrhea. The inappropriate use of antimicrobial to prophylactic or therapeutic purposes in veterinary medicine, involves a risk to public health.

Key words: *Escherichia coli*, antimicrobial resistance, integrons, pigs

Fecha de recepción: 10/10/13

Fecha de aprobación: 10/11/13

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

E-mail: fmoredofcv@unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El incremento en la utilización de antimicrobianos llevó a la emergencia de cepas bacterianas resistentes, transformándose en un problema de índole mundial. Dada la importancia de este, y considerando que se utilizan las mismas drogas en medicina veterinaria y en medicina humana, la Organización Mundial de la Salud (OMS) (1) considera que la resistencia a los antimicrobianos es un serio y complejo problema mundial que requiere la creación de un sistema global de monitoreo. Estados Unidos, Canadá, Australia, Noruega y algunos países de la Unión Europea, implementaron estos programas de monitoreo permanente, los cuales están principalmente orientados al estudio de patógenos humanos, microorganismos zoonóticos y bacterias indicadoras de la flora intestinal normal de los animales como *Escherichia coli* (OIE).

En los establecimientos de producción porcina, la utilización de antimicrobianos con fines profilácticos es una práctica habitual, y en general, son los mismos que se utilizan con fines terapéuticos. Las empresas de nutrición, incluyen como aditivo a los alimentos que se utilizan en las diferentes etapas productivas, drogas como amoxicilina, colistina, ciprofloxacina, norfloxacina, neomicina, oxitetraciclina, tiamulina y tilosina. Según el manejo sanitario de cada granja, se suministran también cefalexina, ceftiofur, florfenicol, gentamicina, doxiciclina y sulfatrimetoprima.

Entre las diversas clases de antimicrobianos utilizados, los β -lactámicos representan una de las más significativas, debido a sus beneficios terapéuticos para el tratamiento de infecciones bacterianas. Actualmente, una variedad de β -lactámicos tiene licencia para su uso en medicina veterinaria y así proporcionan oportunidades para la presión de selección en el desarrollo de resistencia, incluyendo a los β -lactámicos de espectro extendido (2).

Los integrones son elementos que contienen los determinantes genéticos de los componentes de un sistema de recombinación específica de sitio, que reconoce y captura los genes móviles de resistencia a los antimicrobianos. Incluyen un gen para una integrasa (*int*), un sitio de recombinación adyacente (*attI*), y un promotor/s fuerte que asegura la expresión de los casetes integrados (3).

La diarrea posdestete (DPD) es una entidad de distribución mundial en granjas de cerdos en confinamiento. Sumado a factores ambientales, sociales y nutricionales (4), el agente desencadenante es *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), aunque también puede estar involucrado *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) (5).

Para el desarrollo del presente trabajo se plantearon tres objetivos i) monitorear la resis-

tencia de *E. coli* frente a diversos antimicrobianos frecuentemente utilizados con fines terapéuticos y profilácticos en explotaciones porcinas; ii) aislar y caracterizar fenotípica y genotípicamente *E. coli* toxigénicos provenientes de cerdos con diarrea pre y posdestete; iii) determinar la presencia de integrones clase 1 y 2 como posible mecanismo de diseminación de resistencia entre *E. coli* de origen porcino.

MATERIALES Y MÉTODOS

En el año 2010, se monitorearon 15 granjas ubicadas en Buenos Aires, Santa Fé, Córdoba y Entre Ríos, se enumeraron del 1 al 15. Se muestrearon 15 animales por granja, divididos en tres estratos en función a la semana de destetados: 1° semana (21-28 días), 2° semana (29-35 días) y 3° semana (36-42 días), con o sin diarrea, mediante hisopados rectales (cinco por de cada estrato) (DELTALAB, Buenos Aires, Argentina). Se procesaron en total 216 muestras, de las cuales 32 correspondieron a cerdos con diarrea provenientes de 11 granjas diferentes.

Luego del muestreo, el trabajo de organizó en etapas: a) aislamiento de *E. coli* a partir de muestras provenientes de cerdos sin manifestación clínica de diarrea; b) aislamiento y tipificación fenotípica y genotípica de *E. coli* toxigénicos a partir de cerdos con diarrea; c) determinación de resistencia frente seis antimicrobianos de los aislamientos obtenidos en las etapas a y b; d) determinación del comportamiento frente a diversos β -lactámicos, de *E. coli* con fenotipo resistente o intermedio a amoxicilina/ác. clavulánico (aislados de animales sin manifestación clínica de diarrea) y *E. coli* toxigénicos (aislado de cerdos con diarrea); e) determinación de la presencia de *intI1* o *intI2* en *E. coli* con fenotipo resistente o intermedio a amoxicilina/ác. clavulánico (aislados de animales sin manifestación clínica de diarrea) y *E. coli* toxigénicos (aislado de cerdos con diarrea).

Los hisopos se sembraron en agar Mac Conkey (Britania, Buenos Aires, Argentina) y se incubaron durante 24 horas a 42°C.

a) En el caso de los cultivos provenientes de animales sin manifestación clínica de diarrea se procedió según las técnicas convencionales de aislamiento y tipificación de *E. coli* (6).

b) En el caso de los cultivos provenientes de animales con diarrea, se procedió a la detección de los genes que codifican la producción de las toxinas LT, STa y STX2e según el procedimiento descrito en un trabajo previo (7), realizándose el aislamiento de *E. coli* toxigénico. Se serotipificaron en el Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología, Departamento SAMP FCV-UNCPBA, y se caracterizaron genotípicamente demostrando la presencia de los genes *eltA*, *estI*, *estII*, *ast1*, *stx₁*, *stx₂*, *stx_{2e}*, que codifican las toxinas LT, STa, STb, EAST, STX1, STX2, STX2e respectivamente y los

genes *faeG*, *fanC*, *fasA*, *fedA*, *F41*, *aidA*, *ea*e y *Paa* que codifican las adhesinas fimbriales y no fimbriales F4, F5, F6, F18, F41, AIDA, intimina y Paa, mediante la técnica de PCR en tiempo final (7).

c) La determinación de la sensibilidad antimicrobiana se realizó siguiendo las recomendaciones del CLSI 2008, seleccionándose el método de difusión en agar. Se utilizaron los siguientes antimicrobianos: amoxicilina/ácido clavulánico 20/10 µg (AMC) (Britania), gentamicina 10 µg (GEN) (Britania), tetraciclina 30 µg (TET) (Britania), ciprofloxacina 5 µg (CIP) (Britania), florfenicol 30 µg (FLOR) (Cevasa) y sulfato de colistina 10 µg (COL) (Oxoid). La interpretación de los resultados se realizó en base a los documentos M31-A3 (8) y M100-S19 (9) del CLSI utilizando como cepa control *E. coli* ATCC 25922. Se definió como multirresistente aquel aislamiento que presentó resistencia a tres o más grupos de antimicrobianos.

d) Con la intención de analizar el comportamiento de los aislamientos frente a diversos β-lactámicos, se seleccionaron 56 *E. coli* que presentaron patrón fenotípico de resistente o intermedio frente a amoxicilina/ácido clavulánico y se probaron cefalotina 30 µg (CEF) (Britania), cefotaxima 30 µg (CTX) (Britania), ceftazidima 30 µg (CAZ) (Britania), cefoxitina 30 µg (FOX) (Britania). La interpretación de los resultados se realizó, según los documentos M31-A3 y M100-S19 del CLSI.

e) La determinación de la presencia de integrones clase 1 y 2 como posible mecanismo de diseminación de resistencia de *E. coli* de origen porcino se realizó en los 17 aislamientos de *E. coli* toxigénicos provenientes de animales con diarrea y en 39 *E. coli* con comportamiento resistente o intermedio a amoxicilina/ácido clavulánico, aislados de cerdos sin manifestación clínica de diarrea. Se utilizó la técnica de PCR en tiempo final descrita por Rosser y col. y Oman y col., respectivamente.

RESULTADOS

De las 216 muestras procesadas, se aisló *E. coli* en 178 (82,4 %). En la tabla 1 se describen los resultados obtenidos a partir de las pruebas de sensibilidad antimicrobiana de los 178 *E. coli*, frente a AMC, GEN, TET, CIP y FLOR.

Dentro de éstos se encuentran incluidos los aislamientos toxigénicos provenientes a partir de los animales con diarrea. No se incluyó la colistina ya que el total de los aislamientos mostró poseer comportamiento sensible. Se observó multirresistencia en 76 (46,6 %) aislamientos. En la tabla 2 se detalla la cantidad de muestras procesadas por granja, el porcentaje de aislamientos resistentes y multirresistentes frente a los antimicrobianos ensayados en cada una de ellas.

Tabla 1. Comportamiento de *Escherichia coli* frente a seis antimicrobianos frecuentemente utilizados en explotaciones porcinas con fines terapéuticos o profilácticos

Antimicrobiano	Sensible n (%)	Intermedio n (%)	Resistente n (%)
COL	178 (100)	0	0
GEN	176 (98,9)	1 (0,6)	1 (0,6)
AMC	122 (68,5)	42 (23,6)	14 (7,9)
FLOR	75 (42,1)	9 (5)	94 (52,2)
CIP	67 (37,2)	5 (2,8)	106 (59,5)
TET	8 (4,5)	5 (2,8)	165 (92,7)

n: cantidad de aislamientos. AMC: amoxicilina/ácido clavulánico. TET: tetraciclina. GEN: gentamicina. CIP: ciprofloxacina. FLOR: florfenicol. COL: colistina

De los 32 hisopados rectales procesados a partir de cerdos con diarrea, se aisló 17 *E. coli* toxigénicos, a partir de la misma cantidad de animales (53 %). La tabla 3 muestra los resultados de serotipificación y caracterización genotípica de estos aislamientos.

Se seleccionaron 56 *E. coli*, 17 toxigénicos aislados a partir de cerdos con diarrea y 39 provenientes de animales sin diarrea, con fenotipo resistente o intermedio a amoxicilina/ác. clavulánico. El 62,5 % (35/56) tuvieron comportamiento resistente frente a cefalotina, el 7,1 % (4/56) y 8,9 % (5/56) fueron resistentes a cefotaxima y cefoxitina, respectivamente. No se observaron aislamientos resistentes a ceftazidima.

