

ANALECTA VETERINARIA



45
Aniversario

Fundada en 1883

Publicación de la
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA





Universidad Nacional de La Plata
Facultad de Ciencias Veterinarias

Autoridades

Decano

Dr. Edgardo Nosetto

Vicedecano

Bac. Reinaldo Fonrouge

Secretario Académico

Méd.Vet. Enrique Félix Costa

Secretario de Postgrado

Dra. Pilar Peral García

Secretario de Extensión Universitaria

Dr. Jorge Romero

Secretario de Ciencia y Técnica

Ing.Zoot. Fernando Noel Dulout

Secretaria de Bienestar Estudiantil

Méd.Vet. Fernando Marino

Prosecretaria de Gestión de Calidad

Dra. María Gabriela Echeverría

ANALECTA VETERINARIA

Director

Dr. Nestor Oscar Stanchi

Editor Responsable

Dr. Eduardo Marotta

Secretario de Redacción

Méd. Vet. Daniel O. Arias

Comité Editorial

(Facultad de Ciencias Veterinarias)

Dra. Liliana Lagrecca

Dr. Eduardo Gimeno

Bact. Carlos Gómez

Dr. Florestán Maliandi

Dr. Pablo E. Martino

Méd.Vet. Enrique Pennimpepe

Dra. Pilar Peral García

Dr. Carlos Perfumo

ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 24 n° 1, 2004

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

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

Consultores:

L. Basso (Argentina), F. Capano (Uruguay), A. Conigliaro (Argentina), L. Estol (Argentina), E. Montero Gei (Costa Rica), A. Parma (Argentina), R. A. Fernández (Argentina), J. Lasta (Argentina), L. Rodríguez Roque (Costa Rica), A. Fernández Alosa (Brasil), H. Tersolo (Argentina), J. Zorzópolos (Argentina), E. Gimeno (Argentina), C. Schenk (Argentina), E. Coppos (Argentina), L.M. Friche Passos (Brasil), J.M. Gutiérrez (Costa Rica), R. Cacchione (Argentina), F. Cortés Benavides (España), M. Carballo (España), R.M. Dauder (España), R. de Torres (Argentina), P. Ostrosky-wegman (España), J. Surralles Calonge (España), N. Auza (Argentina), M. Barrandeguy (Argentina), M. Carballo (Argentina), J.A. Coppo (Argentina), C. Corbellini (Argentina), F. Costa (Argentina), C. Eddi (Argentina), A. Fosatti (Argentina), E. Gentilini (Argentina), S. Gómez Cabrera (Argentina), C. Gómez Dumm (Argentina), J. González Tomé (Argentina), A. Guglielmone (Argentina), I. von Landzewitsch (Argentina), N. Leardini (Argentina), L. León Vizcaino (España), C.Lerena (Argentina), H. Molinuevo (Argentina), E. Moras (Argentina), S.J. de Oliveira (Brasil), J. Pereira (Argentina), J. Pistani (Argentina), B. Ruksan (Argentina), B. Rutter (Argentina), E. Smitsaart (Argentina), J. Troiano (Argentina), C. Carfagnini (Argentina), J. de Filippo (Argentina), C. Machado (Argentina), I. Sommerfelt (Argentina).

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.

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, of extension and of distance education that they are developed in this College.

ISSN 1514259-0 Versión Electrónica

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 actual o a crearse del material impreso en esta revista sin el consentimiento expreso del Editor. Autorizada la reproducción con fines académicos-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 mediante el protocolo de traslado de archivo (File Transfer Protocol) (FTP anónimo). Los números de la revista a partir del Volumen 18 están disponibles en formato de archivo: pdf (Portable Document File-Adobe Acrobat Reader®) siendo idéntica a la versión impresa de la revista y puede 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.

Dirección electrónica:

Puede recuperar la revista accediendo a la página en la Web
www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html

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

Si tiene dificultades para recuperar la revista electrónicamente envíe un mail a:

sgcorva@fcv.unlp.edu.ar

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>)

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 Veterinaria (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 Veterinaria (CD-ROM)* 2001; 21,1: 54-57 (4 pantallas).

ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l'-ek-t&

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

Impresión

Facultad de Ciencias Veterinarias
Universidad Nacional de La Plata
CC296 (B1900AVW) La Plata,
Buenos Aires, Argentina

Diseño

Prof.Dr. Nestor Oscar Stanchi

Diseño de Tapa

Lic. Andrea López Osornio

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 24 n° 1, 2004

Artículos de Investigación

Research articles

EFFECTO DEL ORDEÑE PARCIAL DURANTE EL AMAMANTAMIENTO SOBRE LA PRODUCCIÓN LÁCTEA DE CABRAS DE PARICIÓN SIMPLE. Partial milking effect on single parturition goats milk production. R Lacchini, M Calvetty Ramos, MG Muro, C Cordiviola, A Antonini 7-10

MÉTODO DE TIPIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE MUESTRAS DE ORINA: SU UTILIDAD EN LA RESOLUCIÓN DE CASOS DE DOPING POSITIVOS EN EQUINOS. DNA typing method from urine samples: Its application in equine positive doping cases. EE Villegas-Castagnasso, V It, S Díaz, JP Lirón, A Rogberg, ME Kienast, MV Ripoli, CR Maderna, P Peral-García, G Giovambattista 11-13

EVALUACIÓN DE LAS LESIONES MICROSCÓPICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE TRÁQUEAS DE POLLITOS INOCULADOS CON *Mycoplasma gallisepticum*. Microscopic and ultrastructural evaluation of tracheal lesions in chickens induced by *Mycoplasma gallisepticum*. MA Petruccelli, MV Píscopo, MF Unzaga, RO Cerdá, FP Marino. 14-17

Comunicaciones breves

Short communications

INVESTIGACIÓN DE LEPTOSPIRAS EN AGUAS DE LAGOS DEL ZOOLOGICO DE LA PLATA, ARGENTINA. Research of leptospiras in water-lake from the zoo of La Plata, Argentina. M Gatti, D Arias, C Rosetti, S Selva, J Copes, R Laplace, P Martino, K Pellicer, N Stanchi. 18-20

ECOCARDIOGRAFIA DOPPLER COLOR Y EVALUACIÓN DEL GRADO DE INSUFICIENCIA MITRAL CANINA. Color doppler echocardiography diagnosis in canine mitral disease. D Arias, M Tórtora, A Cruz, L Klima, M Huzman, R Rodríguez. 21-24

PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS PARA LA INVESTIGACIÓN DE *Corynebacterium kutscheri* Y *Bordetella bronchiseptica* EN ANIMALES DE LABORATORIO MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROAGLUTINACIÓN DIRECTA EN PLACA. Antigens and antibodies production of *Corynebacterium kutscheri* and *Bordetella bronchiseptica* for diagnosis by using direct microagglutination technique in laboratory animals JM Laborde, P Cagliada, C Carbone. 25-28

Informaciones

Notes

Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication Updated November 2003 29-46

EFFECTO DEL ORDEÑE PARCIAL DURANTE EL AMAMANTAMIENTO SOBRE LA PRODUCCIÓN LÁCTEA DE CABRAS DE PARICIÓN SIMPLE

R Lacchini, M Calvetty Ramos, MG Muro, C Cordiviola, A Antonini

Introducción a la Producción Animal. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.
Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: *En el presente trabajo se analiza el efecto del ordeño y amamantamiento simultáneo en hembras con parto simple, versus aquellas de parto simple y las de parto múltiple sin ordeño, sobre la producción de leche y el peso de las crías. Después del parto 31 cabras criollas fueron separadas en tres grupos, G1: hembras de parto simple, G2: hembras de parto simple y ordeño y G3: hembras melliceras. Se observaron diferencias significativas solamente en el volumen de leche a los 46 días entre G1 y G2 ($P < 0,05$). No hubo diferencias significativas entre G1 G2 in el peso de las crías. Las hembras de parto simple con ordeño (G2) producen un volumen de leche similar al de las hembras melliceras (G3) y el peso de las crías fue similar al obtenido a partir de hembras de parto simple (G1). Estos resultados muestran que las hembras de parto simple pueden incrementar su producción de leche sin modificar los pesos al destete de sus crías.*

Palabras claves: Cabra Criolla, producción de leche, ordeño parcial

PARTIAL MILKING EFFECT ON SINGLE PARTURITION GOATS MILK PRODUCTION

ABSTRACT: *Creole goats breeding twins produce higher level of milk than those breeding singles. We analyze the effect of milking in females with singles on milk production and kid weights. After parturition 31 creole goats were separated into three groups, G1: breeding singles, G2: breeding singles and milking, G3: breeding twins. There were significant differences only in milk volume at 46 days between G1 y G2 ($p < 0.05$). There were no significant differences between G1 y G2 in kid weights. Milking females with singles (G2) produce similar volume of milk as females with twins (G3) and kid weight was the same as that produced by females breeding singles (G1). These results show that milking females with singles could increase their milk production without modifying the weaning weights.*

Key words: creole goat, milk production, partial milking

Fecha de recepción: 29/10/02

Fecha de aprobación: 02/04/04

Dirección para correspondencia: R Lachini, Introducción a la Producción Animal, Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. DIRECCIÓN:

E-mail: izootecnia@ceres.agro.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la actividad caprina en la República Argentina se basó en la producción de carne a partir de cabras criollas en zonas áridas y semiáridas de la región noroeste y centro oeste del país. Los productores tradicionales realizan un aprovechamiento eventual de la leche que excede a la crianza del cabrito para la fabricación de quesillos artesanales, ya sea para autoconsumo o para venta (1, 2). El producto principal de este tipo de establecimientos es el cabrito lactante que se faena a los 35 a 45 días de edad.

En la región Pampeana, no se encuentra difundido este tipo de explotación, estando los establecimientos relevados dedicados a la producción de leche, utilizando razas específicas para tal fin.

La producción de leche no depende solamente del potencial genético, sino también del manejo, la alimentación, el estado sanitario, la época, etc (3, 4, 5). El número de crías por parto influye también en la producción de leche, ya que las cabras de partos múltiples producen más cantidad de leche que aquellas que paren un solo cabrito (6). El porcentaje de mellizos se va incrementado a medida que aumenta la edad de la cabra (7). Al analizar los datos presentados por Fernández (6), se verifica que cabras que crían mellizos producen un 26% más de leche que aquellas que amamantan una sola cría. Asimismo, un tercer ordeño suplementario a media jornada permite aumentar la producción de leche en un 10% respecto de dos ordeños (8).

Las cabras que tienen un cabrito al pie podrían producir una mayor cantidad de leche en el caso de criar dos individuos. Si se realizara un ordeño parcial a hembras con una sola cría podría expresarse este potencial en un aumento de su productividad.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de un ordeño parcial durante el amamantamiento sobre la producción láctea y el peso de las crías en cabras de parición simple.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 31 cabras criollas pertenecientes al hato de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP mantenidas en condiciones de pastoreo controlado y suplementación alimenticia hasta cubrir los requerimientos nutritivos, según el programa de alimentación "Violeta". Las mismas fueron divididas en 3 grupos, el primero

(G1) compuesto por 8 animales de partos simples que mantuvieron la cría al pie realizándose una crianza tradicional; al segundo grupo (G2) integrado por animales de parto simple, se les realizó un ordeño parcial diario, obtenido mediante la separación del cabrito por un lapso de 6 h, no destinándose la leche obtenida a la alimentación de la cría; el tercer grupo (G3) formado por 15 cabras de parto doble que criaron a sus cabritos al pie hasta el momento del destete.

Se realizaron controles de la producción láctea de todos los animales del ensayo a los 22 y 46 días de lactancia. La producción de leche fue evaluada mediante 2 ordeños con intervalos de 12 h, previo aparte de la totalidad de los cabritos, registrándose el volumen de producción diario de leche y el porcentaje de grasa. También se controló el peso de las crías a los 15, 30 y 45 días de edad, calculándose las ganancias diarias de peso entre dichos periodos. La comparación de la performance productiva entre los grupos mencionados se realizó a través del análisis de varianza.

RESULTADOS

En la Tabla 1 se observan los valores medios y desvíos estándar de la producción láctea y el porcentaje de grasa butirosa.

La mayor producción diaria de leche se observó en las cabras de parición simple que fueron estimuladas mediante el ordeño, no encontrándose diferencias significativas entre éstas y las cabras de parto doble ($P > 0,05$). Las cabras de partos simples a las que se les realizó el ordeño suplementario arrojaron, a los 46 días de lactancia, valores de producción de leche significativamente superiores a las cabras de parto simple sin ordeño suplementario o que criaron en forma tradicional a sus crías ($P < 0,05$). Los valores de grasa butirosa no presentaron diferencias significativas para ninguno de los grupos analizados ($p > 0,05$).

En el ordeño parcial se obtuvieron valores promedio de 165 ml a los 22 días y 292,5 a los 46 días.

En la Tabla 2 se observan los valores medios y los desvíos estándar del peso de los cabritos a los 15, 30 y 45 días de edad para los tres grupos analizados.

Se observan pesos significativamente inferiores en los cabritos de parición doble respecto de los de parición simple a los 15, 30 y 45 días. Igual efecto se visualiza en las ganancias de peso hasta los 45 días.

Tabla 1. Medias y desvíos estándar de la producción de leche y porcentaje de grasa butirosa a los 22 y 46 días de lactancia

Table 1. Milk production means and standard deviation and fat percentage at 22 and 46 days of milking.