Con respecto a la presencia de *int11* o *int12*, se obtuvieron los siguientes resultados: de los 56 *E. coli* (17 toxigénicos aislados a partir de cerdos con diarrea y 39 provenientes de animales sin diarrea, con fenotipo resistente o intermedio a amoxicilina/ác. clavulánico) 34 (60,7 %) fueron portadores de al menos uno de los dos genes; de *int11* 24 aislamientos, de *int12* 4 y de ambos genes 6. La presencia de estos genes en *E. coli* toxigénicos está asociada a las diferentes granjas. En los siete aislamientos de la granja 1 se observó *int1*, en uno de la granja 13 (*int1*) y en el único de la granja 15 ambos genes (Tabla 3).

DISCUSIÓN

A diferencia de los resultados obtenidos en estudios previos, se observó aumento del porcentaje de aislamientos resistentes a AMC y CIP. El porcentaje de resistencia frente a TET y fenicoles se mantuvo igual; y disminuyó con respecto a GEN (10, 11).

Li y col. (2007) informaron la correlación entre la resistencia observada frente a ceftiofur con respecto a amoxicilina/ác. clavulánico y cefoxitina, sugiriendo un posible mecanismo de resistencia común. Esta sería la posible explicación a nuestros hallazgos, ya que de los tres

Tabla 2. Porcentaje de *Escherichia coli* resistentes y multirresistentes discriminado por granja.

Granja	n/M	AMC	GEN	TET	CIP	FLOR	Multirresistencia
1	14/15	7,1	0	100	100	78,5	78,5 (11/14)
2	11/15	0	0	90,9	90,9	63,3	54,5 (6/11)
3	14/15	0	85,7	85,7	85,7	85,7	71,4 (10/14)
4	12/15	0	0	83,3	0	0	0 (0/12)
5	12/15	8,3	0	100	41,7	58,3	16,7 (2/12)
6	9/11	0	0	100	77,8	66,7	44,4 (4/9)
7	8/15	50	0	100	62,5	0	37,5 (3/8)
8	13/15	15,4	0	76,9	92,3	61,5	46,1 (6/13)
9	14/15	0	0	100	0	42,8	0 (0/14)
10	15/15	6,7	0	100	53,3	73,3	53,3 (8/15)
11	11/15	0	0	90,9	9	18,2	14,3 (1/11)
12	10/15	20	0	90	10	0	8,33 (1/12)
13	14/16	14,3	0	85,7	64,3	42,8	46,1 (6/13)
14	10/10	10	0	90	100	80	70 (7/10)
15	11/14	0	0	100	100	100	91,7 (11/12)

n: cantidad de aislamientos. M: muestras procesadas. AMC: amoxicilina/ácido clavulánico. GEN: gentamicina. TET: tetraciclina. CIP: ciprofloxacina. FLOR: florfenicol.

Tabla 3. Caracterización genotípica de *Escherichia coli* toxigénicos aislados de cerdos con diarrea posdestete

Granja	Localización	Aislamiento	Serotipo	Patrón de resistencia	Genotipo
1	Buenos Aires	G1/2°S/1	ONT:H27	CIP-TET-FLOR-AMP- CEF	<i>estI/ estII/ aidA/ fedA/ int1</i>
1		G1/2°S/2	ONT:H23	CIP-TET-FLOR-AMP- CEF	<i>estI/ estIII/ fedA/ int1</i>
1		G1/2°S/3	ONT:H23	CIP-TET-FLOR-AMP- CEF	<i>estI/ estIII/ fedA/ int1</i>
1		G1/2°S/4	ONT:H23	CIP-TET-FLOR-AMP- CEF	<i>estI/ estIII/ fedA/ int1</i>
1		G1/3°S/1	O2:H32	CIP-TET-FLOR-AMP- CEF	<i>stx_{2e}/ int1</i>
1		G1/3°S/2	ONT:H23	CIP-TET-AMP-CEF	<i>estI/ estII/ fedA/ int1</i>
1		G1/3°S/3	ONT:H23	CIP-TET-FLOR-AMP- CEF	<i>estI/ estII/ fedA/ int1</i>
6	Santa Fé	G6/1°S/1	O138:H14	CIP-TET-FLOR-AMP	<i>estI/ estIII/ aidA</i>
6		G6/1°S/2	ONT:H19	CIP-TET-FLOR-AMP	<i>estI/ estII</i>
7	Santa Fé	G7/1°S/3	O149:HNT	CIP-TET-AMP	<i>eltA/ estII/ ast1/ aidA/ faeG</i>
8	Santa Fé	G8/2°S/3	O149:HNT	AMC-CIP-FLOR-AMP- CEF	<i>eltA/ estI/ estIII/ ast1</i>
8		G8/2°S/5	O149:HNT	CIP-FLOR-AMP-CEF	<i>eltA/ estII/ ast1</i>
13	Córdoba	G13/1°S/1	ONT:H30	TET-FLOR-AMP	<i>ast1/ aidA/ int1</i>
13		G13/1°S/2	O138:H30	TET	<i>ast1</i>
13		G13/1°S/4	O8:H9	TET-AMP	<i>ast1</i>
13		G13/Mat	O126:H27	CIP-TET-FLOR-AMP	<i>ast1/ aidA</i>
15	Córdoba	G15/2°S/1	O138:HNM	CIP-TET-FLOR-AMP	<i>estI/ estII/ fedA/ int1/ int2</i>

NT: no tipificable. NM: inmóvil. CIP: ciprofloxacina. TET: tetraciclina. FLOR: florfenicol. AMP: ampicilina. CEF: cefalotina. AMC: amoxicilina/ácido clavulánico.

β-lactámicos, el único que se emplea en las explotaciones porcinas es el ceftiofur.

E. coli enterotoxigénico fue el predominante en la mayoría de los animales con diarrea, con genotipo coincidente con los publicados previamente (7, 12). El 82,3 % (14/17) de los aislamientos toxigénicos presentaron al menos uno de los dos (AIDA-I y STb) marcadores de *E. coli* diarregénicos porcino, indicados por Ngeleka y

col. De los 17 aislamientos, 9 (53 %) pudieron ser serogrupo, perteneciendo la mayoría de ellos a los serogrupos asociados con diarrea posdestete (O149, O138 y O8) (13). Un aislamiento de la granja 13 obtenido a partir de un animal de maternidad, fue categorizado con *E. coli* enteroagregativo O126:H27. Este serotipo no está asociado con diarrea en cerdos, aunque sí lo está con niños hospitalizados con gastroenteritis (14).

A diferencia de lo observado por Colello y col., el 53 % (9/17) de los *E. coli* toxigénicos portaron *int1*.

Este trabajo demuestra que la resistencia observada es coincidente con los antimicrobianos de uso frecuente para la prevención y tratamiento de enfermedades infecciosas en cerdos. Dadas las diferencias obtenidas en los valores de sensibilidad entre las diferentes granjas, no es posible la prescripción de un antimicrobiano, sin tener en cuenta el efecto granja y sin la realización de estudios de sensibilidad antimicrobiana en forma periódica.

El uso inadecuado de antimicrobianos con fines profilácticos o terapéuticos en medicina veterinaria, implica un riesgo para la salud pública, debido a la adquisición de integrones con la subsecuente diseminación de genes de resistencia entre las diferentes poblaciones bacterianas.

Futuros estudios serán necesarios para determinar la presencia de *genes cassettes* en *E. coli* de origen animal, así como también el mecanismo de resistencia frente a β -lactámicos.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por un subsidio otorgado por la Agencia Nacional de Promoción Ciencia y Tecnología – FONCYT. PICT-2010-0961 y FONCYT PICT 2010 N° 1655, SECAT UNCPBA, CIC-PBA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Franklin A, Acar J, Anthony F, Gupta R, Nicholls T, Tamura Y. Antimicrobial resistance: harmonization of national antimicrobial resistance monitoring and surveillance programmes in animals and in animal-derived food. Scientific and Technical Review, Office International des Épizooties (O.I.E.) 2000; 20:589-70.
2. Li XZ, Mehrotra M, Ghimire S, Adewoye L. β -Lactam resistance and β -lactamases in bacteria of animal origin. Vet Microbiol 2007; 121:197-214.
3. Peters EDJ, Leverstein-van Hall MA, Box ATA, Verhoef J, Fluit AC. Novel gene cassettes and integrones. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:2961-4.
4. Fairbrother J, Nadeau E, Gyles C. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. Anim Health Res Rev 2005; 6:17-39.
5. Ngeleka M, Pritchard J, Appleyard G, Middleton D, Fairbrother J. Isolation and association of *Escherichia coli* AIDA-I/STb, rather than EAST1 pathotype, with diarrhea in piglets and antibiotic sensitivity of isolates. J Vet Diagn Invest 2003; 15:242-52.
6. Moredo F, Vigo G, Sanz M, Aguirre J, Armocida A, Perfumo C. Caracterización enterotoxigénica y estudio de sensibilidad antimicrobiana *In Vitro* de cepas de *Escherichia coli* aisladas de cerdos con cuadros clínicos de diarrea pre y posdestete. Analecta Vet 1998; 18:29-34.

7. Moredo F, Cappuccio J, Insarralde L, Perfumo CJ, Quiroga MA, Leotta GA. Caracterización genotípica de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos con diarrea posdestete y enfermedad de los edemas. Rev Arg Microbiol 2012; 44:85-9.

8. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard- Third Edition. CLSI document M31-A3. 2008. Pennsylvania, USA.

9. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Nineteenth Edition. CLSI document M100-S19. 2009. Pennsylvania, USA.

10. Moredo FA, Vigo GB, Cappuccio JA, Piñeyro P, Perfumo CJ, Giacoboni GI. Resistencia a los antimicrobianos de aislamientos de *Escherichia coli* obtenidos de cerdos de la República Argentina. Rev Arg Microbiol 2007; 39:227-9.

11. Pantozzi FL, Moredo FA, Vigo GB, Giacoboni GI. Resistencia a los antimicrobianos en bacterias indicadoras y Zoonóticas aisladas de animales domésticos en Argentina. Rev Arg Microbiol 2010; 42:49-52.

12. Parma AE, Sanz ME, Viñas MR, Cicuta ME, Blanco JE, Boehringer SI, Vena MM, Roibon WR, Benitez MC, Blanco J, Blanco M. Toxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs in Argentina. Vet Microbiol 2000; 72:269-276.

13. Frydendahl K. Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches. Vet Microbiol 2002; 85:169-82.

14. Shazberg G, Wolk M, Schmidt G, Miron D. Enterogregative *Escherichia coli* serotype O126:H27, Israel. Emerg Infect Dis 2003; 9:1170-3.

15. Rosser SJ, Young HK. Identification and characterization of class 1 integrons in bacteria from an aquatic environment. J Antimicrob Chemother 1999; 44:11-8

16. Orman BE, Piñeyro SA, Arduino S, Galas M, Melano R, Caffer MI, Sordelli EO, Centrón D. Evolution of multiresistance in nontyphoid *Salmonella* serovars from 1984 to 1998 in Argentina. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:3963-70.

17. Colello R, Moredo F, Etcheverría A, Leotta G, Parma A, Padola NL. Detection of integrons class 1 and class 2 in VTEC strains isolated from pigs. 8th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections, 2012, Resumen P-096, p. 147, Amsterdam, Holanda.

EFFECTO DE LA ADICIÓN DE DIMETILFORMAMIDA AL DILUYENTE TRIS BASE SOBRE LA SUPERVIVENCIA DE ESPERMATOZOIDES FELINOS CONGELADOS-DESCONGELADOS

Bonaura MC^{1,2}, Nuñez Favre R^{1,2}, García Mitacek MC^{1,2}, Tittarelli CM¹, Stornelli MA¹

¹Cátedra y Servicio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, ²CONICET.

Resumen: El objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la adición de Dimetilformamida en reemplazo de parte del glicerol a un diluyente Tris base sobre la supervivencia espermática al descongelado en felinos. Se utilizaron 20 gatos, 16 se sometieron a orquiectomía bilateral para realizar la recuperación espermática de los epidídimos, y 4 fueron utilizados para la obtención de semen mediante electroeyaculación. Con los espermatozoides epididimales recuperados y el semen obtenido se realizó criopreservación utilizando un diluyente Tris base con el agregado de 0.5% o 0% de dimetilformamida. El agregado de Dimetilformamida al Tris base no ejerció efectos protectores sobre los espermatozoides congelados-descongelados en comparación con la células criopreservadas con el diluyente Tris base. El agregado de un mayor porcentaje de amida podría mostrar efectos benéficos sobre los espermatozoides felinos al descongelado.

PALABRAS CLAVE: Espermatozoides, gato, semen congelado, criopreservación.

EFFECT OF DIMETHYLFORMAMINE ADDITION IN A TRIS EXTENDER ON VIABILITY OF FROZEN-THAWED CAT SPERMATOZOA

Abstract: The aim of this study was to assess the effect of dimethylformamide in replacement of a glycerol part in a Tris-based extender on viability of frozen-thawed feline sperm. Twenty male cats were included in this study. Sixteen cats were castrated and epididymides were used for spermatozoa recovery. The remaining 4 animals were used for obtained semen by electroejaculation. Cryopreservation with sperm obtained from epididymides and semen were done using a Tris-based extender with 0.5% or 0% of dimethylformamide. The addition of dimethylformamide does not improve sperm parameters compared with sperm frozen with Tris based extender. The addition of a higher percentage of this amide could show the protector effect on frozen thawed feline sperm.

Keywords: Sperm, cat, frozen semen, cryopreservation

Fecha de recepción: 15/11/13

Fecha de aprobación: 20/02/14

Dirección para correspondencia: Stornelli A, Cátedra y Servicio de Reproducción Animal. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. CC 296, (B1900AVW) La Plata. Argentina.

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

INTRODUCCIÓN

La recuperación de espermatozoides epididimales ofrece un material de gran valor a la hora de conservar material genético de un individuo que ha sufrido muerte súbita o debe someterse a orquiectomía. Esta técnica permite obtener espermatozoides maduros y fértiles que podrán ser criopreservados y almacenados para su posterior uso extendiendo así la vida reproductiva de un individuo, hecho de suma importancia en animales en vías de extinción. Así mismo la criopreservación de espermatozoides y su posterior utilización, mediante inseminación artificial (IA) permite conservar la biodiversidad de las poblaciones y evitar la extinción de algunas especies amenazadas. La IA con espermatozoides criopreservados puede ser útil cuando la hembra y el macho se encuentran en lugares distantes o cuando el macho ya no está disponible para el servicio natural. Esta biotecnología es de gran utilidad en felinos silvestres en vía de extinción (1, 2).

Si bien existen comunicaciones sobre la recuperación y criopreservación de espermatozoides epididimales así como de semen felino (3, 4), son pocos los estudios de la influencia de diferentes crioprotectores incorporados al diluyente (DIL) de congelación sobre la supervivencia de espermatozoides felinos (EF) al descongelado. En la última década, se han realizado algunos estudios del efecto de la adición de detergentes al DIL Tris sobre la criopreservación de semen felino. El uso de Orvus, Equex STM paste y SDS han permitido obtener buenos resultados en el semen congelado-descongelado en esta especie (5, 6, 7, 8).

Los crioprotectores permeables (glicerol, propilenglicol, etilenglicol) permiten remover gran parte del agua intracelular antes del proceso de congelación, evitando de esta manera la formación de cristales de hielo y previniendo de este modo la ruptura celular asociada a este proceso. El glicerol es el crioprotector más comúnmente utilizado en la criopreservación de semen de muchas especies. Sin embargo, puede inducir cambios en los fosfolípidos de membrana alterando la estabilidad y permeabilidad de la misma, evento que puede conducir a una disminución de la longevidad, aceleración de la capacitación y en consecuencia disminución la capacidad fertilizante de los espermatozoides (9). Los efectos tóxicos producidos por el glicerol se relacionan con: 1) alteración directa de las bicapas lipídicas; 2) interacción con las proteínas integrales de membrana y glicoproteínas, 3) inducción del aumento de la demanda bioenergética (10, 11, 12, 13, 14, 15). Asociados al aumento de la viscosidad causado por el glicerol intracelular, puede observarse al Microscopio Electrónico (ME) alteración de los microtúbulos y glicocalyx de la membrana,

desnaturalización de proteínas e inducción de zonas de membrana libres de proteínas (16). La respuesta de la membrana plasmática a cada tipo de crioprotector puede determinar el grado de movimiento de agua y de iones a través de ella (17). La estructura de la bicapa lipídica alterada por el glicerol modificaría las tasas de permeabilidad al agua, afectando así la supervivencia espermática a los procesos de congelación-descongelación (18). El glicerol, además de modificar la estructura nativa de las proteínas de membrana, produce aumento de la osmolalidad en el medio extracelular con el consecuente estrés osmótico sobre la célula espermática y ocurrencia de reacción acrosómica (19). Algunas especies, como los equinos, muestran una mayor sensibilidad a los efectos tóxicos del glicerol, lo que ha impulsado la búsqueda de nuevos crioprotectores.

Las amidas son moléculas de bajo peso molecular y de baja viscosidad por lo que penetran rápidamente las membranas, de esta manera podrían reducir los daños asociados al estrés osmótico (20) generando un ambiente menos dañino para el espermatozoide. Se han observado resultados positivos con el uso de amidas, incorporadas a diluyentes de congelación seminal en conejos, equinos y aves (21, 22, 20, 23). En los equinos, el uso de amidas provee una alternativa para mejorar los parámetros al descongelado de aquellos animales que son definidos como "malos congeladores" (21), sin embargo en los caninos los resultados obtenidos sugieren que no mejorarían la calidad espermática al descongelado (24, 25). Las variaciones observadas, en los estudios realizados, pueden atribuirse a las diferencias existentes en la composición lipídica de las membranas de las distintas especies. La cantidad y tipo de fosfolípidos podría interferir en la estabilidad de la membrana durante la criopreservación (20).

Por lo anteriormente expuesto podemos concluir que hay estudios que muestran que la adición al DIL de amidas en diferentes concentraciones, en reemplazo de parte del glicerol, permite mejorar parámetros de contrastación seminal *in vitro*. Si bien este efecto benéfico ha sido comprobado en equinos y aves (13), no hay estudios que demuestren su acción sobre espermatozoides felinos.

La incorporación al Diluyente Tris base de DMF en reemplazo de parte del glicerol permitiría reducir los efectos tóxicos asociados al glicerol y obtener de esta manera un DIL en el cual se minimicen los efectos tóxicos del crioprotector sobre los espermatozoides durante el proceso de congelación-descongelación.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de la adición de DMF al DIL TRIS sobre la supervivencia espermática al descongelado en felinos. La hipótesis planteada fue que la incorporación al DIL TRIS de DMF permitirá reducir

los efectos tóxicos del glicerol sobre los espermatozoides epididimales y seminales durante el proceso de congelación-descongelación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Con el fin de cumplir con el objetivo planteado se diseñaron dos experimentos.

Experimento I:

Se utilizaron gatos (n=16) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual en un diseño aleatorio (26). Los gatos utilizados fueron incluidos en un plan de control urbano de la reproducción. Luego de la orquiectomía bilateral (27), los testículos y epidídimos (EPI) de cada animal se colocaron inmediatamente en solución fisiológica (SF) con el agregado de 100 IU/ml de penicilina, mantenidos a temperatura ambiente y enviados rápidamente al laboratorio.

Los EPI fueron procesados dentro de las 4 hs posteriores a la orquiectomía, tiempo que se tarda desde la orquiectomía hasta la llegada de los órganos al laboratorio. Se separaron las colas de los epidídimos y se atemperaron en un baño termostático a 37 °C por 10 minutos en 0,75 ml de Tris base (Tris 3,025 g, ácido cítrico 1,27 g, fructosa 1,25 g, agua destilada csp 100 ml). La recuperación de los espermatozoides epididimales (EE) se realizó por cutting de la cola del epidídimo (28).