	Parto simple		G 3
	G 1	G 2	
Prod. leche 22 días (ml)	835 ± 557 a	659 ± 476 a	858 ± 358 a
Prod. leche 46 días (ml)	575 ± 142 a	1049 ± 502 b	763 ± 299 ab
grasa butirosa 22 días (%)	4.83 ± 1,89 a	3.51 ± 0,83 a	3.89 ± 1,29 a
grasa butirosa 46 días (%)	4.42 ± 1,98 a	3.5 ± 1,45 a	4.45 ± 1,81 a

Prod: Producción. Letras distintas en la misma fila, difieren significativamente (P < 0,05).

Tabla 2. Medias de peso y desvíos estándar de los cabritos a los 15, 30 y 45 días de edad

Table 2. Kid weight means and standard deviation at 15, 30 and 45 days of age.

	Parto simple		G 3
	G 1	G 2	
Peso a los 15 días (kg)	5,27 ± 1,19 a	5,32 ± 0,59 a	4.14 ± 0,51 b
Peso a los 30 días (kg)	7,61 ± 1,89 a	7,71 ± 1,24 a	5.49 ± 0,93 b
Peso a los 45 días (kg)	9,58 ± 2,44 a	9.83 ± 1,46 a	7,10 ± 1,21 b
Ganancia 15-30 (g)	156 ± 49,4 a	159 ± 48,7 a	88,8 ± 39 b
Ganancia 30-45 (g)	131,5 ± 39,3 a	141,9 ± 29,5 a	100,6 ± 36 b

Letras distintas en la misma fila, difieren significativamente (P < 0,05).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos sugieren que la obtención de un excedente de leche producto de la separación del cabrito de su madre durante seis horas diarias, de las cabras que poseen un solo cabrito al pie, no afectaría el peso del cabrito, ni la calidad de la leche obtenida.

La obtención de mayores excedentes destinados a la industrialización o autoconsumo permitiría mejorar la rentabilidad de los establecimientos (1, 2).

En el ordeño parcial se extrajo la leche producida durante las seis horas de aparte del cabrito, el volumen promedio obtenido a los 45 días fue de 290 ml representando un incremento del 50% con respecto al volumen producido en las hembras de una cría al pie no estimuladas, superando el 25 % de la producción diaria indicado por Fernández y col. (5) para cabras melliceras lo que indicaría la eficiencia del ordeño como técnica de estímulo para aumentar la secreción láctea.

El estímulo del ordeño parcial de cabras criollas con una sola cría al pie permitió obtener a los 45 días de lactancia valores similares a los descritos por la SAGPyA (1).

Este tipo de manejo, además, permitiría incrementar la producción de leche de las cabras que presentan partos simples en el inicio del aprovechamiento de la lactancia, posterior al destete de los cabritos, expresando de esta manera su potencial productivo.

Se propone la utilización de este sistema de manejo especialmente en los hatos en formación con predominio de cabrillas y animales jóvenes en las que predomina un bajo porcentaje de mellicerismo con el fin de obtener niveles superiores de producción de leche independientemente del número de cabritos nacidos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rossanigo CE, Frigerio KL, Silva Colomer J. La cabra criolla sanluisense. Información técnica N° 135. INTA E.E.A. San Luis, Programa Social Agropecuario, SAGyP. 1995.
2. Ansin O, Antonini A, Castagnaso H, Lacchini R, Miceli E, Muro M. Cabras criollas: producción de leche, ganancia de peso de los cabritos y efectos de la restricción nutricional en el tercio final de la gestación. Revista de Producción Animal. Universidad de Camagüey, Cuba. 2001; 13 :59-62.
3. Furtado MM. Fabricação de queijo de leite de cabra. Livraria Nobel S.A. 1979; p. 17

R. Lacchini y col.

4. Madrid A. Manual de tecnología quesera. AMV Ediciones Mundi-Prensa. 1990; p. 32.

5. Juárez M, Ramos M, Martín-Hernández C. Quesos españoles de leche de cabra. Fundación de estudios lácteos. 1991.

6. Fernández JL, Rabasa AE, Saldaño SA, Holgado FD, Poli MA. Producción de cabras criollas serranas del Noroeste Argentino. 23º Congreso Argentino de Producción Animal. 2000; 20, p. 300.

7. Lacchini R, Hernandorena M, Calvetty Ramos M, Muro M, Antonini A. Efectos de la edad al primer servicio en la productividad de cabrillas criollas en la zona de La Plata. III Encuentro de Medicina de Pequeños Rumiantes del Cono Sur - I Congreso Argentino de Especialistas en Pequeños Rumiantes y Camélidos Sudamericanos. 2000.

8. Quittet E. La cabra. Guía práctica para el ganadero. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. 1990.

MÉTODO DE TIPIFICACIÓN DE DNA A PARTIR DE MUESTRAS DE ORINA: SU UTILIDAD EN LA RESOLUCIÓN DE CASOS DE DOPING POSITIVOS EN EQUINOS

EE Villegas-Castagnasso, V It, S Díaz, JP Lirón, A Rogberg, ME Kienast, MV Ripoli, CR Madera, P Peral-García, G Giovambattista

Centro de Investigaciones en Genética Básica y Aplicada (CIGEBA),
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: *El objetivo del presente trabajo fue desarrollar un método de extracción de DNA a partir de muestras de orina de caballos, que permita verificar la correspondencia entre la muestra de orina y el animal problema en casos de doping positivos. De esta forma se podrá determinar: (i) la especie de origen de la muestra y (ii) su identidad. Para tal fin, se obtuvieron muestras de orina (evidencia: muestra primaria y muestra testigo) y sangre (referencia) de caballos de carrera del hipódromo de La Plata y del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional de La Plata). A partir del DNA total se tipificaron cinco microsatélites y el gen mitocondrial citocromo-b mediante los métodos de PCR-geles de secuenciación y PCR-RFLP, respectivamente. Los resultados obtenidos evidenciaron que la técnica desarrollada permitió obtener DNA pericial de todas las muestras. El análisis de los patrones de restricción del gen mitocondrial citocromo-b se correspondió con los patrones esperados para Equus caballus. Además, la comparación de los genotipos obtenidos en la tipificación de los microsatélites, permitió asignar cada muestra de orina a su correspondiente muestra de sangre. Por lo tanto, esta técnica permitiría determinar la especie de origen de la muestra y su identidad, siendo de utilidad para resolver las dudas sobre el origen de las muestras en casos de doping positivos en caballos de carrera.*

PALABRAS CLAVES: Identificación, DNA, Orina, Equinos, Doping.

DNA TYPING METHOD FROM URINE SAMPLES: ITS APPLICATION IN EQUINE POSITIVE DOPING CASES

ABSTRACT: *This study was undertaken to develop a DNA isolation method from equine urine samples in order to determine in doping positive cases: (i) the species determination and (ii) the individual identification of the sample. To do this we used urine (evidence: proof and second proof) and blood (reference) samples from horses taken from La Plata hippodrome and the Hospital School of the Veterinary Sciences Faculty (UNLP). Five microsatellites and the mitochondrial b-cytochrome gene were typed using the PCR-STR and PCR-RFLP methods respectively. The results confirmed that the DNA purified by this method satisfied the need for PCR analysis. The mitochondrial cytochrome-b gene PCR-RFLP patterns matched those Equus caballus. Furthermore, comparison between the microsatellite genotypes permitted to assign each urine sample with its corresponding blood sample. In conclusion, the proposed method allowed the species determination and the individual identification of the sample in positive doping cases in racing horses.*

KEY WORDS: Identification, DNA, Urine, Equine, Doping.

Fecha de recepción: 18/06/03

Fecha de aprobación: 02/10/03

Dirección para correspondencia: G.Giovambattista, CIGEBA, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata C.C. 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

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

INTRODUCCIÓN

En los eventos deportivos que se llevan a cabo en los principales hipódromos de la Argentina, se realizan oficialmente controles antidoping a los caballos de Pura Sangre de Carrera que obtuvieron el primer y segundo puesto. Las muestras de orina de estos animales son enviadas al laboratorio donde se realiza el análisis. En los casos de doping positivo, los propietarios tienen la posibilidad de apelación si presentan dudas sobre el origen de la muestra de orina.

Trabajos previos llevados a cabo en muestras humanas demostraron la utilidad del método para obtener DNA pericial a partir de muestras de orina (1, 2, 3). Actualmente en la Argentina, no se dispone de un método de verificación de la correspondencia entre la muestra de orina y el animal problema. El objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar un método de extracción de DNA a partir de muestras de orina de caballos. Con esta metodología será posible obtener DNA pericial de sangre y orina, permitiendo resolver, en casos de doping positivos: (i) la especie de origen de la muestra y (ii) su identidad.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras analizadas y extracción de DNA:

Se obtuvieron muestras de 10 ml de orina (prueba y contraprueba) de 11 Caballos de Pura Sangre de Carrera del hipódromo de La Plata y del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). El método de extracción de DNA a partir de las muestras de orina consistió en concentrar por centrifugación las células epiteliales de descamación y lavarlas tres veces con agua bidestilada. Posteriormente, el *pellet* se incubó en 300 µl de buffer de extracción (50 mM de HCl-Tris, 25 mM de DTT, 2 % de N-Laurylsarcosine) y 10 µl de proteinasa K (10 mg/ml) a 55 °C durante 3 h. El DNA total se purificó mediante dos técnicas, primero con un volumen de cloroformo y a continuación con acetato de amonio 10 M. Finalmente, el DNA se precipitó con un volumen de isopropanol, se resuspendió en agua bidestilada y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

Simultáneamente, se recolectaron muestras de sangre (referencia) de los mismos animales utilizando las tarjetas ISOCODE (Schleicher y Schuell, Keene, NH, USA). En este caso, el DNA se purificó siguiendo las recomendaciones de los proveedores (<http://www.s-und-s.de>).

Tipificación:

A partir del DNA genómico se tipificaron los microsatélites LEX52 (4), LEX34 (4), ASB2 (5), HMS3, HMS6 y HMS7 (6) mediante la técnica de PCR-geles de secuenciación. Para la identificación individual los productos de amplificación se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes al 5 % (19:1) 1X TBE y se revelaron con nitrato de plata 0,1 % (p/v).

Con el fin de realizar la asignación de la especie de origen se tipificó el gen mitocondrial citocromo-b, mediante el método de PCR-RFLP (6). Los amplificados se digirieron con las enzimas de restricción *AluI*, *HaeIII* y *HinfI* y los productos se discriminaron en minigeles nativos al 8 % (19:1) 1X TBE, siendo revelados con nitrato de plata 0,1 % (p/v). Como marcador de peso molecular se utilizó el plásmido pBR322 digerido con *MspI* (New England Biolabs, Beverly, MA, USA).

RESULTADOS

Los resultados evidenciaron que la técnica utilizada permitió obtener DNA pericial de todas las muestras de orina analizadas. Por lo que se pudo tipificar los seis marcadores genéticos utilizados (seis microsatélites y citocromo b).

El análisis de los patrones de restricción del gen mitocondrial citocromo b se utilizó para determinar la especie de origen de las muestras de orina tipificadas. En el 100% de los casos, los patrones de restricción correspondieron al esperado para la especie *Equus caballus* (Figura 1).

Se realizó la comparación de los genotipos obtenidos de la tipificación de las muestras de orina. Los resultados permitieron asignar cada muestra de orina a su correspondiente muestra de sangre y, por lo tanto, determinar la identidad de las muestras problema incluidas en el presente trabajo (Figura 2).

DISCUSIÓN

La técnica desarrollada permitiría determinar la especie de origen de la muestra y su identidad en casos de doping positivos de caballos de carrera u otras razas equinas que sean sometidos a este tipo de controles. De esta forma, la presente técnica sería de utilidad por su repetitividad y por permitir resolver las dudas sobre el origen de las muestras planteadas por los propietarios en las apelaciones durante casos de doping positivos en caballos de carrera.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo fue financiado con fondos del servicio de Diagnóstico Genético en Animales Domésticos de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP). Los autores quieren agradecer a la Med. Vet. Gabriela Chavez y al Dr. Martín Abba por sus desinteresados aportes y al Centro de Investigaciones y Diagnóstico de Doping (Instituto Provincial de Lotería y Casinos de la provincia de Buenos Aires) y a los Med. Vet. Gabriela Balescies y Marcos Muriel del Hospital Escuela de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) por el suministro de las muestras.

BIBLIOGRAFÍA

1. Brinkmann B, Rand S, Bajanowski T. Forensic identification of urine samples. *Int J Legal Med* 1992; 105(1): 59-61.
2. Schmitt C, Benecke M. Five cases of forensic short tandem repeat DNA typing. *Electrophoresis* 1997; 18(5): 690-694.
3. Junge A, Steevens M, Madea B. Successful DNA typing of a urine sample in a doping control case using human mitochondrial DNA analysis. *J Forensic Sci* 2002; 47(5): 1022-1024.
4. Coogle L, Reid R, Bailey E. Equine dinucleotide repeat loci LEX034-LEX048. *Animal Genetics* 1997; 28: 309.
5. Breen M, Lindgren G, Binns M. Genetical and physical assignments of equine microsatellites-first integration of anchored markers in horse genome mapping. *Mammalian Genome* 1997; 8: 267-273.
6. Guérin G, Bertaud M, Amigues Y. Characterization

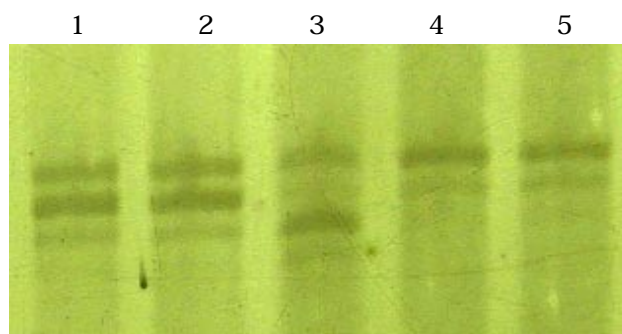


Figura 2. Productos de amplificación del microsatélite LEX52 sometidos a electroforesis en geles desnaturalizantes al 5% (19:1) 1X TBE. Los geles se revelaron con nitrato de plata 0,1% . Calle 1: Caballo 1 orina; calle 2: caballo 1 sangre; calle 3: animal no relacionado; calle 4: caballo 2 orina; calle 5: caballo 2 sangre.

Figure 2. PCR products of Microsatellite LEX52 running in a 5% (19:1) 1X TBE denatured electrophoresis gel, and staining with silver nitrate (0,1% p/v). Lane 1: horse 1 urine; lane 2: horse 1 blood; lane 3: unrelated horse; Lane 4: horse 2 urine; lane 5: horse 2 blood.

of seven new horse microsatellites: HMS1, HMS2, HMS3, HMS5, HMS6, HMS7 and HMS8. *Animal Genetics* 1994; 25: 62.

7. Bravi C, Lirón JP, Mirol PM, Ripoli V, Peral-García P, Giovambattista G. A brief method for species identification from forensic material using PCR-RFLP analysis of cytochrome b gene. *Revista de la Sociedad Argentina de Genética, XXXII Congreso Argentino de Genética, XXXVI Congreso Chileno de Genética, IV Jornadas Argentino-Chilenas de Genética. 2003; XV, Supl. 2: 48*

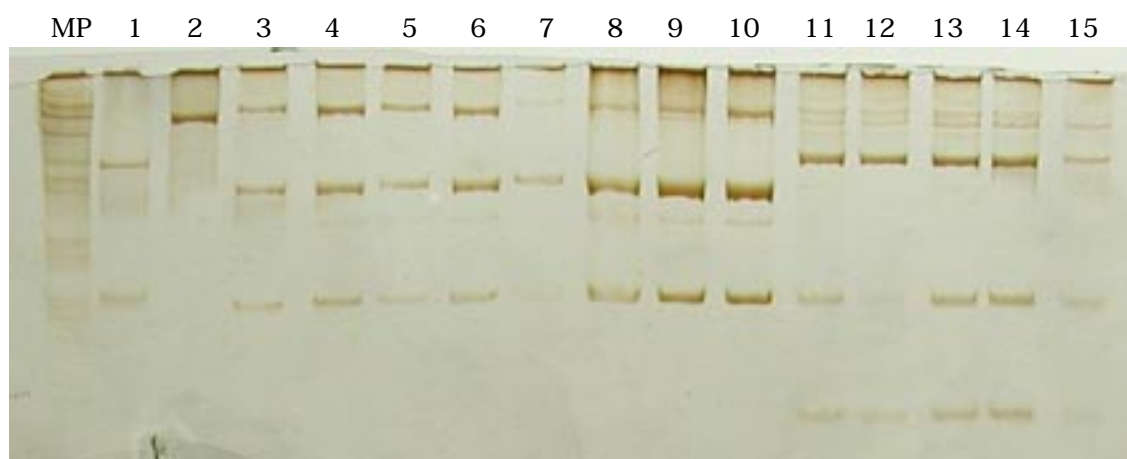


Figura 1. Productos de amplificación del gen mitocondrial citocromo b digeridos con la enzima de restricción *HinfI* discriminados en minigeles nativos al 8 % (19:1) 1X TBE. Los geles se revelaron con nitrato de plata 0,1 % (p/v). Mp: Marcador de Peso Molecular (pBR322 digerido con *MspI*), Calle 1: cordero; Calle 2: conejo; Calle 3-10: bovinos; 11-15: equinos.

Figure 1. PCR-RFLP patterns for cytochrome b (cyt b) obtained by digestion with *HinfI*, running in 8 % (19:1) 1X TBE. mini-gel, and staining with silver nitrate (0,1 % p/v). MP: Molecular marker (*MspI* digest of pBR322), Lane 1: rabbit; lane 2: sheep; lane 3-10: bovines; lane 11-15: equine.

EVALUACIÓN DE LAS LESIONES MICROSCÓPICAS Y ULTRAESTRUCTURALES DE TRÁQUEAS DE POLLITOS INOCULADOS CON *Mycoplasma gallisepticum*

MA Petruccelli^{1,2}, MV Píscopo, MF Unzaga¹, RO Cerdá¹, FP Marino¹

¹Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos, ²Servicio Central de Microscopía Electrónica. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

RESUMEN: Diversos trabajos describen los cambios producidos en la tráquea de pollitos desde los 6 días pos desafío y en animales de variadas edades inoculados con *Mycoplasma gallisepticum*. El objetivo de este trabajo fue describir los cambios microscópicos y ultraestructurales de tráqueas de pollitos hasta los 18 días de vida, inoculados con una cepa patógena de *M. gallisepticum*, y sacrificados a las 24, 48 y 72 horas y 6, 12 y 18 días pos inoculación (PI). Las tráqueas fueron procesadas con técnicas convencionales de rutina, tanto para microscopía óptica (MO) como para microscopía electrónica de transmisión (MET). Mediante MO se observaron cambios a las 24 horas PI, con un ligero edema y presencia de células inflamatorias, principalmente linfocitos en la submucosa. Estos cambios fueron más evidentes a las 48 y 72 horas PI, y mucho más intensos a los 6, 12 y 18 días PI. Con MET a las 48 horas PI los micoplasmas se encontraron adheridos a las cilias, al mismo tiempo se observó pérdida de numerosas cilias y vacuolización en el citoplasma celular. Estas lesiones se observaron en muchas células epiteliales y se caracterizaron por la presencia de las mitocondrias vacuolizadas con pérdida de las crestas, el retículo endoplásmico dilatado y múltiples vacuolas en el citoplasma de variado tamaño. Se concluye que *M. gallisepticum*, es capaz de producir lesiones en las células epiteliales traqueales en pollitos de un día de vida tan pronto como 48 h PI.

Palabras claves: pollitos, *Mycoplasma gallisepticum*, lesiones traqueales tempranas

MICROSCOPIC AND ULTRASTRUCTURAL EVALUATION OF TRACHEAL LESIONS IN CHICKENS INDUCED BY *Mycoplasma gallisepticum*

ABSTRACT: Chronic Respiratory Disease caused by *Mycoplasma gallisepticum* has different clinical presentations. The respiratory form is the most important and is characterized by tracheitis, pneumonia and airsacculitis. Several works have been described tracheal changes produced since 6 days post inoculation in different ages animals. The purpose of this work was to describe microscopic and ultrastructural changes in 1 day old chickens tracheas. One-day-old chickens were inoculated with pathogen strain of *Mycoplasma gallisepticum*, and were sacrificed at 24, 48 and 72 hours, and at 6, 12 and 18 days post inoculation (PI). Changes at 24 hours post inoculation such as mild edema and presence of inflammatory cells, especially lymphocytes in the submucous membrane were observed with light microscopy. These changes were more evident at 48 and 72 hours PI being more intense at 6, 12 and 18 days PI. Mycoplasmas bound to cilias have been seen 48 hours PI, showing at the same moment loss of the cilias and vacuolization of the cytoplasm cell. These lesions become more severe, vacuolized mitochondrias, which had lost their cristae, and enlarged endoplasmic reticulum and many different size vacuoles in the cytoplasm were observed. The results showed that *M. gallisepticum* induced lesions in tracheal epithelium cells of chickens as early as 48 hours post inoculation

Key words: chickens, *Mycoplasma gallisepticum*, early tracheal lesions

Fecha de recepción: 29/12/03

Fecha de aprobación: 31/05/04

Dirección para correspondencia: M.A. Petruccelli, Cátedra de Patología de Aves y Pilíferos. CC 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

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

INTRODUCCIÓN

La enfermedad respiratoria crónica producida por el *Mycoplasma gallisepticum*, es una enfermedad que tanto en sus formas clínica como subclínica, produce importantes pérdidas económicas en las explotaciones avícolas.

La presentación más importante es su forma respiratoria, afectando a la tráquea, pulmones y los sacos aéreos. Las lesiones más significativas son traqueítis, neumonía y aerosaculitis, la infección muchas veces subclínica predispone a la aparición de otras, sobre todo la presencia de *Escherichia coli*, que no hace más que agravar el cuadro produciendo mortalidades significativas en los lotes.

La relevancia de esta entidad se desprende por las pérdidas económicas que ocasionan en la industria avícola, debido básicamente al aumento del índice de conversión alimenticia y a la depreciación del valor de la canal y obviamente por la mortalidad.

Numerosos estudios (1, 2, 3) indican que el *M. gallisepticum* es un organismo extracelular, que se adhiere a la membrana celular a través de pequeñas gemaciones de la misma, induciendo cambios degenerativos en la célula huésped (1). Diversos trabajos describen los cambios producidos en la tráquea desde los 6 días pos desafío y en animales de variadas edades, tales como, 7, 35, 55 días y 10 semanas de vida (1, 4, 5).

El objetivo de este trabajo es el de describir los cambios microscópicos y ultraestructurales en tráqueas de pollitos hasta los 18 días de vida, inoculados con una cepa patógena de *M. gallisepticum* a partir de las 24 horas pos-inoculación (PI).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron 18 pollitos parrilleros comerciales de 1 día de vida libres de anticuerpos contra *M. gallisepticum* y *Mycoplasma synoviae*, los que fueron desafiados vía aerosol con una cepa patógena de referencia de *M. gallisepticum* (K-781) con un título de 10^8 UFC/ml (unidades formadoras de colonias). Esta cepa fue adaptada al medio de cultivo de Frey con el agregado de 12% de suero porcino. Se realizaron pasajes de 0,2 ml de medio inoculado en medio fresco a fin de obtener colonias en fase de crecimiento logarítmico (colonias de 24 horas que hayan

cambiado el pH, detectado por cambio de color del medio, de rojo púrpura a amarillo anaranjado).

A las 24, 48 y 72 horas y 6, 12 y 18 días PI fueron sacrificados 3 pollitos por vez. Para estudios con microscopía óptica, las tráqueas fueron fijadas en formol neutro al 10%, embebidas en parafina, cortadas y coloreadas con Hematoxilina y Eosina. Para microscopía electrónica las tráqueas fueron fijadas en glutaraldehído al 2%, embebidas en resinas sintéticas, cortadas y contrastadas con citrato de plomo y acetato de uranilo. Para realizar los estudios ultraestructurales se utilizó un microscopio electrónico de transmisión marca JEOL, Jem 1200 EX II.

RESULTADOS

El estudio mediante microscopía óptica reveló cambios a las 24 horas PI, los mismos consistieron en ligero edema y la presencia de células inflamatorias, principalmente linfocitos, que comenzaron a observarse en la submucosa. Estos cambios se fueron haciendo más evidentes 48 y 72 horas PI. A los 6 días PI se observó un notable engrosamiento de la membrana mucosa, con aplanamiento de las células epiteliales, pérdida de las cilias y abundante exudado inflamatorio. Estos cambios fueron más intensos a los 12 y 18 días PI, donde el engrosamiento de la membrana mucosa fue más marcado, debido al exudado inflamatorio compuesto principalmente por linfocitos, algunas células plasmáticas y muy pocos heterófilos. También se observó la desaparición de las cilias, núcleos picnóticos y vacuolización del citoplasma llegando en muchos lugares a la exfoliación de las células epiteliales.

El estudio ultraestructural reveló la presencia de estructuras compatibles con micoplasmas a las 24 horas PI, los mismos se observaron libres en la luz traqueal o incluidos en el mucus sin llegar a las cilias, presentaron una forma redonda u oval de aproximadamente 300 a 700 nm. El epitelio traqueal se observó sin alteraciones, se conservó tanto la integridad de las cilias y microvellosidades como en su número. A las 48 horas PI los micoplasmas se encontraron adheridos a las cilias y membrana celular (Foto 1), al mismo tiempo se comenzó a observar la pérdida de cilias y vacuolización en el citoplasma de las células epiteliales. A las 72 horas PI tanto la vacuolización del citoplasma como la dilatación del retículo endoplásmico se hicieron mucho más evidentes.

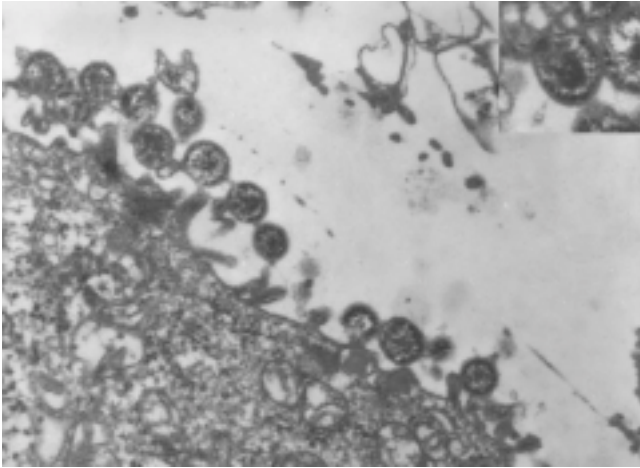


Foto 1. Fotografía electrónica: 48 horas PI. Numerosos *Mycoplasmas* adheridos a la pared celular y cilias, pérdida de cilias, vacuolización citoplasmática y pérdida de crestas mitocondriales. x 27.000 Insertado: se observa un micoplasma adherido a la pared por medio de su "bleb" o yema. x 67.500

Photo 1. Electron photography: 48 hours PI. Multiple *Mycoplasmas* bound to the wall cells and cilia, loss of cilia, cytoplasmic vacuolization and loss of mitochondrial cristae. x 27.000. Attached: A *Mycoplasma* bound to the wall cell by its bleb is observed x 67.500.