Pruebas de contrastación del material seminal *in vitro*:

Los EE obtenidos en Tris base fueron colocados en un baño termostático a 37°C y sometidos a las siguientes pruebas de contrastación:

Examen macroscópico: 1) Color; 2) Aspecto; 3) Volumen (ml).

Examen microscópico: 1) Concentración espermática (CE; 10^6 /ml), se calculó realizando el conteo en cámara de Neubauer(29); 2) Motilidad individual (MI), una muestra de 10 μ l de los EE frescos se colocaron en un portaobjetos limpio a 37 °C, se le colocó un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X, en varios campos se estimó el porcentaje de espermatozoides con motilidad progresiva (5, 29); 3) Vigor (VI, escala 1-5) 10 μ l de los EE frescos se colocaron en un portaobjetos limpio a 37 °C, se le colocó un cubreobjetos y se observó por microscopía a 400 X, en varios campos se estimó el tipo de movimiento individual (5, 29); 4) Morfología espermática (ME; % anomalías primarias y secundarias), se observaron los espermatozoides por microscopía a 1000 X utilizando tinción 15 Biopur (29); 5) Acrosomas intactos (AI, % de acrosomas intactos), una muestra de los EE se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de *Pisum sativum* aglutinin-isotiocianato de fluoresceína (30); 6) Integridad de mem-

brana (IM, porcentaje membranas intactas), una muestra de los EE se procesó para su estudio por microscopía de fluorescencia con el conjugado de diacetato de carboxifluoresceína (DIC) y Yoduro de propideo (YP) (31).

Para realizar la congelación de los EE se utilizaron dos diluyentes DIL (n=2) diferentes. Los EE recuperados se mezclaron con un volumen calculado de cada uno de los DIL descriptos para obtener una concentración final de 50 x10⁶ espermatozoides/ml. Se utilizó un DIL TRIS con 5 % de glicerol sin el agregado de Dimetilformamida (DMF; [TRISO]) o con el agregado de, 0.5% de DMF y 3,5 % de glicerol [TRISDMF]. El DIL TRIS que se utilizó tenía la siguiente composición: Tris (2,4 g), ácido cítrico (1,4 g), fructosa (0,6 g), glicerol (4 g), yema de huevo (20 % v/v), penicilina sódica (0,06 g), sulfato de estreptomina (0,1 g), y agua destilada (cantidad suficiente para [csp] 100 ml) (32). Luego de un tiempo de equilibración de 20 minutos a 4 °C (33), los EE diluidos fueron envasados en pajuelas de 0,25 ml y congelados de acuerdo a la técnica descrita por Andersen (32). La descongelación de los EE se realizó a 37 °C durante 15 segundos (7).

Los EE congelados-descongelados fueron sometidos a las mismas pruebas de contrastación microscópica que los EE frescos.

Experimento II:

Se utilizaron gatos (n=4) mestizos, de entre 24 y 36 meses de edad, sanos, con un peso entre 3 y 5 Kg y en actividad sexual en un diseño aleatorio (26). Los gatos fueron alojados en una habitación acondicionada, en jaulas individuales, alimentados con alimento balanceado (Fit 32[®], Royal Canin, Argentina) y agua *ad-libitum*. Los animales se encontraban sometidos a un régimen de luz artificial de fotoperíodo largo (14 horas luz diarias), con lámparas incandescentes de 100 W (34), a fin de mantener estable la producción espermática (35). Luego de permanecer 45 días en este régimen de luz, los gatos fueron anestesiados con ketamina (25 mg/kg i.m.), xylazina (1 mg/kg i.m.) y atropina (0,04 mg/kg i.m.) (36) y sometidos cada 15 días a electroeyaculación para obtención de un eyaculado (35). Se obtuvieron dos eyaculados por animal.

El semen obtenido fue congelado con los diluyentes y la metodología descrita en el experimento I. Los espermatozoides (E) frescos y los congelados-descongelados fueron sometidos a las mismas pruebas de contrastación descriptas en el Experimento I.

Análisis estadístico

Los datos fueron analizados mediante ANOVA. Las variables categóricas se analizaron con PROC CATMOD y las continuas con PROC GLM de SAS[®] (37).

Marco bioético del uso de animales

Los experimentos se realizaron respetando y de acuerdo con las recomendaciones internacionales especificadas en la guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio y con las recomendaciones de la National Academy Science, Washinton DC, USA. Estas recomendaciones serán tenidas en cuenta en lo referente a la atención médico veterinaria, medio ambiente, alimentación, sanidad, identificación, sujeción, administración de drogas, toma de muestras sangre y procedimientos quirúrgicos (38).

RESULTADOS

En el experimento I se observaron diferencias significativas en MI, VI, IM entre los EE pos obtención y los EE congelados-descongelados ($57,5\pm 3,08$ vs $7,5\pm 1,88$; $4,75\pm 0,15$ vs $4\pm 0,2$; $66,5\pm 2,77$ vs $8,5\pm 1,82$; $p < 0.001$). Los EE congelados-descongelados con TRISDMF no mostraron diferencias significativas en ninguno de sus parámetros cuando se los comparó con los valores obtenidos en los EE congelados descongelados con TRISO.

En el experimento II se observaron diferencias significativas en MI, VI, IM, IA entre los E frescos y los E congelados-descongelados ($91,66\pm 0,8$ vs $16,94\pm 2$; $4,94\pm 0,05$ vs $3,47\pm 0,16$; $76,77\pm 4,17$ vs $10,2\pm 2,33$; $71,33\pm 3,74$ vs $32\pm 2,93$; $p < 0.001$). Los E congelados-descongelados con TRISDMF no mostraron diferencias significativas en ninguno de sus parámetros cuando se los comparó con los valores obtenidos en los E congelados-descongelados con TRISO.

DISCUSIÓN

En este trabajo puede observarse que los EE y los E eyaculados felinos responden de igual forma al proceso de congelación-descongelación al utilizar un DIL TRISO o TRISDMF. Estos hallazgos concuerdan con lo observado por Tebet 2006 y Hermanson 2007, quienes no encontraron diferencias en los EE y los E eyaculados felinos congelados-descongelados con Tris (39, 40).

Nuestros resultados muestran que en contraposición con lo planteado en la hipótesis el agregado de 0,5% de DMF en reemplazo del glicerol no mejora la supervivencia espermática al descongelado. Nuestros hallazgos concuerdan con lo observado en caninos (41, 25). En contraposición con lo observado en nuestro trabajo en equinos y en aves (21, 13, 22, 42) se observó un efecto benéfico de la DMF sobre la supervivencia espermática al descongelado. Lo expuesto podría deberse a las diferencias encontradas en la composición lipídica de la membrana espermática en las diferentes especies (20).

Debido a que los efectos de los crioprotectores son especie-específicos (43, 44, 45), es

posible que los espermatozoides felinos requieran el reemplazo de un mayor porcentaje de glicerol por amidas para evidenciar los efectos benéficos del agregado de DMF al descongelado. Sin embargo la concentración de glicerol óptima para la supervivencia de los espermatozoides descongelados depende de varios factores, y puede ser influenciada por otros componentes del diluyente, por las tasas de enfriado y método de congelación-descongelación. Es así que estos factores también podrían influir en nuestros resultados y deben ser considerados en futuros experimentos.

Estudios donde se varíe la concentración y/o tipo de amida, son necesarios para determinar si las amidas mejoran la supervivencia espermática al descongelado en los felinos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Curry MR. Criopreservation on mammalian semen. *Methods Mol Biol.* 2007; 368: 303-311
2. Howard JG. Assisted reproductive techniques in nondomestic carnivores. In: Fowler ME, Miller RE, editors. *Zoo and wild animal medicine IV.* Philadelphia, PA: WB Saunders Co.; 1999; p 449-57.
3. Hay MA, Goodrowe KL. Comparative cryopreservation and capacitation of spermatozoa from epididymides and vasa deferentia of the domestic cat. *J Reprod Fert, Suppl* 1993; 47:297-305.
4. Pushett DA, Lacham-Kapln O, Gunn IM, Trounson AO. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) using epididymal sperm and in vitro -matured oocytes in domestic cat: A model for endangered species. *Theorogenology* 2000; 53:400 (abstract).
5. Axner E, Linde-Fosberg C. Mating and artificial insemination in Small animal reproduction and neonatology (eds) G. Simpson, G. C. England and M. Harvey, Cheltenham: BSAVA. 1998; pp. 105-111.
6. Bonaura MC, Praderio R, Tittarelli MC, Nuñez Favre R, Stornelli MA. Efecto de la adición de Dodecil Sulfato de Sodio a un diluyente Tris base sobre la supervivencia de espermatozoides epididimales post descongelación. XIII Jornadas de Divulgación Técnico Científicas, FCV - UNR. Segunda Reunión Conjunta UNL - UNR.2012.
7. Chatdarong Thuwanut P, Manee-In S, Lohachit C, Axner E. Effects of thawing temperature and post-thaw dilution on the quality of cat spermatozoa. *Anim Reprod Sci* 2008.
8. Mizutani T, Sumigama S, Nagakubo K, et al. Usefulness of addition of Orvus ES paste and sodium lauryl sulfate to frozen feline semen. *J Vet Med Sci.* 2010; 72(1):23-7.
9. Watson PF. Recent developments and concepts in the cryopreservation of spermatozoa and the assessment of their post-thawing function. *Reprod Fertil Dev* 1995; 7:871-91
10. Anchordoguy TJ, Rudolph AS, Carpenter JF, Crowe JH. Modes of interaction of cryoprotectants with membrane phospholipids during freezing. *Cryobiol* 1987; 24:324-331.

11. Armitage WJ. Osmotic stress as a factor in the detrimental effect of glycerol on human platelets. *Cryobiol* 1986; 23:116-125.
12. Crowe JH, Crowe LM, Carpenter JF, Aurell Wistram C. Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochem J* 1987; 242:1-10.
13. Gomes GM, Jacob JCF, Medeiros ASL, Papa FO, Alvarenga MA. Improvement of stallion spermatozoa preservation with alternative cryoprotectants for the Mangalarga Marchador breed. *Theriogenology* 2002; 58:277-9.
14. Hammerstedt RH, Grahan JK, Nolan JP. Cryopreservation of mammalian sperm: What we ask them to survive. *J. Androl.* 1990; 11:73-88.
15. Hempling HG, White S. Permeability of cultured megakaryocytopoietic cells of the rat to dimethylsulfoxide. *Cryobiol* 1984; 21:133-143.
16. Hammerstedt, R.H., Graham, J.K., 1992. Cryopreservation of poultry sperm: the enigma of glycerol. *Cryobiology* 29, 26-38.
17. Neidermeyer W, Parish CR, Moor H. Reactions of yeast cells to glycerol treatment. Alterations to membrane structure and glycerol uptake. *Protoplasma* 1977; 92:177-193.
18. Boggs JM, Rangaraj G. Phase transitions and fatty acid spin label behavior in interdigitated lipid phases induced by glycerol and polymyxin. *Biochim Biophys Acta* 1955; 816:221-233.
19. Aitken RJ, Wang YF, Liu J, Best F, Richardson DW. The influence of medium composition, osmolarity and albumin content on the acrosome reaction and fertilizing capacity of human spermatozoa: development of an improved zona-free hamster egg penetration test. *Int J Androl.* 1983; 6 2:180-93.
20. Lopes KRF, Costa LLM, Lima GL, Souza ALP, Silva, AR. Dimethylformamide is no better than glycerol for cryopreservation of canine semen. *Theriogenology* 2009; 72:650-654.
21. Alvarenga MA, Papa FO, Landim-Alvarenga FC, Medeiros ASL. Amides as cryoprotectants for freezing stallion semen: a review. *Anim Reprod Sci* 2005; 89:105-113.
22. Kashiwazaki N, Okuda Y, Seita Y. Comparison of glycerol, lactamide, acetamide and Dimethylsulfoxide as cryoprotectants of Japanese white rabbit spermatozoa. *J Reproduction Develop* 2006; 52:511-6.
23. Medeiros ASL, Gomes GM, Jacob JCF, Carmo MT, Papa FO, Alvarenga MA. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 2002; 58:273-279.
24. Dalimata AM, Graham JK. Cryopreservation of rabbit spermatozoa using acetamide in combination with trehalose and methylcellulose. *Theriogenology* 1997; 49:831-41.
25. Savignone CA, Gimenez F, Nuñez Favre, R, et al. Comparison of different concentrations of dimethylformamide on viability of frozen-thawed dog spermatozoa. 17th Brazilian Congress of Animal Reproduction Curitiva. Brasil 13 de mayo, 1 y 2 de junio de 2007. *Anales del congreso* pp175.
26. Petersen RG. Design and analysis of experiments. Marcel Dekker Inc. New York. 1985 p. 314.
27. Slatter D. Textbook of small animal surgery. In: Saunders W, editor. 2° ed. Philadelphia; 1993; 1325-1335.
28. Tittarelli CM, Savignone CA, Arnaudín E, Stornelli MC, Stornelli, MA, de la Sota RL. Effect of transport media and storage time on survival of spermatozoa recovered from canine and feline epididymides. *Theriogenology.* 2006; 66: 1637-1640.
29. Johnston DJ, Kuztritz MVR, Olson P. Canine and feline *Theriogenology.* WB Saunders. Philadelphia 2001; 287-306.
30. Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tsarik J. Distinction between true acrosomal reaction and degenerative acrosome loss by one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin. *J. Reprod. Fertil.* 1992; 95:755-763.
31. Harrison RAP, Vickers SE. Use of fluorescent probes to assess membrane integrity in mammalian spermatozoa. *J. Reprod. Fert.* 1990; 88:343-52.
32. Villaverde IA, Melo CM, Martin C, et al. Comparison of efficiency between two artificial insemination methods using frozen-thawed semen in domestic cat (*Felis catus*). *Artificial insemination in domestic cats.* *Anim Reprod Sci.* 2008, 21.
33. Luvoni CG. Gamete cryopreservation in the domestic cat. *Theriogenology* 2006; 66:101-111.
34. Giménez F, Stornelli MC, Tittarelli C, et al. Effect of melatonin implants on control of reproduction in the domestic cat (*Felis catus*). *Theriogenology,* 2006; 66: 681-682.
35. Stornelli MA. Basic and advanced evaluation of cat's semen. *Brazilian journal of animal reproduction,* 31(1), January/March 2007; p 135-140
36. Stornelli MA, Reyna JC, Stornelli MC, et al RL. Seasonal changes in testis cell morphology in male domestic cats (*Felis catus*). 6 Simposio internacional de Reproducción de caninos y felinos. Viena, Austria EVSSAR. 2008; 246-248.
37. SAS/STAT., S., User's Guide. Version 6, 4th Edition. SAS Inst. Inc. Cary, NC. 1989; p. 1684.
38. CIOMS. Council for International Organizations of Medical Sciences. International guiding principles for biomedical research involving animals. 1985
39. Hermansson U, Axner E. Epididymal and ejaculated cat spermatozoa are resistant to cold shock but egg yolk promotes sperm longevity during cold storage at 4 °C. *Theriogenology* 2007; 67:1239-1248.
40. Tebet JM, Martins M.I.M, Chirinea VH, Souza FF, Campagnol D, Lopes MD. Cryopreservation effects on domestic cat epididymal versus electroejaculated spermatozoa. *Theriogenology* 2006; 66:1629-1632.
41. Filho AC, Teles CHA, Jucá RP, et al. Dimethylformamide as cryoprotectant of canine semen diluted and frozen in ACP-106C. *Theriogenology* 2011; 76:1367-1372.
42. Medeiros ASL, Gomes GM, Jacob JCF, Carmo MT, Papa FO, Alvarenga MA. Cryopreservation of stallion

sperm using different amides. *Theriogenology* 2002; 58:273-769.

43. Holt WV. Fundamental aspects of sperm cryobiology: the importance of species and individual differences. *Theriogenology* 2000; 53: 47-58

44. Peña A, Linde-Forsberg C. Effects of Equex, one- or two step dilution, and two freezing and thawing rates on postthaw survival of dog spermatozoa. *Theriogenology* 2000; 54: 859-875.

45. Rota A, Milani C, Cabianca G, Martini M. Comparison between glycerol and ethylene glycol for dog semen cryopreservation. *Theriogenology* 2006; 65: 1848-1858.

ESTUDIO PRELIMINAR DEL BORDE DORSAL DEL CUELLO EN CABALLOS DE PURA RAZA COLOMBIANA EN CARACAS-VENEZUELA

Morales A, Méndez A, Pérez Arévalo J

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas.
Universidad de Córdoba. España.

RESUMEN: Se plantea como objetivo un estudio preliminar del borde dorsal del cuello en caballos de pura raza Colombiana en Caracas-Venezuela. Fueron estudiados un total de 57 caballos de esta raza, con edades entre 4 y 10 años, en Caracas, Venezuela. Todos ellos sometidos a ejercicio de moderada intensidad, a las mismas condiciones de alimentación y manejo. Se practicó un examen clínico mediante la inspección y palpación siguiendo el protocolo descrito para equinos. Se realizó un estudio morfológico considerando condición corporal y peso, siguiendo el protocolo de adiposidad descrito para equinos. Se midió la distancia de una línea recta desde la nuca a la cara craneal de la cruz. Se midió la circunferencia del cuello y por último se estudio el grado de correlación entre el peso, medidas del cuello (cresty neck score) y el grado de condición corporal mediante el test de Pearson. No se observaron lesiones cervicales, ni deformación del borde dorsal del cuello en los animales estudiados, excepto en un caso que sí presentó deformación leve de la región en estudio. El estudio morfológico del cuello evidenció: Puntuación 0.- ningún caballo bajo esta categoría. Puntuación 1.- 55/57 (96,4 %). Puntuación 2.- 1/57 (1,75 %), deformación grado 2 Puntuación 3.- 1/57 (1,75 %), deformación grado 3, Puntuaciones 4 y 5.- ningún caballo se observó bajo estas categorías. El promedio del diámetro del cuello para la Puntuación 1 fue de 84,56cm, DS: 3,57, Varianza: 12,57, el promedio de la longitud del cuello fue de 66,65 cm, DS: 4,75, Varianza: 22,15 y el peso promedio fue de 350,61 kg, DS: 11,34, Varianza: 126,30. El grado de correlación entre peso versus el diámetro cervical presentaron un coeficiente de correlación de 0,416 y para el grado puntuación del cuello (cresty neck score) y condición corporal se presento una correlación de 0,638.

PALABRAS CLAVES: caballos, cuello, deformación, Colombiano.

A PRELIMINAR STUDY OF DORSAL NECK EDGE IN HORSES OF PURE BREED COLOMBIAN IN CARACAS-VENEZUELA

ABSTRACT: The aim of this study was to a preliminary study of the dorsal edge of the neck in race Colombian in Caracas-Venezuela. Were studied a total of 57 horses of this breed, aged between 4 and 10 years in Caracas, Miranda State, Venezuela. They underwent exercise of moderate intensity, the same conditions of feeding and management. A clinical examination was performed by inspection and palpation following the protocol described for horses. Morphologic considering weight and body condition was performed following the protocol described for equine adiposity. The distance of a line from the neck to the cranial side of the crosshair was measured. Neck circumference the degree of correlation was measured and finally the study of weight, measure the neck (cresty neck score) and body condition by the Pearson test. No cervical lesions and deformation of the dorsal edge of the neck in the animals studied, except that if a case had mild deformation of the region under study was observed. Morphological study evidenced neck: Score 0 - no horse in this category. Score 1 - 55/57 (96.4 %). Score 2 - 1/57 (1.75 %), grade 2 rating deformation. 3 - 1/57 (1.75 %), grade 3 strain, Score 4 and 5 No horse was observed under these categories. The average diameter of the neck to the score 1 was 84.56 kg, DS: 3.57 Variance: 12.57, the average neck length was 66.65 cm, SD: 4.75, variance: 22.15 and the average weight was 350.61 cm, DS: 11.34, Variance: 126.30. The degree of correlation between weight versus cervical diameter showed a correlation coefficient of 0.416 and the grade point of the neck (cresty neck score) and body condition a correlation of 0.638 was presented.