A partir de los 6 días PI, la vacuolización citoplasmática se incrementó, a los 12 y 18 días PI se observaron acumulo de micoplasmas adheridos a la superficie de las células por medio de sus yemas o "blebs" (Foto 1), la desaparición de las cilias fue total. En muchas células epiteliales las mitocondrias se observaron vacuolizadas con pérdida de las crestas, el retículo endoplásmico dilatado y múltiples vacuolas en el citoplasma de variado tamaño. También se observaron en la luz de la tráquea células epiteliales libres con procesos degenerativos y heterófilos libres. En el sitio de adhesión de los micoplasmas a las células fue claramente visible la integridad de las membranas (Foto 2), en algunos micoplasmas adheridos a la membrana celular apareció como si estuvieran fusionados a la pared celular, sin embargo no hubo fusión de membranas, siendo esto efecto del corte oblicuo.

DISCUSIÓN

La morfología, tamaño y ultraestructura del micoplasma coincidió con los hallazgos de Domermuth y col. (6) Las lesiones microscópicas y ultraestructuras observadas fueron similares a las halladas por diferentes autores. Sin embargo muchos de éstos han trabajado con

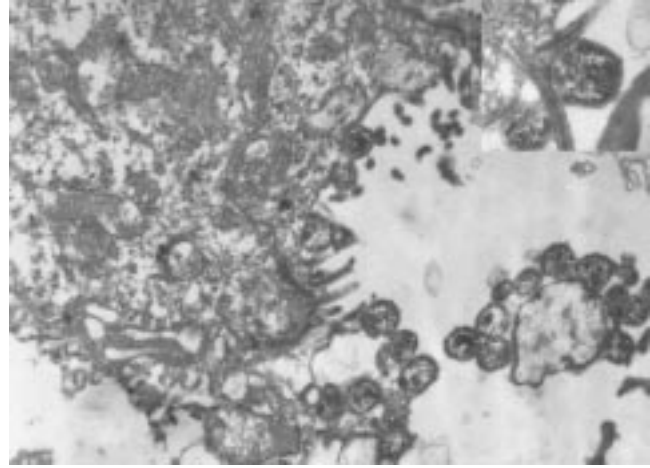


Foto 2 Fotografía electrónica: 6 días PI. Numerosos *Mycoplasmas* adheridos a la pared celular, pérdida de cilias, vacuolización citoplasmática y del retículo endoplásmico y pérdida de crestas mitocondriales. x 21.800 Insertado: un *Mycoplasma* adherido a la pared donde claramente se observa la integridad de las membranas. x 36.500.

Photo 2. Electron photography: 6 days PI. Multiple *Mycoplasmas* bound to the wall cells, loss of cilia, cytoplasmic and endoplasmic reticulum vacuolization and loss of mitochondrial cristae. x 21.800. Attached: A *Mycoplasma* bound to the wall cells showing membrane integrity. x 36.000

aves a partir de los 7 días de vida (1), 35 y 55 días (4) e incluso hasta las 10 semanas de vida (5). De la bibliografía consultada no se encontraron referencias de pollitos de 1 día de vida sometidos a una infección por *M. gallisepticum*, si consideramos la alta incidencia de este agente en nuestro medio, la posibilidad de infecciones tempranas son mucho más que posibles.

Tajima y col (1) y describen las lesiones histológicas a partir de los 6 días con engrosamiento de la membrana mucosa traqueal, edema y vacuolización de células epiteliales, pérdida de cilias y exudado inflamatorio con heterófilos y células necrosadas. Estas lesiones se hicieron más severas a los 12 días por inoculación, coincidiendo con el trabajo de Nunoya y col. (4) también fue posible observar acúmulos de linfocitos en la submucosa traqueal y perivascular, éstos son considerados como una respuesta normal del aparato inmune (7) para producir anticuerpos contra la invasión de micoplasmas.

Nuestro estudio por microscopía electrónica pudo demostrar que a las 48 horas PI los micoplasmas ya se encontraban adheridos a las cilias, comenzando a verse vacuolización del

citoplasma y pérdida de cilias. A los 6 días posinoculación numerosos micoplasmas se observaron adheridos a cilias y membrana celular a través de sus yemas o "bleb", esto es coincidente con diversos trabajos publicados (1, 2, 3), encontrándose también en las células epiteliales gran vacuolización en el citoplasma y en las mitocondrias, con pérdida casi completa de cilias y microvellosidades. Estos hallazgos concuerdan con los descritos por Tajima y col (1) y Charlier y col (8), mientras que difieren de lo expresado por Dykstra y col (9), quienes señalan que la pérdida de cilias de células individuales fue infrecuente.

Si bien dentro de los objetivos no se planteó el estudio de la signología clínica, la misma se consignó, no observándose signos hasta los 12 días de vida. Correlacionando éstos con las lesiones encontradas podemos inferir que el micoplasma puede invadir las vías respiratorias desde el primer día de vida, sin hacerse evidente clínicamente hasta varios días después. Estas observaciones refuerzan la idea de las medidas de bioseguridad que deben ser tomadas en la crianza de pollitos desde el momento mismo de la llegada a los galpones, el *M. gallisepticum*, tan pronto como 48 horas PI es capaz de producir lesiones en las células epiteliales traqueales en pollitos de 1 día de vida.

BIBLIOGRAFÍA

1. Tajima M, Nunoya T, Yagihashi T. An ultrastructural study on the interaction of *Mycoplasma gallisepticum* with the chicken trachea epithelium. Am J Vet Res. 1979; 40 (7): 1009-1014.
2. Levisohn SE. Early stages in the interaction between *Mycoplasma gallisepticum* and the chick trachea, as related to pathogenicity and immunogenicity. Is J Med Sci. 1984; 20 (10): 982-984.
3. Uppal PK, Chu HP. Attachment of *Mycoplasma gallisepticum* to the tracheal epithelium of fowls. Res Vet Sci. 1977; 22 (2): 259-260.
4. Nunoya T, Tajima M, Yagihashi T, Sannai S. Evaluation of respiratory lesions in chickens induced by *Mycoplasma gallisepticum*. Jpn J Vet Sci. 1987; 49: 621-629.
5. Yagihashi T, Tajima M. Antibody responses in sera and respiratory secretions from chickens infected with *Mycoplasma gallisepticum*. Avian Dis. 1986; 30 (3): 543-550.
6. Domermuth CH, Nielsen M, Freundt EA, Birch-Andersen A. Gross morphology and ultrastructure of *Mycoplasma gallisepticum*. J Bacteriol. 1964; 88: 1428-1432.

7. Cassell G, Lindsey JR, Baker HJ. Immune response of pathogens-free mice inoculated intranasally with *Mycoplasma pulmonis*. J Immunol. 1974; 112: 124-136.
8. Charlier G, Meulemans G, Halen P. Microscopic and ultramicroscopic lesions from experimental mycoplasma infection in respiratory tract of chickens. Possible difference between pathogenic and non pathogenic strains. Ann Rech Vet. 1981; 12 (2): 183-191.
9. Dykstra MJ, Levinsohn S, Fletcher OJ, Kleven SH. Evaluation of cytopathologic changes induced in chicken trachea epithelium by *Mycoplasma gallisepticum* *in vivo* and *in vitro*. Am J Vet Res. 1985; 46 (1): 116-122.

INVESTIGACIÓN DE LEPTOSPIRAS EN AGUAS DE LAGOS DEL ZOOLOGICO DE LA PLATA, ARGENTINA

M Gatti¹, D Arias¹, C Rosetti², S Selva³, J Copes⁴, R Laplace⁴,
P Martino^{1, 5}, K Pellicer⁴, N Stanchi¹

¹Cátedra de Microbiología, ²Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, ³Becario JICA, ⁴Zoológico de La Plata, ⁵Comisión de Investigaciones Científicas

RESUMEN: La leptospirosis es una enfermedad zoonótica producida por microorganismos pertenecientes al género *Leptospira*. Los animales de los zoológicos pueden portar leptospirosis y constituir un riesgo para la salud humana al estar en contacto con una importante población de personas. Con el fin de investigar la presencia de estos microorganismos en el zoológico de la ciudad de La Plata, se realizó un estudio bacteriológico en aguas de los distintos lagos del mismo. El zoológico cuenta con 3 lagos de los cuales se obtuvieron muestras de las aguas las que fueron sembradas en los medios especiales. A los dos días de incubación se observó turbidez característica y la típica línea de crecimiento de leptospirosis. Microscópicamente fueron consideradas leptospirosis presumiéndose por su rápido desarrollo que pertenecían a especies no patógenas. La cepa aislada fue inoculada en un hámster de 40 g de peso no mostrando signos de enfermedad. La cepa fue clasificada como *L. biflexa* y denominada cepa Salomon. El aislamiento de una cepa de leptospirosis apatógena en aguas de zoológico permite inferir que están dadas las condiciones para que cepas patógenas puedan estar presentes. El control rutinario de estos lagos debería implementarse para evitar posibles brotes de la enfermedad entre los animales del zoológico y su posible infección a los visitantes.

PALABRAS CLAVE: *Leptospira biflexa*, animal silvestre, zoológico, agua, lagos.

RESEARCH OF LEPTOSPIRAS IN WATER-LAKE FROM THE ZOO OF LA PLATA, ARGENTINA

ABSTRACT: *Leptospirosis* is a zoonotic disease caused by microorganisms belonging to the Genus *Leptospira*. The animals of the zoological park can carry *Leptospira* and constitute a risk for the human health when are in contact with an important population of people. With the purpose of investigating the presence of microorganisms belonging to the Genus *Leptospira* in the zoological park of the city of La Plata, was carried out a bacteriological study in waters of the different lakes. Water samples from the 3 lakes of the Zoo were obtained and inoculated into special media After two days post incubation it was observed characteristic turbidity and the typical line of growth of leptospirosis. Microscopic and cultural observations revealed the presence of nonpathogenic *Leptospira*. The isolated strain was inoculated in a hamster of 40 g of weight, which didn't show any illness signs. The strain was classified as *L. biflexa* and denominated Salomon. The isolation of a strain of non pathogenic leptospirosis in waters of zoological park allows to infer that the conditions are given so that pathogen strains can be present. Routine control of the zoo waters should be carry out to avoid outbreaks among animals and humans.

KEY WORDS: *Leptospira biflexa*, wild animal, zoological park, water, lake.

Fecha de recepción: 02/09/03

Fecha de aprobación: 10/06/04

Dirección para correspondencia: Nestor Stanchi, Cátedra de Microbiología. CC 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: stanchi@paismail.com

INTRODUCCIÓN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica producida por microorganismos pertenecientes al género *Leptospira*. Los animales silvestres juegan un importante papel en el mantenimiento de la enfermedad. Por otro lado, los animales de zoológico (1) pueden portar leptospiras y constituir un riesgo para la salud humana al estar en contacto con una importante población de personas donde gran parte son niños. Las leptospiras, como agentes causales de leptospirosis, no pueden separarse del ecosistema en que actúan, por lo que cualquier desequilibrio en éste puede desencadenar una serie de acontecimientos que eventualmente puedan conducir a la presencia de la enfermedad (2,3). Con el fin de investigar la presencia de microorganismos pertenecientes al género *Leptospira* en el zoológico de la ciudad de La Plata, se realizó un estudio bacteriológico en aguas de los distintos lagos del mismo.

MATERIALES Y MÉTODOS

El zoológico cuenta con 3 lagos de los cuales se obtuvieron muestras de las aguas. La recolección se realizó mediante frascos de vidrio previamente esterilizados y con tapa a rosca. Se obtuvo agua de superficie de la periferia de los lagos (Foto n° 1).

En el laboratorio, fueron centrifugadas a 3000 rpm durante 5 min a efectos de decantar partículas en suspensión, protozoarios y la mayor parte de las bacterias. El sobrenadante fue filtrado con filtros de 0,2 µm y, del filtrado, 3 o 4 gotas sembradas en los medios Fletcher y

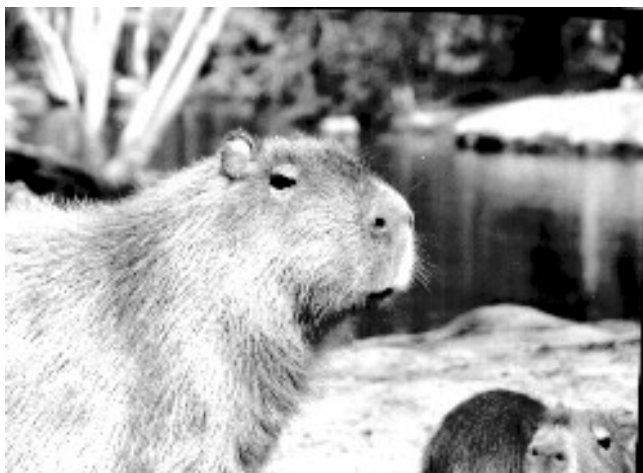


Foto 1: Animales y lago del zoológico donde se aisló *Leptospira biflexa*.

Photo 1: Animals and Zoological park lake where *Leptospira biflexa* was isolated.

EMJH de a 2 tubos por cada muestra. Por otro lado, como filtro biológico, se inocularon 2 cobayos por vía subcutánea con 1 ml del mismo sobrenadante por cada lago. Dos cobayos permanecieron sin inocular, los que actuaron como testigos.

Los medios de cultivo fueron incubados a 28 °C controlándose a diario la primer semana y cada 7 días en las siguientes semanas por el término de 60 días. Los animales inoculados y los testigos fueron alimentados *ad-libitum* durante 30 días. Mediante anestesia con éter, a los 5, 7, 14, 21 y 30 días, fueron obtenidas muestras de sangre a partir de punción cardíaca, sin tomar la temperatura corporal, las que fueron sembradas en los medios de cultivo antes mencionados.

A los 30 días, los animales fueron sacrificados mediante anestesia con éter y con pipeta Pasteur se sembraron trozos de órganos (hígado, riñón y sangre). Al momento del sacrificio se obtuvo sangre por punción cardíaca y con el suero obtenido se realizó la prueba de aglutinación microscópica con diluciones 1/10, 1/20 y 1/40 enfrentándose contra 11 serovares de leptospiras. *L. interrogans* sv. *Ballum*, ballum; *Bataviae*; *Canicola* canicola; *Cynopteri*, cynopteri; *Grippotyphosa* grippotyphosa; *Icterohaemorrhagiae*, copenhageni; *Pomona*, pomona; *Pyrogenes*, pyrogenes; *Sejroe*, hardjo; *Tarassovi*, tarassovi; *L. biflexa* sv. *patoc* (4, 5).

RESULTADOS

En los medios de cultivo sembrados con agua de uno de los lagos se observó turbidez característica en medio líquido y la típica línea de crecimiento de leptospiras en medio semisólido a los dos días de incubación. Microscópicamente fueron consideradas como leptospiras, presumiéndose por su rápido desarrollo que pertenecían a especies no patógenas.

Los animales inoculados con agua de lagos del zoológico no mostraron signos clínicos de enfermedad ni se logró el aislamiento de leptospiras a partir de sus órganos. Tampoco fue posible poner en evidencia anticuerpos antileptospiras a partir del suero obtenido.

La cepa aislada en medio semisólido fue inoculada en un hámster de 40 g de peso, no mostrando signos de enfermedad, sin embargo fue posible el aislamiento de la cepa a partir del mismo. En el Instituto Nacional de Tecnología

gía Agropecuaria de Castelar la cepa fue clasificada como *L. biflexa* y denominada cepa Salomon.

DISCUSIÓN

El hospedador y el parásito conviven en el ambiente en distinto grado de adaptación. La presencia de leptospirosas en estos puede mantener su normal fisiología o producir graves daños que pueden llevar a la muerte. De esta manera hay dos tipos de portadores: el portador facultativo, que es aquel que luego de superar la enfermedad se hace eliminador (los animales domésticos pertenecen a este grupo) y el portador propiamente dicho, que son aquellos hospedadores sin daño evidente por la presencia de leptospirosas. Estos últimos son particularmente importantes ya que pueden permanecer en esta condición durante toda su vida y constituyen un factor que permite la sobrevivencia del agente en condiciones ambientales poco propicias. Es aquí donde encontramos a los animales silvestres y dentro de estos, a los pequeños roedores que son los mayores portadores de leptospirosas (2, 3, 6).

El análisis de los datos obtenidos en la investigación de la leptospirosis en animales silvestres y el ambiente acuático no es sencillo. Los innumerables aislamientos de estos microorganismos a partir de los animales silvestres confirman la importancia de estos en la epidemiología de la enfermedad (1, 7, 8, 9, 10, 11). En Argentina, en 1949, Anchezar y col. se ocuparon de 2 casos humanos provocados por nutrias (*Myocastor coypus*) infectadas con *L. icterohaemorrhagiae* pertenecientes al zoológico de la ciudad de Buenos Aires, en donde un cuidador de animales falleció y un médico veterinario fue afectado (1, 7).

Por lo general los animales silvestres y entre ellos obviamente los de zoológicos, no muestran signos clínicos de infección pero a la necropsia se evidencian algunas alteraciones que suponen una acción leptospiral (11). Los sapos, particularmente relacionados con fuentes hídricas, también es probable que puedan ofrecer condiciones favorables para mantener leptospirosas, de allí que en las lagunas del zoológico podrían tener implicancia en el mantenimiento de esta zoonosis (10). En el lago del aislamiento conviven coypos, capibaras y otros mamíferos que podrían tener su propio ciclo de infección.

El aislamiento de una cepa de leptospira no patógena en aguas de zoológico permite inferir que están dadas las condiciones para que cepas patógenas puedan estar presentes. Debería implementarse el control rutinario de estos lagos para evitar posibles brotes de la enfermedad entre los animales que conviven en el zoológico, en el personal afectado a su cuidado y en los visitantes.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue parcialmente financiado por la Agencia Internacional de Cooperación del Japón (JICA).

BIBLIOGRAFÍA

1. Cacchione R. Leptospirosis en animales silvestres. Estado actual de sus investigaciones. Aislamientos y clasificación de cepas argentinas Rev Inv Agrop 4, 13: 173-197 1965
2. Stanchi NO. Ecología de Leptospiras I. Therios 8, 38:182-186, 1986
3. Stanchi NO. Ecología de Leptospiras II. Therios 8; 39:264-268, 1986
4. Stanchi N, Brihuega B. Familia Leptospiraceae en Temas de Microbiología Veterinaria, Ed. Stanchi N y col., Editorial Sur, p. 159-175, 1996.
5. Stanchi N, Pennimpede E, Gómez C. Serología de la Leptospirosis experimental en cobayos (*Cavia porcellus*). Fenómeno de zona. Acta Bioq Clin Latin. 25, 1,:29-31 ,1991
6. Stanchi N, Martino P, Martino J, Calvo J. Leptospirosis en animales silvestres y en animales de piel. Rev Med Vet (Bs.As.) 68, 2:80-85, 1987
7. Cacchione R. Leptospirosis en animales silvestres de la Argentina. Estudio suerológico, Rev Inv Agrop 4, 6: 76-83 1965
8. Cacchione R. Leptospiras de agua. Aislamiento de Leptospiras saprófitas en la República Argentina Rev Invest Ganaderas 14: 153-158 1962
9. Stanchi N, Grisolia C, Martino P, Peluso F. Presencia de anticuerpos anti leptospirosas en ofidios de Argentina. Rev Arg Microbiol. 18, 3/4:127-130, 1987
10. Stanchi N, Francini F, Peluso F, Grisolia C. *Leptospira interrogans* serovar *cynopteri* aislada de sapos (*Bufo arenarum*) de Argentina. Comunicación Previa. Therios 17, 84:198-201, 1991
11. Stanchi N, Martino P. Evaluación clínico patológica de la Leptospirosis experimental con *Leptospira interrogans* serovar *pomona* en zarigüeyas (*Didelphys albiventris*). Avances en Cs Vet (Chile) 6, 2:180-184, 1991.

ECOCARDIOGRAFIA DOPPLER COLOR Y EVALUACIÓN DEL GRADO DE INSUFICIENCIA MITRAL CANINA

D Arias¹, M Tórtora¹, A Cruz¹, L Klima², M Huzman¹, R Rodríguez^{1,2}

¹ Servicio de Cardiología. ²Servicio de Diagnóstico por Imágenes.
Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata

RESUMEN: En la clínica de pequeños animales es común el hallazgo de patologías cardiovasculares cuya confirmación diagnóstica sólo se logra a través de algunos de los métodos complementarios por imagen disponibles. Dentro de estas patologías, la valvulopatía aurículo-ventricular degenerativa crónica es una de las causas más comunes de insuficiencia cardíaca en caninos. La válvula mitral es la más afectada. La ecocardiografía es el método complementario más sensible para confirmar la enfermedad valvular. A través de la aplicación del Modo 2D y M podemos valorar globalmente la morfología y función del complejo valvular, como así también cuantificar el grado de compromiso cameral. La tecnología Doppler aporta nueva y muy valiosa información acerca del impacto hemodinámico del paciente con valvulopatías. En este trabajo, se presentan 50 casos de Insuficiencia Valvular Mitral en los que mediante el Doppler color se pudo confirmar la presencia de regurgitación mitral y estatificar la severidad de la valvulopatía. De los 50 animales analizados: 12 de ellos (24 %) presentaron Insuficiencia mitral leve, 17 (34 %) moderada y 21 animales (42 %) Insuficiencia Mitral severa. La utilización del Doppler color se fundamenta en la sencillez y rapidez del método, ya que en el mismo momento en que se realiza la ecocardiografía bidimensional (2D) de rutina y, con la guía de la misma, se evalúan las características hemodinámicas con el color. Esto permite, a través de la evaluación del flujo de regurgitación, confirmar y estadificar la severidad de la insuficiencia.

PALABRAS CLAVE: válvula mitral, ecocardiografía, doppler, insuficiencia

COLOR DOPPLER ECHOCARDIOGRAPHY DIAGNOSIS IN CANINE MITRAL DISEASE

ABSTRACT: In the clinic of small animals cardiovascular diseases are common. Their diagnostic confirmation is only achieved through some of the available complementary image methods. Inside these pathologies, the auriculoventricular degenerative chronic valvulopathy is one of more common causes of heart insufficiency in canine. The mitral valve is the most affected one. The echocardiography is the most sensitive complementary method to confirm this valvular disease. Through 2D and M modes we can value globally morphology and function of the valvular complex, and quantify cameral expose grade. Doppler technology give new and very valuable information about hemodynamic impact in patients with valvular disease. In this work, 50 Mitral insufficiency cases are presented. By Doppler color we could know the presence of mitral regurgitation, and evaluate the severity of the valvular disease. Twelve of them (24 %) presented light, seventeen (34 %) moderate and twenty-one (42 %) severe mitral insufficiency. The use of the Doppler color is based in their simplicity and speed. In the same moment that two-dimensional echocardiography (2D) is carried, the hemodynamic characteristics with color are evaluated. This allows, through the evaluation of regurgitant flow, to confirm the insufficiency severity.

KEY WORDS: mitral valve, Doppler, echocardiography, insufficiency

Fecha de recepción: 10/02/04

Fecha de aprobación: 01/06/04

Dirección para correspondencia: Daniel Arias, Servicio de Cardiología. CC 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: dlfiarias@hotmail.com

INTRODUCCIÓN

En la clínica de pequeños animales es común el hallazgo de enfermedades cardiovasculares cuyo diagnóstico definitivo sólo se logra a través de la metodología complementaria por imágenes (1).

Dentro de estas enfermedades, la valvulopatía aurículo-ventricular degenerativa crónica, es la causa más común de insuficiencia cardíaca en caninos viejos de razas chicas (2, 3). La válvula mitral es la más afectada, si bien en muchos pacientes se afectan en conjunto la mitral y la tricúspide (4). La valvulopatía aórtica y pulmonar son menos frecuentes.

En un estudio sobre necropsia de perros se observó lesión únicamente en la válvula mitral en el 62 %, lesión únicamente en la válvula tricúspide en el 1 % y en ambas válvulas en el 33 % (5).

Aunque la etiología es incierta, la fisiopatología de la enfermedad degenerativa de la válvula mitral y/o tricúspide siempre cursa con insuficiencia valvular, regurgitación auricular, sobrecarga de volumen y estrés ventricular (6). El impacto hemodinámico está relacionado con el grado de insuficiencia.

Los perros con insuficiencia valvular mitral pueden ser presentados por un soplo, tos crónica, o por signos de insuficiencia cardíaca congestiva. El soplo generalmente es causado por regurgitación mitral. La tos puede ser ocasionada por edema pulmonar, pero generalmente es producida por compresión del bronquio principal izquierdo por la aurícula izquierda dilatada. La enfermedad progresa lentamente, de ahí la importancia de su diagnóstico precoz.

A partir de la reseña y del examen clínico se puede arribar a un diagnóstico con alto grado de certeza, sin embargo la correlación de la valvulopatía con la clase funcional de Insuficiencia Cardíaca Congestiva (ICC) o con la intensidad del soplo se dificulta dado la subjetividad de dichos parámetros (6, 7), por lo que la confirmación sólo se logra mediante el uso de los métodos complementarios de diagnóstico por imágenes (8).

Los cambios electrocardiográficos no son específicos. Las radiografías torácicas pueden mostrar desde un corazón normal hasta severa cardiomegalia izquierda o generalizada.

La ecocardiografía es el método complementario más sensible para confirmar la enfermedad valvular (3, 9). A través del Modo 2D y M se puede valorar globalmente el complejo valvular, así como cuantificar el grado de impacto cameral (2, 10). La tecnología Doppler color y espectral aporta información adicional muy valiosa acerca de la hemodinamia del paciente con valvulopatías. El Doppler espectral, evalúa velocidades y direcciones de flujo, permitiendo calcular volúmenes y presiones (11, 12). El Doppler color valora si se trata de flujo laminar o no a partir de la formación de un mosaico de colores, confirmando la regurgitación y posibilitando clasificar el grado de insuficiencia valvular en leve, moderada o severa (13, 14, 15, 16). El propósito de este trabajo fue estadificar a través del Doppler color el grado de la insuficiencia valvular en caninos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales

Cincuenta caninos de 5 a 17 años de edad, mestizos y de raza pura, de ambos sexos fueron derivados al Servicio de Cardiología de la Facultad de Ciencias Veterinarias (UNLP) con diagnóstico presuntivo de enfermedad cardiovascular.