KEYWORDS: horse, neck, deformation, Colombian.

Fecha de recepción: 20/11/13

Fecha de aprobación: 25/07/14

Dirección para correspondencia: A.Morales. Depto de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas, Campus de Rabanales Ctra. de Madrid km 396, 14071, Córdoba Universidad de Córdoba-España.

E-mail: amorales13@gmail.com

INTRODUCCIÓN

El caballo de Paso Colombiano, tiene sus orígenes en la época de la colonización de las Américas. Entre los españoles había un caballo pequeño, de andar suave, que denominaron "The Spanish Jennet", o sea, jaca española el cual las Cortes españolas, extinguieron pues cuando quisieron tener caballos para emplearlos en carrozas y carruajes lo cruzaron con ejemplares de sangre "fría" (sangre frizona), para lograr caballos más grandes (1, 2). Recientes estudios señalan cuatro linajes maternos principales que se encuentra en las dos razas de caballos colombianos; haplo grupo D, que es representativo de la población ancestral de caballos de la Península Ibérica, fue observado más a menudo en razas Colombianas (1). Teniendo en cuenta el origen del caballo de raza Colombiana en el caballo Ibérico, y que comparten algunas de sus características fenotípicas, podemos estudiar algunas afecciones en común como la deformación del borde dorsal del cuello. Esta alteración es un problema específico del Pura Raza Española (4); sin embargo ha sido descrito también en caballos de raza Lusitano y en algunos caballos cruzados con ambas razas. Así como en burros de raza andaluza (11) y en caballos de Carruaje (12). En la actualidad la resistencia a la insulina (IR), el síndrome metabólico equino (EMS) y la disfunción de la pars intermedia de la pituitaria (PPID), son trastornos que tienen en común una alteración del metabolismo de cortisol (9). Es comprensible que las causas subyacentes del síndrome metabólico equino y PPID pueden ser diferentes, los problemas clínicos resultantes son muy similares, incluyendo la deposición de grasa anormal (en la cresta del cuello, en la cola, y en escroto de caballos castrados) y laminitis (9). Esto se presenta típicamente en los caballos de mediana edad, a partir de 10-20 años de edad, además se observa con más frecuencia en diversas razas como Mustang, Españoles, Paso Peruano, Paso Finos, Andaluces, Warmbloods europeos, Saddlebreds americanos y en los caballos de Morgan (9). El cuello en el caballo de Pura Raza Colombiana según CONFEPASO 2013, debe ser de tamaño mediano, musculoso pero flexible, arqueado en su parte superior, lleno y acoplado en sus dos extremos, robusto y sin confundirse con grosor. Las crines son abundantes, ya sean estas lacias o rizadas, con el pelo fino y sedoso. Los defectos del cuello caído, el cual se aplica a los ejemplares que presentan flacidez muscular en el área del cuello (Artículo 8 Defectos Penalizables: Letra h.- Otros defectos penalizables (Confepaso, 2013) (13). En virtud de esta importante área de investigación y su repercusión en los concursos se plantea como objetivo un estudio preliminar del borde dorsal del cuello en caballos de pura raza Colombiana en Caracas-Venezuela.

MATERIALES Y METODOS

Fueron estudiados un total de 57 caballos (20 machos enteros y 37 yeguas), con edades comprendidas entre los 4 y 12 años, de pura raza Colombiana, en Caracas (Filas de Mariche y Los Teques) Estado Miranda-Venezuela. Todos los animales estaban sometidos a ejercicio de moderada intensidad y tiempo (recorrido de aproximadamente 20 km por semana), así como a las mismas condiciones de alimentación y manejo. Se practicó un examen clínico a cada uno de los ejemplares mediante la inspección y palpación siguiendo el protocolo descrito para equinos (5). Se realizó un estudio morfológico considerando condición corporal, peso (cinta torácica) y patrones de la raza. Se evaluó el borde dorsal del cuello siguiendo el protocolo de adiposidad (Cresty Neck Score), descrito para equinos (4, 6).

Puntuación 0: No hay apariencia visual de cresta (tejido sobre el ligamento de la nuca). No hay cresta palpable.

Puntuación 1.- No hay apariencia visual de cresta pero se puede palpar un ligero depósito adiposo.

Puntuación 2.- Cresta apreciable visualmente, pero el depósito graso se deposita equitativamente desde la nuca a la cruz. La cresta cabe en una mano y se inclina de un lado a otro.

Puntuación 3.- Cresta engrosada y más grande. La grasa se deposita mayoritariamente en el medio del cuello dando una apariencia del montículo. La cresta cabe en una mano y empieza a perder flexibilidad hacia los lados.

Puntuación 4.- Cresta muy grande y engrosada que no cabe en una mano o se mueve fácilmente de un lado a otro. La cresta puede tener arrugas o pliegues perpendiculares a la línea superior.

Puntuación 5.- La cresta es tan grande que se cae permanentemente hacia un lado.

La evaluación de la longitud del cuello fue realizada considerando la distancia de una línea recta desde la nuca a la cara craneal de la cruz. El diámetro del cuello se mide perpendicularmente a esta línea al 25, 50 y 75 % de la distancia entre estas dos estructuras. La circunferencia media del cuello se calculó mediante la media de estas tres medidas (7, 8). Se estudió el grado de correlación entre el peso, medidas del cuello (Cresty Neck Score) y el grado de condición corporal mediante el test de Pearson.

RESULTADOS

En relación al estudio clínico, las mucosas (oral y conjuntival) se observaron normales en todos los casos. No fueron evidenciados lesiones musculoesqueléticas, claudicaciones, ni signos de laminitis. Tampoco fueron evidenciados otros problemas en los cascos. No se observaron lesiones cervicales, ni deformación severa del borde

dorsal del cuello en los casos estudiados, excepto dos casos que presentaron deformación leve del borde dorsal del cuello.

El estudio morfológico del cuello evidenció:

Puntuación 0.- ningún caballo bajo esta categoría.

Puntuación 1.- 55/57 (96,4 %), deformación grado 1.

Puntuación 2.- 1/57 (1,75 %). Deformación grado 2,

Puntuación 3.- 1/57 (1,75 %), deformación grado 3,

Puntuaciones 4 y 5.- ningún caballo se observó bajo estas categorías.

El promedio del diámetro del cuello para la Puntuación 1 fue de 84,56 cm, DS: 3.57, Varianza: 12,57, el promedio de la longitud del cuello fue de 66,65 cm, DS: 4,75, Varianza: 22,15 y el peso promedio fue de 350,61 kg, DS: 11,34, Varianza: 126,30.

Los resultados estadísticos del peso versus el diámetro cervical presentaron un coeficiente de correlación de 0,416 y para el grado puntuación del cuello (cresty neck score) y condición corporal se presentó una correlación de 0,638.

DISCUSIÓN

El borde dorsal del cuello es un foco importante desde el punto de vista de la evaluación fenotípica en los caballos de Pura Raza Colombiana, así como también es posible asiento de la afección denominada "deformación del borde dorsal del cuello". En caballos de Raza Colombiana, Paso Fino, Trotón y Galope han sido observados casos de deformación del borde dorsal del cuello y los caballistas relacionados comentan cotidianamente la presencia del "cuello caído" o "cuello de gato" en estos animales, cuyo defecto es motivo de la eliminación como semental y motivo de penalización de los concursos de esta raza, sin embargo no ha sido informado en la literatura. La adiposidad regional del cuello puede estar asociada con estados metabólicos alterados, incluyendo la resistencia a la insulina y un mayor riesgo de padecer laminitis (8, 10, 14). La evaluación de adiposidad del borde dorsal del cuello (Cresty Neck Score), es un método empleado comúnmente para la evaluación de la obesidad en caballos y puede ser usado como una variable predictiva para el desarrollo del síndrome metabólico equino, resistencia a la insulina y disfunción de la pars intermedia de la pituitaria. En nuestros resultados observamos la prevalencia de animales en la categoría 1, un caso que presentó categoría 2 y un caso en la categoría 3 con ligera deformación del borde dorsal del cuello. La deformación del borde dorsal del cuello es un problema raza específico del Pura Raza Española (4), y actualmente ha sido descrito en otras razas como la Lusitano y también en algu-

nas cruzas de ambas razas e inclusive en burros de raza Andaluza (11). La condición corporal de los animales utilizados en este trabajo, tuvo un promedio entre la puntuación 3/5, por lo que no se evidenciaban signos de obesidad ni excesivos depósitos de grasa en el borde dorsal del cuello. La intensidad y tiempo del ejercicio pueden jugar un rol significativo en la condición corporal y por ende, de alguna manera, disminuir el riesgo de la deformación del borde dorsal del cuello. En relación a las medidas del cuello, en la mayoría de los casos fueron similares a las descritas para el fenotipo de la raza, así como también la variable peso que fue compatible con el estándar racial. No se observó diferencia significativa en cuanto al sexo ni a la edad.

En conclusión no se observaron lesiones compatibles con la deformación del borde dorsal del cuello en caballos de pura raza Colombiana. Sin embargo fue observada una alta correlación entre las variables cuello obeso y condición corporal. Son necesarios estudios multidisciplinarios considerando la etiología, patogenia, epidemiología, incidencia y otros factores asociados, así como su impacto económico en caballos de Pura Raza Colombiana.

BIBLIOGRAFÍA

1. Mercedes-Jimenez L, Mendez S, Dunner S, Cañon J, Cortez O. Colombian Creole horse breeds: Same origin but different diversity. *Genetics and Molecular Biology*, 2012; 35, 4, 790-796.
2. <http://www.fedequinas.org/comunicados/biblioteca-virtual/114-origen-del-caballo-en-nuestras-tierras.html>
3. Gomez A. Caracterización morfométrica y molecular de las razas equinas: Paso Fino Colombiano y Trocha Colombiano. Universidad Nacional de Colombia; 2006.
4. Ruiz López, I, Armengou, L, Chamizo, V, Valdés, M, López Rivero, J. Deformación del borde dorsal del cuello en caballos de pura raza española: incidencia y aspectos clínicos. *Equinus: publicación de información y práctica veterinaria equina*, 2010; X (26).
5. Rose, R.J., Hodgson, D. Manual of equine practice. WbSanders.Companny, Harcourt Brace Jovanovich.Inc. Philadelphia, Pennsylvania, U.S.A. 1995; p. 130-132.
6. Carter RA, Geor RJ, Staniar WB. Apparent adiposity assessed by Standardised scoring systems and morphometric measurements in horses and ponies. *Vet J* 2009; 179 (2): 204-210.
7. Frank N, Elliot SB, Brant LE and Keisler DH. Physical characteristics, blood hormone concentration, and plasma lipid concentrations in obese horses with insulin resistance. *J Am Vet Med Assoc*; 2006; 228 (9): 1983-1390.
8. Diez de Castro E, Pineda Martos C, Martin Cuervo M, Quintero Felices S, Méndez Vazquez N, Aguilera Tejero E. Valoración de obesidad y resistencia a la insulina en el Caballo de Pura Raza Española (PRE). *Equinus* 2012; 34 Tercer Cuatrimestre: 58-75

9. Graves E. Endocrine Diseases, 2010; Aug 22nd, 07. AAEP.
10. Johnson PJ. The equine metabolic syndrome peripheral Cushing's syndrome. Vet Clin North Am Equine Pract 2002; 18 (2): 271-293.
11. Morales A, Méndez A, Perez J, Lamprea A, Garcia A, Diaz M. Estudio clínico patológico de la deformación del borde dorsal del cuello en burros (*Equus asinus*) de raza Andaluza. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias; 2014, 8(1): 1-9.
12. Morales A, Méndez A, Perez J. Estudio clínico y morfológico de la deformación del borde dorsal del cuello en caballos cruzados de carruaje en Sevilla y Córdoba Andalucía, España. Revista Complutense de Ciencias Veterinarias; 2014, 8 (2): 9-17.
13. Reglamento Confepaso. 11º Mundial Caballos de Paso, Miami, Florida, 2013.
14. Treiber KH, Kronfeld DS, Hess TM. Evaluation of genetic and metabolic predispositions and nutritional risk factors for pasture-associated laminitis in horses. J Am Vet Med Assoc 2006; 228(16):1538-1545.

RELEVAMIENTO DE FACTORES DE RIESGO EN LA FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Bover J¹, Bonzo E², Vanini M³, Ginart S⁴

¹ Prosecretaría de Gestión de Calidad.

² Epidemiología Básica. ^{1,2, 3 y 4} Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata

Resumen: El conocimiento de los factores de riesgo existentes en la FCV UNLP, representa la instancia inicial para abordar la cuestión de la bioseguridad y la seguridad laboral asociada al ejercicio profesional del médico veterinario. Con el objetivo de recolectar información se implementó una matriz cuali-cuantitativa (1) que permitió identificar, calificar y cuantificar según nivel de riesgo y peligro a cada factor. El instrumento agrupó a los factores como: biológicos, químicos, traumáticos y físicos. Se constató una alta participación, representada por el 80,64% de las unidades de análisis. El 68% de las áreas presenta factores de riesgo alto, el 12% de riesgo moderado, y el 20% de riesgo con potencialidad catastrófica. El 80% presenta factores de riesgo químico de moderado a con potencialidad catastrófica. El 44%, de riesgo traumático de moderado a alto. El 32%, factores de riesgo físico de moderado a alto y el 28%, factores de riesgo biológico de moderado a alto. En el 52% conviven dos o más tipos de riesgos calificados de moderado a con potencialidad catastrófica. Como conclusión, se debe continuar con el relevamiento de aquella información que vincule la existencia de los factores ya identificados con las condiciones de manejo requeridas específicamente para cada factor.

Palabras claves: relevamiento – instrumento metodológico - factores de riesgo.

SURVEY OF RISK FACTORS IN THE FACULTY OF VETERINARY SCIENCES, NATIONAL UNIVERSITY OF LA PLATA

Abstract: Risk factor awareness at the Faculty of Veterinary Sciences represents the first step to wards improving biosecurity and safety in the work place for veterinarians. In order to collect formation, a quali and quantitative survey was implemented which allowed identification and classification of risks according to level and degree of danger. Risk factors were classified as biological, chemical, traumatic or physical. Participant involvement was high (80,9% of analysis units). 12% of analysis units presented high risk factors, 68% had high risk factors and 20% had potentially catastrophic risk factors. 80% of analysis units reported moderate to potentially catastrophic chemical risk factors, 44% had moderate to high traumatic risk factors, 32% had moderate to high physical risk factors and 28% had moderate to high biological risk factors. Two or more types of moderate to high risk factors are present in 52% of analysis units. It is necessary to continue with collection of information related to the identified risk factors in order to establish adequate management practices for each situation.

Keywords: survey - methodological tool - risk factor

Fecha de recepción: 29/08/13

Fecha de aprobación: 20/01/14

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

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

INTRODUCCIÓN

Históricamente, la práctica del médico veterinario se ha caracterizado por la exposición a factores de riesgo (2). Los diversos campos del quehacer profesional se desarrollan en escenarios de diferentes características. Así, la labor del veterinario abarca desde lugares en los que se desarrolla la actividad productiva a campo, hasta un laboratorio de diagnóstico microbiológico o un hospital en el caso del ejercicio de la clínica, sólo para ejemplificar. Igualmente, diversas son las particularidades de cada uno de estos lugares según los niveles de adecuación a las condiciones establecidas por la normativa vigente.

Las facultades de ciencias veterinarias en nuestra región no están ajenas a la problemática que se deriva de convivir laboralmente con la exposición a factores de riesgo. En este sentido, actualmente se encuentran intensificando procesos de revisión de los niveles de bioseguridad y seguridad laboral asociada al ejercicio profesional. Así, en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) se llevó a cabo una caracterización de los factores de riesgo como punto de partida hacia el análisis de riesgo planteado en términos amplios, es decir incluyendo los aspectos referidos al manejo y contexto en el que se sitúa cada agente o factor de riesgo.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) (3) se refiere a los *factores de riesgo* como cualquier rasgo, característica o exposición de un individuo que aumente su probabilidad de sufrir una enfermedad o lesión. El *peligro*, por su parte, se define como la “fuente o situación potencial de daño en términos de lesiones o efectos negativos para la salud de las personas, daños a la propiedad, daños al entorno del lugar de trabajo o una combinación de éstos” (4) Es por ello que, como elemento complementario con el ejercicio de la bioseguridad, surge el *análisis de riesgo* (5) descrito como “el proceso que permite identificar los peligros y determinar la probabilidad de ocurrencia de un suceso, constituyendo la piedra angular para desarrollar el proceso de toma de decisiones, sobre la base de conocimientos científicos y de la información más actualizada y que se utiliza para elaborar una estimación de los riesgos para la salud y la seguridad, e identificar y aplicar medidas adecuadas para controlar los riesgos y comunicarse con las partes interesadas para notificarle los riesgos y medidas aplicadas” (6)

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el relevamiento (7 y 8) de factores de riesgo se identificaron, en primera instancia, las áreas de la Facultad con presencia de factores de riesgo. Una vez determinadas, se aplicó una matriz diseñada para tales fines, con que se in-

dagó acerca de la existencia por área de factores (9). Éstos se clasificaron según fuesen biológicos, químicos, físicos o traumáticos y se calificaron por su nivel de peligrosidad. Para esta evaluación se utilizaron los siguientes parámetros: para los agentes biológicos, la clasificación de 1 a 4 establecida por el Manual de Bioseguridad de la OMS (2005) (10), de menor a mayor riesgo respectivamente; en el caso de los factores químicos, se tomaron de referencia las hojas de seguridad (11 y 12) de cada uno; para los traumáticos y los físicos, una escala de tipo cualitativa estableciendo niveles de peligro bajo, medio y alto y una breve reseña sobre las características del mismo.

Si bien el carácter del relevamiento fue obligatorio y autoadministrado (13), se asistió técnicamente a los involucrados que lo requirieron.

La matriz fue remitida desde la Prosecretaría de Gestión de Calidad (PGC) y a través de las direcciones de los Departamentos hacia las áreas con presencia de factores de riesgo. En el caso de las áreas no comprendidas por Departamentos, fue remitida en forma directa desde la PGC.

Se identificaron un total de 31 áreas, denominadas unidades de análisis (14), y el relevamiento y sistematización de información se realizó entre octubre de 2012 y agosto de 2013.

Las unidades de análisis incluyeron a la totalidad de los cursos, laboratorios y áreas de servicio de la facultad, espacios de trabajo de docentes, no docentes y técnicos. Al momento del relevamiento, el universo en estudio estaba comprendido por 713 personas divididas en dos grandes grupos: los no docentes (178), y los docentes (535).

Los niveles utilizados para clasificar las áreas según el riesgo fueron: bajo, moderado, alto y con potencialidad catastrófica. El criterio de clasificación se estableció de acuerdo al tipo de riesgo que representa mayor peligrosidad registrado en cada una de las áreas, donde pueden convivir dos o más tipos de factores.

Es oportuno resaltar que en la matriz de relevamiento hubo tres clasificaciones previstas para los factores de tipo químico. Al momento de sistematizarlos, se incorporó una cuarta categoría debido a la condición de que sean potencialmente explosivos, como es el caso del ácido pírico.

RESULTADOS

Al momento del relevamiento, de las 31 unidades de análisis identificadas se recibió información de 25. Éstas representan el 80,64% del total de unidades de análisis de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UNLP.