A todos los animales se les realizó:

- * Examen clínico general
- * Radiografía de tórax: incidencia latero lateral en posición de decúbito lateral derecho
- * Electrocardiograma: todas las derivaciones
- * Ecocardiografía: desde la ventana paraesternal derecha en eje largo de 2, 4 y 5 cámaras en modos 2D y Doppler color.

El grado de valvulopatía mitral estadificada por Doppler color se definió como (17):

- * Leve, cuando el área del *jet* de regurgitación abarcó hasta el 20% del área correspondiente a la aurícula izquierda.
- * Moderada, cuando el área del *jet* abarcó entre el 20% y el 40% del área correspondiente a la aurícula izquierda
- * Severa, cuando el área del *jet* abarcó más del 40% del área correspondiente a la aurícula izquierda.

RESULTADOS

Las características de los animales estudiados y los resultados del estudio Doppler color se resumen en las Tablas 1, 2 y 3. De los

animales que presentaron insuficiencia mitral (IM), hubo una cantidad levemente mayor con IM moderada y severa (Figura 1).

DISCUSIÓN

En el presente estudio, cuando se consideraron los diferentes grados de valvulopatía, no hubo concordancia con los datos bibliográficos, debido a que el 75 % de los animales con

Tabla 1 Categorización de insuficiencia mitral leve en 12 caninos de diferentes razas, sexo y edad.

Table 1 Rank of mild mitral insufficiency in 12 different breed, sex and age canines

Raza	Sexo	Edad	IM por US**
1 Ovejero Alemán	M	7 A	Leve
2 Basset Hound	H	10 A	Leve
3 Viejo Pastor Ingles	M	6 A	Leve
4 Mestizo	M	8 A	Leve
5 Mestizo	M	6 A	Leve
6 Labrador	M	5 A	Leve
7 Ovejero Alemán	M	6 A	Leve
8 Pekinés	H	5 A	Leve
9 Mestizo	M	8 A	Leve
10 Boxer	H	6 A	Leve
11 Mestizo	H	14 A	Leve
12 Bretón	M	8 A	Leve

**US: Ultrasonido

Tabla 2. Categorización de insuficiencia mitral moderada en 15 caninos de diferentes razas, sexo y edad.

Table 2 Rank of moderate mitral insufficiency in 15 different breed, sex and age canines

Raza	Sexo	Edad	IM por US**
1 Ovejero Alemán	H	8 A	Moderada
2 Bull Terrier	H	7 A	Moderada
3 Mestizo	H	11 A	Moderada
4 Pekinés	M	8 A	Moderada
5 Bretón	M	10 A	Moderada
6 Pekinés	M	10 A	Moderada
7 Yorkshire Terrier	H	9 A	Moderada
8 Cocker Spaniel	M	13 A	Moderada
9 Bretón Español	M	9 A	Moderada
10 Dálmata	H	11 A	Moderada
11 Bretón Español	M	9 A	Moderada
12 Mestizo	M	10 A	Moderada
13 Cocker Spaniel	H	8 A	Moderada
14 Dachshund	M	10 A	Moderada
15 Caniche Toy	M	12 A	Moderada

**US: Ultrasonido

Tabla 3. Categorización de insuficiencia mitral severa en 23 caninos de diferentes razas, sexo y edad.

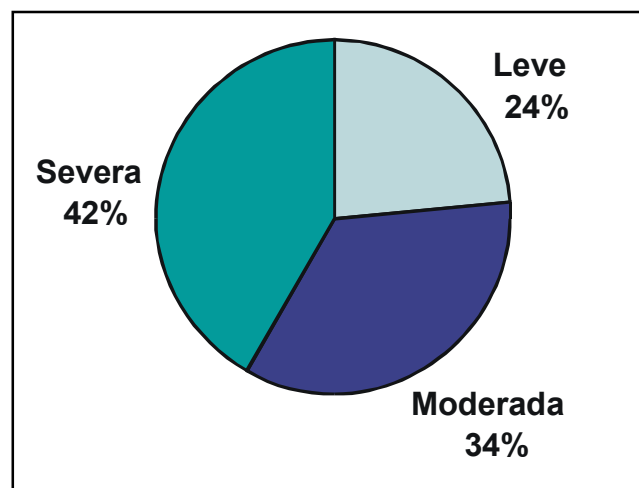
Table 3 Rank of severe mitral insufficiency in 23 different breed, sex and age canines

Raza	Sexo	Edad	IM por US**
1 Bretón Español	M	13 A	Severa
2 Chihuahua	M	14 A	Severa
3 Mestizo	H	14 A	Severa
4 Mestizo	M	12 A	Severa
5 Mestizo	M	11 A	Severa
6 Mestizo	H	12 A	Severa
7 Mestizo	M	15 A	Severa
8 Mestizo	M	11 A	Severa
9 Mestizo	H	11 A	Severa
10 Mestizo	M	12 A	Severa
11 Caniche Toy	H	14 A	Severa
12 Mestizo	M	11 A	Severa
13 Maltés	H	14 A	Severa
14 Mestizo	M	17 A	Severa
15 Mestizo	M	10 A	Severa
16 Mestizo	H	12 A	Severa
17 Pekinés	H	15 A	Severa
18 Mestizo	M	11 A	Severa
19 Mestizo	M	12 A	Severa
20 Shih-Tzu	H	15 A	Severa
21 Mestizo	M	13 A	Severa
22 Pekinés	H	12 A	Severa
23 Mestizo	M	16 A	Severa

**US: Ultrasonido

Figura 1. Distribución porcentual de los grados de Insuficiencia mitral en 50 caninos de 5 a 17 años de edad derivados al Servicio de Cardiología de la FCV-UNLP.

Figure 1. Procentual distribution of mitral insufficiency rates in 50 canines between 5 to 17 years old, derivated to the Cariology Service (FCV-UNLP).



insuficiencia leve correspondieron a aquellos de tamaño grande (18, 19); en tanto que más del 70 % de los animales con valvulopatía moderada y severa correspondieron a animales de pequeño porte.

Sin embargo, cuando todos los grados de valvulopatías fueron considerados en conjunto se observó que en concordancia con informes previos el 41% de animales con insuficiencia mitral correspondió a razas de pequeño tamaño, en tanto que el 31% y 27.5% eran a razas de tamaño mediano y grande, respectivamente.

En línea con trabajos previos (20), la severidad de la insuficiencia fue mayor, cuanto mayor fue la edad de los animales estudiados. De este modo la edad promedio de presentación de Insuficiencia mitral leve, moderada y severa fue de 6,6 +/- 0,5; 9,5 +/- 0,4 y 13,8 +/- 0,4 años, respectivamente en el presente estudio. No se registraron diferencias significativas en el sexo de los animales estudiados.

La ecocardiografía Doppler en el presente estudio resultó un complementario de utilidad para estadificar el grado de insuficiencia mitral en el grupo de animales analizados. Dicha estadificación permitirá confirmar el diagnóstico precoz de animales con insuficiencia mitral leve, efectivizando el tratamiento a seguir y retrasando el avance de la enfermedad. Asimismo, permitirá monitorear apropiadamente la evolución de los animales con insuficiencia mitral moderada y severa.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sydney Moise, N; Fox, P. Echocardiography and Doppler imaging. En: Textbook of Canine and Feline Cardiology. Fox P, Sisson D, Sydney Moise N. (Eds). WB Saunders Co. 1999; p. 130-171.
2. Sisson, D. Acquired valvular heart disease. En: Bonagura, J.D. (Ed): contemporary issues in small animal practice. Cardiology. New York, Churchill Livingstone. 1987; p. 59.
3. Ettinger, S.J. Valvular heart disease. En: Ettinger (Ed). Textbook of Veterinary Internal Medicine. Disease of dog and cat. Ed Edition Philadelphia. WB Saunders. 1989; p. 1031-1050.
4. Buchanan JW. Valvular disease (endocardiosis in dogs). Adv Vet Sci Comp Med. 1979; p. 21:75.
5. Atkins SE. Acquired valvular insufficiency. En: Miller MS, Tilley LP. Manual of canine and feline cardiology. 2ed. Philadelphia, WB Saunders. 1995; p. 129-143.
6. Buchanan JW. Causes and prevalence of cardio-

vascular disease. En: Kirk RW, Bonagura. JD. (eds): Current Veterinary Therapy XI. Philadelphia, WB Saunders. 1992; p. 647.

7. Criteria Committee, New York Heart Association, Inc. Diseases of the heart and blood vessels. Nomenclature and Criteria for Diagnosis. 6th ed. Boston, Little, Brown. 1964.
8. Lombard CW, Spencer CP. Correlation of radiographic, echocardiographic, and electrocardiographic signs of left heart enlargement in dogs with mitral regurgitation. Vet Rad. 1985; 26: 89-91.
9. Pipers FC, Bonagura JD, Hamlin RL, Kittleson M. Echocardiographic abnormalities of the mitral valve associated with left sided heart diseases in the dog. JAVMA. 1981; 179: 580-586.
10. Weyman AE. Left ventricular inflow tract. I. En: Weyman AE: Principles and practice of echocardiography. Philadelphia, Lea and Febiger. 1994; p. 391.
11. Kittleson MD, Eyster GE, Knowlen GG. Myocardial function in small dogs with Chronic mitral regurgitation and severe congestive heart failure. J Am Vet Med Assoc 1984; 184 (4): 455-459.
12. Bodey AR. Systemic Hypertension in the Dog-Fact o Fiction 18th Annual Waltham OSU Symposium. 1994; p. 44-53.
13. Abbasi AS, Allen MW, Decristofaro D, Ungar I. Detection and estimation of the degree of mitral regurgitation by range-gated Doppler echocardiography. Circulation. 1980; 61: 143-147.
14. Helmcke F, Nanda NC, Hsiung MC, Soto B, Adey CK, Goyal RG, Gatewood RP. Color Doppler Assessment of Mitral Regurgitation with Orthogonal Planes. Circulation 1987; 75: 175-183.
15. Uehara Y, Takahashi M. Cuantitative Evaluation of the Severity of Mitral Insufficiency in Dogs by Color Doppler Method. J Vet Med Sci. 1996; 58: 249-253.
16. Perry GJ, Nanda NC. Recent advances in color Doppler evaluation of valvular regurgitation. Echocardiography. 1987; 4: 503.
17. Boon J. Acquired heart disease. En: Manual of Veterinary Echocardiography. Williams & Wilkins, Baltimore, USA. 1998; p. 261-382.
18. Clarke EA. Acquired Valvular Insufficiency. En: Manual of Canine and Feline Cardiology. Miller MS, Trille LP. (eds.), WB Saunders Co. 1995; p. 129-143.
19. Detweiler DK, Patterson DF. The prevalence and types of cardiovascular disease in dogs. Ann NY Acad Sci. 1965; 127: 481-482.
20. Sisson D, Kvart C, Darke P. Acquired valvular heart disease in dogs and cats. En: Textbook of canine and feline cardiology. Fox P, Sisson D, Moise NS. (Eds). WB Saunders Co. 1999; p. 536-565.

PRODUCCIÓN DE ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS PARA LA INVESTIGACIÓN DE *Corynebacterium kutscheri* Y *Bordetella bronchiseptica* EN ANIMALES DE LABORATORIO MEDIANTE LA TÉCNICA DE MICROAGLUTINACIÓN DIRECTA EN PLACA

JM Laborde, P Cagliada, C Carbone

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

RESUMEN: Una de las técnicas que se utilizan para la detección de infecciones en animales de experimentación es la microaglutinación directa en placa. El objeto de este trabajo fue producir antígenos y anticuerpos para el diagnóstico de *Corynebacterium kutscheri* y *Bordetella bronchiseptica*, las cuales deben estar ausentes en ratas y ratones de laboratorio. Las cepas bacterianas de *Corynebacterium kutscheri* SL5 y *Bordetella bronchiseptica*, (NIH Japón) se cultivaron en medios bacteriológicos específicos. Se obtuvo una dilución de $1,5 \times 10^9$ UFC/ml (turbidez aproximada al tubo número 5 de la escala de Mac Farland) para *C. kutscheri* y una dilución de $2,1 \times 10^9$ UFC/ml (turbidez aproximada al tubo número 7) para *B. bronchiseptica*. Los antígenos producidos a partir del cultivo bacteriano se inocularon en conejos mediante un programa de inmunización para la producción de antisueros. Los títulos obtenidos mediante la técnica de microaglutinación directa en placa fueron de 1/2560 para *C. kutscheri* y 1/5120 para *B. bronchiseptica*. Los antígenos y anticuerpos obtenidos demostraron ser eficientes para el desarrollo de la técnica de microaglutinación directa en placa..

PALABRAS CLAVE: animales de laboratorio; antígeno; anticuerpos; microaglutinación; *Corynebacterium kutscheri*; *Bordetella bronchiseptica*.

ANTIGENS AND ANTIBODIES PRODUCTION OF *Corynebacterium kutscheri* AND *Bordetella bronchiseptica* FOR DIAGNOSIS BY USING DIRECT MICROAGGLUTINATION TECHNIQUE IN LABORATORY ANIMALS

ABSTRACT: Microagglutination assay is one of the serological techniques used to detect bacterial infections in laboratory animal colonies. The objective of this research work is to produce antigens and antibodies for the diagnosis of *Corynebacterium kutscheri* and *Bordetella bronchiseptica*. These bacteria should be absent in rat and mice colonies. *Corynebacterium kutscheri* SL 5 and *Bordetella bronchiseptica* Japan NIH strain were cultured in specific bacteriological mediums. A dilution of $1,5 \times 10^9$ CFU/ml (tube n° 5 Mac Farland scale) for *C. kutscheri* and of $2,1 \times 10^9$ UFC/ml (tube n° 7) for *B. bronchiseptica* were obtained. The antigens produced from the bacteriological cultures were inoculated into rabbits following an immunization schedule in order to produce antisera. A title of 1/2560 for *C. kutscheri* and of 1/5120 for *B. bronchiseptica* were obtained by using the microagglutination test. Antigens and antibodies demonstrated to be efficient to perform the direct microagglutination test

KEY WORDS: laboratory animals; antigen; antibodies; microagglutination; *Corynebacterium kutscheri*; *Bordetella bronchiseptica*.