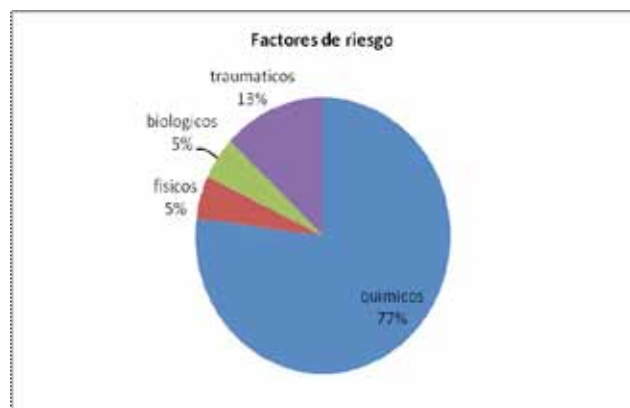
De las áreas relevadas, el 68% corresponde a riesgo alto, el 12% a riesgo moderado, el 20% a riesgo con potencialidad catastrófica (Ver cuadro).

Áreas con presencia de factores de riesgo de moderado a potencialmente catastrófico			
Unidades de análisis	Cantidad de tipos de factores (Mod. / Pot. Catastr.)	Factor de riesgo. cantidades	calificación del área*
Inmunología Veterinaria	1	Químicos= 2	Riesgo Alto
Lab. De Inmunoparasitología	1	Químicos= 11	Riesgo con potencialidad catastrófica
Parasitología	1	Químicos= 11	Riesgo Alto
Alimentos	2	Químicos= 21 Físicos= 2	Riesgo con potencialidad catastrófica
LADIB	2	Químicos= 20 Físicos= 1	Riesgo con potencialidad catastrófica
Bovinos y Carne	1	Químicos= 2	Riesgo Alto
Aves y Pilíferos	4	Químicos= 7 Biológicos= 3 Traumáticos= 2 Físicos= 1	Riesgo Alto
Genética General	2	Químicos= 4 Traumáticos= 2	Riesgo Alto
Genética Veterinaria	1	Traumático= 1	Riesgo Moderado
Producción Equina	1	Traumático= 1	Riesgo Moderado
Histología y Embriología	1	Químicos= 6	Riesgo con potencialidad catastrófica
Anatomía	1	Químico= 6	Riesgo Alto
Patología General Veterinaria	1	Químico= 1	Riesgo Alto
Patología Especial	2	Químico= 9 Biológicos= 1	Riesgo con potencialidad catastrófica
Farmacología Especial y Toxicológica	2	Químicos= 4 Biológicos= 1	Riesgo Alto
Farmacología General	2	Químicos= 3 Traumático= 2	Riesgo Alto
Cirugía I	1	Traumático= 2	Riesgo Moderado
Microbiología Aplicada	1	Químicos= 4	Riesgo Alto
Microscopía Electrónica	1	Químicos= 3	Riesgo Alto
Lab. Central del Hosp. Escuela	4	Químicos= 13 Biológicos= 1 Traumáticos= 2 Físico= 1	Riesgo Alto
Radiología	2	Traumático= 1 Físico= 1	Riesgo Alto
Cirugía	4	Químicos= 5 Biológicos= 2 Traumáticos= 6 Físico= 2	Riesgo Alto
Hosp. De Grandes Animales	4	Químicos= 5 Biológicos= 1 Traumáticos= 4 Físico= 1	Riesgo Alto
Cardiología	2	Biológicos= 1 Traumáticos= 1	Riesgo Alto
Virología	2	Químicos= 11 Físicos= 1	Riesgo Alto

Referencias: Mod. : Moderado Pot. Catastr.: Potencialidad catastrófica. *calificación del área en función del factor de riesgo que presenta mayor peligrosidad.

Al analizar los factores de riesgo, se observa que los factores de riesgo químicos son los notificados con mayor frecuencia, seguidos por los traumáticos y en menor frecuencia los biológicos y físicos (Figura 1)

Figura 1: Grupos de factores de riesgo.

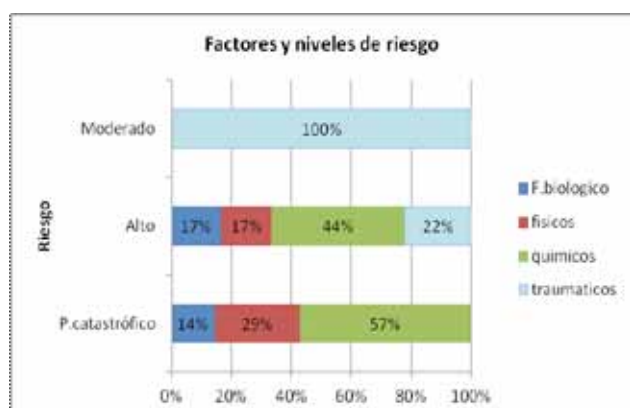


El 80 % de las áreas presenta factores de riesgo químico de moderado a potencialmente catastrófico. El 44 % presenta factores de riesgo traumáticos de moderado a alto. El 32 % presenta factores de riesgo físico de moderado a alto y el 28 % presenta factores de riesgo biológico de moderado a alto.

A su vez, en el 52 % de las áreas conviven dos o más tipos de riesgos calificados de moderado a potencialmente catastrófico.

También se observa que en las áreas de riesgo moderado, el factor traumático es el preponderante, y en las potencialmente catastróficas, el factor de riesgo preponderante es el químico.

Figura 2: Factores y niveles de riesgo.



DISCUSIÓN

Si bien el porcentaje de áreas con riesgo alto es muy importante (68 %), cabe destacar que la medición abarcó únicamente los factores y/o agentes entendidos en términos absolutos. De esta manera, no se consideró en la valoración

del riesgo el contexto determinado por prácticas laborales, medidas específicas en materia de bioseguridad o seguridad laboral, condiciones edilicias y equipamiento, entre otros.

El carácter cuali-cuantitativo del estudio posibilitó cuantificar e identificar los factores en cada unidad de análisis; de esta forma se pudieron establecer las escalas valorativas sobre los niveles de riesgo y el peligro consecuente. Sin embargo el relevamiento no apuntó a establecer cantidades, cuando el factor es cuantificable como en el caso de los productos químicos o biológicos, o a establecer las frecuencias de exposición.

En relación a la evaluación del instrumento utilizado, y tomando en consideración el alto nivel de participación, se evidenció que si bien a priori el instrumento pudo percibirse complejo debido a la extensa información de referencia adjuntada, de las 25 áreas que respondieron, todas completaron la información referida a la cuantificación e identificación de los factores. La matriz contemplaba una indagación pormenorizada para la valoración del nivel de riesgo de cada agente, en este sentido, no siempre fue resuelta acabadamente por las áreas y la información faltante fue relevada desde la PGC, cumpliéndose finalmente el objetivo primordial del instrumento.

Como conclusión, en primera instancia es necesario abordar el estudio de la potencialidad de riesgo de determinadas prácticas, por ejemplo quirúrgicas o clínicas, en las cuales no se puede descartar a priori la existencia de un determinado agente biológico pero tampoco puede asegurarse su presencia. Asimismo, se debe continuar con el relevamiento que vincule la existencia de los factores con las condiciones de manejo requeridas específicamente para cada factor que implique determinado nivel de riesgo, entendiendo dentro del mismo a las prácticas laborales, las condiciones edilicias y de depósito, y el nivel de conocimiento específico de los manipuladores y del personal expuesto. Finalmente, y en este sentido, establecer cantidades promedio de productos químicos y biológicos cuando corresponda, y frecuencia de exposición a agentes, entre otros aspectos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arias Valencia MM. La triangulación metodológica: sus principios, alcances y limitaciones. Invest. Educ. Enferm, 2000. 18 (1):13-26.
2. Álvarez ET, Larrieu EJ, Cavagión LJ. Riesgo Profesional del Veterinario en Argentina Informe Preliminar. Rev. Med. Vet. 1989; 70: 102 -105.
3. OMS. Definición de factores de riesgo. Recuperado el 9 de septiembre de 2012 http://www.who.int/topics/risk_factors/es/
4. Norma OSHAS 18001. Sistemas de Gestión de la Prevención de Riesgos Laborales. 1999.
5. Pelegrino AE, Aramis Fernández L, Rodríguez García

J. Bover y col.

- O. Actualidades sobre el análisis de riesgo biológico. Ed. Consejo Científico Veterinario de Cuba. 2011.
6. OMS El Informe sobre la salud en el mundo. 2007.
7. Ander-Egg E. Métodos y Técnicas de Investigación Social IV. Técnicas para la recogida de datos e información. Ed. Lumen. Buenos Aires, Argentina. 2003.
8. Martínez SL, Rojas GG, Mauro MS. En torno de las metodologías: Abordajes Cualitativos y Cuantitativos, Ed. PROA XXI Buenos Aires, Argentina. 2003.
9. Bover J. Condiciones de bioseguridad y percepción del riesgo: hacia la construcción de un mapa de riesgo en la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Rev. Analecta Veterinaria, 2012. 32, 2:37-43.
10. OMS. Manual de Bioseguridad en el Laboratorio, 3ª Edición. Ginebra Suiza. 2005.
11. Canadian Centre for Occupational Health and Safety. Chemical and product safety. Canadá. Recuperado en febrero de 2014. http://www.ccohs.ca/keytopics/chem_safety.html.
12. COATEA. Entendiendo una hija de seguridad. México. Recuperado en febrero de 2014. <http://www.profepa.gob.mx/innovaportal/file/212/1/HDS.pdf>
13. Rubio MJ, Varas J. El Análisis de la Realidad en la Intervención Social. Métodos y Técnicas de Investigación. Ed. CCS. Madrid, España. 1997.
14. Cea D´Ancona MA. Metodología cuantitativa: Estrategias y técnicas de investigación social, Madrid, Ed. Síntesis. 1999.

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 \$ 150 (o 50 U\$S si el lugar de trabajo del primer principal proviene del exterior) hasta 5 hojas (publicadas) y \$ 150 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@fvc.unlp.edu.ar

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