Fecha de recepción: 03/03/04

Fecha de aprobación: 04/06/04

Dirección para correspondencia: J. Laborde, Cátedra de Animales de Laboratorio. CC 296, (B1900AVW) La Plata, ARGENTINA.

E-mail: jmlabo@fvc.unlp.edu.ar

INTRODUCCIÓN

Los animales de laboratorio están expuestos a una diversidad de agentes patógenos que son ampliamente reconocidos como factores adversos en las investigaciones biomédicas. De acuerdo con las normativas internacionales estos microorganismos deben estar ausentes en las colonias de ratas y ratones de experimentación (1, 2, 3, 4). Mas allá de los efectos negativos sobre la salud de los animales estas infecciones pueden causar alteraciones en las funciones fisiológicas, provocando interferencias en los resultados de las investigaciones y ejerciendo una influencia negativa sobre el bienestar animal.

Corynebacterium kutscheri (Kutscher, 1894) y *Bordetella bronchiseptica* (Bordet, 1906) son agentes bacterianos patógenos secundarios, de distribución universal y de aparición frecuente en animales de experimentación (5, 6, 7). *C. kutscheri* se presenta habitualmente en forma latente en colonias de ratones convencionales produciendo manifestaciones clínicas cuando los animales se someten a procedimientos que causan inmunosupresión. La enfermedad se caracteriza por una septicemia masiva, aparición de embolia séptica en varios órganos, especialmente en hígado, riñón y menos frecuentemente en pulmón, piel y articulaciones. En las ratas predomina la enfermedad pulmonar. *B. bronchiseptica* es un microorganismo oportunista que infecta a colonias de ratas convencionales produciendo bronconeumonía aguda o subcrónica.

En las infecciones causadas por estas dos bacterias es difícil aislar estos microorganismos, en consecuencia, el uso de técnicas serológicas complementarias contribuye con el diagnóstico bacteriano (8, 9, 10).

La técnica de microaglutinación directa en placa se utiliza para el diagnóstico serológico de *C. kutscheri* y *B. Bronchiseptica*, debido a su alta especificidad, ya que es una prueba simple para detectar anticuerpos. En los países desarrollados estas pruebas están ya estandarizadas. En el caso de Argentina los controles microbiológicos, entre los que se incluye esta técnica, se establecieron a partir del año 1998 únicamente en la Cátedra de Animales de Laboratorio de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata en respuesta a la creciente demanda de los investigadores usuarios debido a los requerimientos

en las publicaciones científicas concernientes a la calidad sanitaria de los animales de laboratorio que se utilizan en las investigaciones.

El factor de mayor importancia para realizar esta técnica radica en la obtención de la cepa bacteriana, a través de su aislamiento en animales infectados, o adquisición de la cepa patrón.

El objetivo de este trabajo fue producir antígenos y anticuerpos para la realización de la técnica de microaglutinación en placa para el diagnóstico serológico de *C. kutscheri* y *B. bronchiseptica*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del antígeno

Se procedió a cultivar la cepa virulenta de *C. kutscheri* SL5 (NIH, Japón) y cepa virulenta de *B. bronchiseptica* (NIH, Japón) en medio base agar sangre (Merck) adicionando 5 % de sangre equina y posterior incubación a 37°C en estufa de cultivo, en ambiente aerobio durante 24 h. Luego se realizaron las pruebas bioquímicas correspondientes con el objeto de confirmar la identidad y pureza del cultivo. Posteriormente para producir el antígeno, el cultivo obtenido se suspendió en una solución salina tamponada (PBS pH 7,2-0,01M) y se inactivó con 0,25 % (v/v) de formaldehído durante 72 horas. Luego se realizó el control de inactivación del antígeno mediante cultivo en caldo cerebro-corazón (Merck) durante 24 h e incubándolo a 37 °C en atmósfera aerobia y posterior siembra (100 µl) en medio base agar sangre (Merck) con 5 % de sangre equina, incubándolo a 37 °C en atmósfera aerobia durante 24 h. Verificada la inactivación de las suspensiones de los antígenos se lavó y centrifugó tres veces con PBS a 3000 rpm. Durante 20 min. El sobrenadante se desechó y el sedimento se resuspendió en solución PBS-Tween-Azida sódica (1 %) y se almacenó a 4 °C. Para realizar la técnica de microaglutinación directa, el antígeno se diluyó en PBS estéril a fin de obtener una dilución de $1,5 \times 10^9$ UFC/ml (tubo número 5 de la escala de Mac Farland) para *C. kutscheri* (4, 11) y una dilución $2,1 \times 10^9$ U.F.C./ml (tubo número 7) para *B. bronchiseptica* según concentración estándar (3)

Programa de inmunización

Antes de comenzar el programa de inmunización los antígenos se controlaron con un suero control positivo anti-*C. kutscheri* y anti-

B. bronchiseptica (NHI, Japón) respectivamente. Se utilizaron como animales de experimentación, dos conejos (cepa Californiana) convencionales controlados microbiológicamente y libres de *C. kutscheri* y *B. bronchiseptica* de 2 kg de peso. Los animales se mantuvieron durante toda la experiencia de acuerdo con las recomendaciones de NIH (National Institute of Health, Japón) para el cuidado y uso de animales de experimentación.

Para realizar el control serológico se extrajo una muestra de sangre (4 ml) por punción de la vena marginal de la oreja de ambos animales las que se dejaron durante 24 h a 4 °C. Se centrifugó a 3000 rpm para obtener suero, el que se inactivó a 56 °C durante 30 minutos.

En las inoculaciones por vía subcutánea se utilizó una solución del antígeno obtenido y Adyuvante Completo de Freund (Freund Adjuvant, Complete F5881. SIGMA) en proporción 1/1 (v/v).

Para inocular los antígenos en los animales se siguió un programa según Tabla 1.

A los 25 días de la finalización del programa de inmunización se controló el título de anticuerpos de los animales. Para ello se extrajo una muestra de sangre (4 ml) de cada animal por punción en la vena marginal de la oreja. Luego las muestras se dejaron a 4 °C durante 24 h y se centrifugaron a 3000 rpm para obtener el suero que se inactivó a 56 °C durante 30 min. A los 27 días de la finalización del programa de inmunización y posterior al control y obtención del título de anticuerpos necesario para la técnica de microaglutinación directa en placa (3, 4, 11) los conejos se anestesiaron con Diazepan (2 mg/kg i/m) dejando actuar la anestesia durante 15 min y por punción cardíaca se

realizó el sangrado a blanco para procesar la sangre y obtener el suero patrón.

Los antígenos producidos fueron controlados con los antisueros obtenidos en el desarrollo del trabajo mediante la prueba de microaglutinación directa en placa.

La reacción de microaglutinación en placa consiste en la unión de un antígeno soluble a un anticuerpo específico.

Para realizar la técnica de microaglutinación en placa se siguió la siguiente metodología:

-El suero problema se inactivó a 56 °C durante 30 minutos y se diluyó 1:5 con PBS (pH 7,2 - 0,01M).

-En una placa para microaglutinación se colocaron 100 µl de suero, en el primer pocillo de la hilera y en los restantes 50 µl de PBS.

-Del primer pocillo se tomaron 50 µl de suero y se realizaron diluciones 1:2, en forma seriada hasta completar la hilera (1/5; 1/10; 1/20 y 1/40).

-Luego se colocaron 50 µl de antígeno en todos los pocillos.

-La placa se incubó a temperatura ambiente en cámara húmeda durante 18 horas.

-Se realizó la lectura evaluando la presencia o ausencia de aglutinación formado por somas bacterianos microaglutinados.

Siempre se deben incluir controles de suero positivos y negativos para evaluar los resultados de la técnica.

RESULTADOS

El antígeno que se obtuvo fue de una dilución de $1,5 \times 10^9$ UFC/ml (tubo número 5 de la escala de Mac Farland) para *C. kutscheri* y una dilución $2,1 \times 10^9$ UFC/ml (tubo número 7) para

Tabla 1. Programa de Inmunización.
Table 1. Immunization program.

Día	Vía de inoculación	Concentración (mg/ml)	Volumen (ml)
1	SC	1	1
3	IV	0,613	0,5
5	IV	1,25	0,5
7	IV	2,5	0,5
9	IV	5,0	0,5
11	IV	10,0	0,5

SC=Subcutánea (se utilizó Adyuvante Completo de Freund (V/V) en la inoculación)
IV=Intravenosa (vena marginal de la oreja)

B. bronchiseptica (3, 4, 11).

Se realizó un control del antígeno con sueros de conejo, rata y ratón no inmunizados, libres de *C. kutscheri* y *B. bronchiseptica* arrojando resultados negativos en la técnica de microaglutinación directa en placa.

El título del suero inmune controlado mediante la misma técnica fue de 1/2560 para *C. kutscheri* y 1/5120 para *B. bronchiseptica*.

La confirmación de la prueba de microaglutinación directa en placa utilizando los antígenos y sueros positivos obtenidos durante la experiencia demostraron ser eficientes para el diagnóstico serológico de *C. kutscheri* y *B. bronchiseptica*.

DISCUSIÓN

Las exigencias internacionales referidas a la estandarización y definición microbiológica de los animales de laboratorio son cada vez más estrictas. La Cátedra de Animales de Laboratorio de la Facultad de Cs. Veterinarias está trabajando para implementar técnicas para el diagnóstico microbiológico de ratas y ratones de laboratorio que permitan ofrecer a los investigadores un servicio, hasta ahora inexistente en Argentina. La pureza de los antígenos producidos, la titulación de anticuerpos en los sueros que se obtuvieron para *C. kutscheri* y *B. bronchiseptica* y la puesta en marcha de la técnica de microaglutinación directa en placa para el diagnóstico serológico de estos patógenos contribuirán a complementar el diagnóstico microbiológico en los programas de control sanitario en colonias de animales de laboratorio y a estudiar la prevalencia de estas infecciones en los Bioterios de nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

1. Detmer A. Zoonoses. In: Svendsen, P., Hau, J. (eds). Handbook of Laboratory Animal Science. New York: CRC Press, Inc. 1994; p. 71-78.
2. Kazuaki M. Definition of Microbiological Status of Rats and Mice. Microbial and Phenotypic Definition of Rats and Mice. National Research Council. 1998; p. 24-25.
3. Ohder H, Wullenweber M. *Bordetella bronchiseptica* in Diagnostic Microbiology for Laboratory Animal. Kunstyr, I. Ed. Gustav Fischer, New York. 1972; p. 57.
4. Gilioli R. Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos. Campinas, Instituto de Biologia. UNICAMP 2003; Tese (Doutorado em Genética e Biologia Molecular, Área de Concentração: Microbiologia). p. 150.
5. Amao H, Komuui Y, Sugiyama M, Takahashi KW, Sawada T, Saito M. Natural habitats of *Corynebacterium kutscheri* in subclinically infected ICGN and DBA/2 strains of mice. Lab Anim Sci. 1995; 45(1): 11-14.
6. Amao H, Komuui Y, Sugiyama M, Takahashi KW, Sawada T, Saito M. Natural and subclinical *Corynebacterium kutscheri* infection in rats. Lab Anim Sci. 1995; 45(1): 11-14.
7. Barthold SW, Brownstein DG. The effect of selected viruses on *Corynebacterium kutscheri*. Lab Anim Sci. 1998; 30: 50-55.
8. Barthold SW, Brownstein DG, Adams RL, Terwilliger GA, Aftomis F. Experimental *Corynebacterium kutscheri* infection in rats: bacteriology and serology. Lab Anim Sci. 1985; 35(2): 135-138.
9. Fujiwara K, Tanishima Y, Shumita S. Seromonitoring of laboratory mouse and rat colonies for common murine pathogens. Exp Anim. 1979; 28: 297-306.
10. Fox JG, Niemi SM, Ackerman J, Murphy JC. Comparison of methods to diagnose an epizootic of *Corynebacterium kutscheri pneumoniae* in rats. Lab Anim Sci. 1987; 37(1): 72-75.
11. Suzuki E, Mochida K, Takayama S. Serological survey of *Corynebacterium kutscheri* infection in mice and rats. Exp Animal. 1986; 35: 485-489.

UNIFORM REQUIREMENTS FOR MANUSCRIPTS SUBMITTED TO BIOMEDICAL JOURNALS: WRITING AND EDITING FOR BIOMEDICAL PUBLICATION UPDATED NOVEMBER 2003

International Committee of Medical Journal Editors

I. Statement of Purpose

- A. About the Uniform Requirements
- B. Potential Users of the Uniform Requirements
- C. How to Use the Uniform Requirements

II. Ethical Considerations in the Conduct and Reporting of Research

- A. Authorship and Contributorship
 1. Byline Authors
 2. Contributors Listed in Acknowledgements
- B. Editorship
 1. The Role of the Editor
 2. Editorial Freedom
- C. Peer Review
- D. Conflicts of Interest
 1. Potential Conflicts of Interest Related to Individual Authors' Commitments
 2. Potential Conflicts of Interest Related to Project Support
 3. Potential Conflicts of Interest Related to Commitments of Editors, Journal Staff, or Reviewers

- E. Privacy and Confidentiality
 1. Patients and Study Participants
 2. Authors and Reviewers
- F. Protection of Human Subjects and Animals in Research

III. Publishing and Editorial Issues Related to Publication in Biomedical Journals

- A. Obligation to Publish Negative Studies
- B. Corrections, Retractions, and «Expressions of Concern»
- C. Copyright
- D. Overlapping Publications
 1. Duplicate Submission
 2. Redundant Publication
 3. Acceptable Secondary Publication
 4. Competing Manuscripts based on the Same Study
 - a. Differences in Analysis or Interpretation
 - b. Differences in Reported Methods or Results
 5. Competing Manuscripts Based on the Same Database
- E. Correspondence
- F. Supplements, Theme Issues, and Special Series
- G. Electronic Publishing
- H. Advertising
- I. Medical Journals and the General Media

IV. Manuscript Preparation and Submission

- A. Preparing a Manuscript for Submission to

Biomedical Journals

1. a. General Principles
 - b. Reporting Guidelines for Specific Study Designs
2. Title page
3. Conflict of Interest Notification Page
4. Abstract and Key Words
5. Introduction
6. Methods
 - a. Selection and Description of Participants
 - b. Technical Information
 - c. Statistics
7. Results
8. Discussion
9. References
 - a. General Considerations Related to References
 - b. Reference Style and Format
10. Tables
11. Illustrations (Figures)
12. Legends for Illustrations (Figures)
13. Units of Measurement
14. Abbreviations and Symbols

- B. Sending the Manuscript to the Journal

V. References

- A. Print References Cited in this Document
- B. Other Sources of Information Related to

Biomedical Journals

VI. About the International Committee of Medical Journal Editors

VII. Authors of the Uniform Requirements

VIII. Use, Distribution, and Translation of the Uniform Requirements

IX. Inquiries

I. STATEMENT OF PURPOSE

I. A. About the Uniform Requirements

A small group of editors of general medical journals met informally in Vancouver, British Columbia, in 1978 to establish guidelines for the format of manuscripts submitted to their journals. The group became known as the Vancouver Group. Its requirements for manuscripts, including formats for bibliographic references developed by the National Library of Medicine, were first published in 1979. The Vancouver Group expanded and evolved into the International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE), which meets annually. The ICMJE gradually has broadened its concerns to include ethical principles related to publication in biomedical journals.

The ICJME has produced multiple editions of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. Over the years, issues have arisen that go beyond manuscript preparation, resulting in the development of a number of Separate Statements on editorial policy. The entire Uniform Requirements document was revised in 1997; sections were updated in May 1999 and May 2000. In May 2001, the ICMJE revised the sections related to potential conflict of interest. For the present revision (2003), the committee revised and reorganized the entire document and incorporated the Separate Statements into the text.

The total content of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals may be reproduced for educational, not-for-profit purposes without regard for copyright; the committee encourages distribution of the material.

Journals that agree to use the Uniform Requirements are encouraged to state in their instructions to authors that their requirements are in accordance with the Uniform Requirements and to cite this version.

I.B. Potential Users of the Uniform Requirements

The ICMJE created the Uniform Requirements primarily to help authors and editors in their mutual task of creating and distributing accurate, clear, easily accessible reports of biomedical studies. The initial sections address the ethical principles related to the process of evaluating, improving, and publishing manuscripts in biomedical journals and the relationships between editors and authors, peer reviewers, and the media. The latter sections address the more technical aspects of preparing and submitting manuscripts. The ICMJE believes the entire document is relevant to the concerns of both authors and editors.

The Uniform Requirements can provide many other stakeholders - peer reviewers, publishers, the media, patients and their families, and general readers - with useful insights into the biomedical authoring and editing process.

I. C. How to Use the Uniform Requirements

The Uniform Requirements state the ethical principles in the conduct and reporting of research and provide recommendations relating to specific elements of editing and writing. These recommendations are based largely on the shared experience of a moderate number of editors and authors, collected over many years,

rather than on the results of methodical, planned investigation that aspires to be «evidence-based.» Wherever possible, recommendations are accompanied by a rationale that justifies them; as such, the document serves an educational purpose.

Authors will find it helpful to follow the recommendations in this document whenever possible because, as described in the explanations, doing so improves the quality and clarity of reporting in manuscripts submitted to any journal, as well as the ease of editing. At the same time, every journal has editorial requirements uniquely suited to its purposes. Authors therefore need to become familiar with the specific instructions to authors published by the journal they have chosen for their manuscript - for example, the topics suitable for that journal, and the types of papers that may be submitted (for example, original articles, reviews, or case reports) - and should follow those instructions. The Mulford Library at the Medical College of Ohio maintains a useful compendium of instructions to authors at www.mco.edu/lib/instr/libinsta.html.

II. ETHICAL CONSIDERATIONS IN THE CONDUCT AND REPORTING OF RESEARCH

II.A Authorship and Contributorship

II.A.1. Byline Authors

An «author» is generally considered to be someone who has made substantive intellectual contributions to a published study, and biomedical authorship continues to have important academic, social, and financial implications. (1) In the past, readers were rarely provided with information about contributions to studies from those listed as authors and in acknowledgments. (2) Some journals now request and publish information about the contributions of each person named as having participated in a submitted study, at least for original research. Editors are strongly encouraged to develop and implement a contributorship policy, as well as a policy on identifying who is responsible for the integrity of the work as a whole.

While contributorship and guarantorship policies obviously remove much of the ambiguity surrounding contributions, it leaves unresolved the question of the quantity and quality of contribution that qualify for authorship. The International Committee of Medical Journal Editors has recommended the following criteria for authorship; these criteria are still appropriate for those journals that distinguish

authors from other contributors.

Authorship credit should be based on 1) substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published. Authors should meet conditions 1, 2, and 3.

When a large, multi-center group has conducted the work, the group should identify the individuals who accept direct responsibility for the manuscript (3). These individuals should fully meet the criteria for authorship defined above and editors will ask these individuals to complete journal-specific author and conflict of interest disclosure forms. When submitting a group author manuscript, the corresponding author should clearly indicate the preferred citation and should clearly identify all individual authors as well as the group name. Journals will generally list other members of the group in the acknowledgements. The National Library of Medicine indexes the group name and the names of individuals the group has identified as being directly responsible for the manuscript.

Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group, alone, does not justify authorship.

All persons designated as authors should qualify for authorship, and all those who qualify should be listed.

Each author should have participated sufficiently in the work to take public responsibility for appropriate portions of the content.

Some journals now also request that one or more authors, referred to as «guarantors,» be identified as the persons who take responsibility for the integrity of the work as a whole, from inception to published article, and publish that information.

Increasingly, authorship of multi-center trials is attributed to a group. All members of the group who are named as authors should fully meet the above criteria for authorship.

The order of authorship on the byline should be a joint decision of the co-authors. Authors should be prepared to explain the order in which authors are listed.

II.A.2. Contributors Listed in Acknowledgments

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an acknowledgments section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assis-

tance, or a department chair who provided only general support. Financial and material support should also be acknowledged.

Groups of persons who have contributed materially to the paper but whose contributions do not justify authorship may be listed under a heading such as «clinical investigators» or «participating investigators,» and their function or contribution should be described - for example, «served as scientific advisors,» «critically reviewed the study proposal,» «collected data,» or «provided and cared for study patients.»

Because readers may infer their endorsement of the data and conclusions, all persons must give written permission to be acknowledged.

II.B Editorship

II.B.1. The Role of the Editor

The editor of a journal is the person responsible for its entire content. Owners and editors of medical journals have a common endeavor - the publication of a reliable and readable journal, produced with due respect for the stated aims of the journal and for costs. The functions of owners and editors, however, are different. Owners have the right to appoint and dismiss editors and to make important business decisions in which editors should be involved to the fullest extent possible. Editors must have full authority for determining the editorial content of the journal. This concept of editorial freedom should be resolutely defended by editors even to the extent of their placing their positions at stake. To secure this freedom in practice, the editor should have direct access to the highest level of ownership, not only to a delegated manager.

Editors of medical journals should have a contract that clearly states the editor's rights and duties in addition to the general terms of the appointment and that defines mechanisms for resolving conflict.

An independent editorial advisory board may be useful in helping the editor establish and maintain editorial policy.

II.B.2. Editorial Freedom

The ICMJE adopts the World Association of Medical Editors' definition of editorial freedom (<http://www.wame.org/wamestmt.htm>). This definition states that editorial freedom or independence is the concept that editors-in-chief should have full authority over the editorial content of their journal. Journal owners should not interfere in the evaluation; selection or editing of individual articles either di-

rectly or by creating an environment that strongly influences decisions. Editors should base decisions on the validity of the work and its importance to the journal's readers not on the commercial success of the journal. Editors should be free to express critical but responsible views about all aspects of medicine without fear of retribution, even if these views might conflict with the commercial goals of the publisher. Editors and editors' organizations have the obligation to support the concept of editorial freedom and to draw major transgressions of such freedom to the attention of the international medical, academic, and lay communities.

II.C. PEER REVIEW

Unbiased, independent, critical assessment is an intrinsic part of all scholarly work, including the scientific process. Peer review is the critical assessment of manuscripts submitted to journals by experts who are not part of the editorial staff. Peer review can therefore be viewed as an important extension of the scientific process. Although its actual value has been little studied, and is widely debated (4), peer review helps editors decide which manuscripts are suitable for their journals, and helps authors and editors in their efforts to improve the quality of reporting. A peer-reviewed journal is one that submits most of its published research articles for outside review. The number and kind of manuscripts sent for review, the number of reviewers, the reviewing procedures, and the use made of the reviewers' opinions may vary. In the interests of transparency, each journal should publicly disclose its policies in its instructions to authors.

II.D. CONFLICTS OF INTEREST

Public trust in the peer review process and the credibility of published articles depend in part on how well conflict of interest is handled during writing, peer review, and editorial decision making. Conflict of interest exists when an author (or the author's institution), reviewer, or editor has financial or personal relationships that inappropriately influence (bias) his or her actions (such relationships are also known as dual commitments, competing interests, or competing loyalties). These relationships vary from those with negligible potential to those with great potential to influence judgment, and not all relationships represent true conflict of interest. The potential for conflict of interest can exist whether or not an individual believes that the relationship affects his or her scientific judg-

ment. Financial relationships (such as employment, consultancies, stock ownership, honoraria, paid expert testimony) are the most easily identifiable conflicts of interest and the most likely to undermine the credibility of the journal, the authors, and of science itself. However, conflicts can occur for other reasons, such as personal relationships, academic competition, and intellectual passion.

All participants in the peer review and publication process must disclose all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. Disclosure of these relationships is also important in connection with editorials and review articles, because it is can be more difficult to detect bias in these types of publications than in reports of original research. Editors may use information disclosed in conflict of interest and financial interest statements as a basis for editorial decisions. Editors should publish this information if they believe it is important in judging the manuscript.

II.D.1. Potential Conflicts of Interest Related to Individual Authors' Commitments

When authors submit a manuscript, whether an article or a letter, they are responsible for disclosing all financial and personal relationships that might bias their work. To prevent ambiguity, authors must state explicitly whether potential conflicts do or do not exist. Authors should do so in the manuscript on a conflict of interest notification page that follows the title page, providing additional detail, if necessary, in a cover letter that accompanies the manuscript. (See Section IV.A.3. Conflict of Interest Notification Page)

Investigators must disclose potential conflicts to study participants and should state in the manuscript whether they have done so.

Editors also need to decide when to publish information disclosed by authors about potential conflicts. If doubt exists, it is best to err on the side of publication.

II.D.2. Potential Conflicts of Interest Related to Project Support

Increasingly, individual studies receive funding from commercial firms, private foundations, and government. The conditions of this funding have the potential to bias and otherwise discredit the research.

Scientists have an ethical obligation to submit creditable research results for publica-

tion. Moreover, as the persons directly responsible for their work, researchers should not enter into agreements that interfere with their access to the data and their ability to analyze it independently, to prepare manuscripts, and to publish them. Authors should describe the role of the study sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis, and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the report for publication. If the supporting source had no such involvement, the authors should so state. Biases potentially introduced when sponsors are directly involved in research are analogous to methodological biases of other sorts. Some journals, therefore, choose to include information about the sponsor's involvement in the methods section.

Editors may request that authors of a study funded by an agency with a proprietary or financial interest in the outcome sign a statement such as, «I had full access to all of the data in this study and I take complete responsibility for the integrity of the data and the accuracy of the data analysis.» Editors should be encouraged to review copies of the protocol and/or contracts associated with project-specific studies before accepting such studies for publication. Editors may choose not to consider an article if a sponsor has asserted control over the authors' right to publish.

II.D.3. Potential Conflicts of Interest Related to Commitments of Editors, Journal Staff, or Reviewers

Editors should avoid selecting external peer reviewers with obvious potential conflicts of interest, for example, those who work in the same department or institution as any of the authors. Authors often provide editors with the names of persons they feel should not be asked to review a manuscript because of potential conflicts of interest, usually professional. When possible, authors should be asked to explain or justify their concerns; that information is important to editors in deciding whether to honor such requests.

Reviewers must disclose to editors any conflicts of interest that could bias their opinions of the manuscript, and they should disqualify themselves from reviewing specific manuscripts if they believe it to be appropriate. As in the case of authors, silence on the part of reviewers concerning potential conflicts may mean either that such conflicts exist that they have failed to disclose, or that conflicts do not exist. Reviewers must therefore also be asked

to state explicitly whether conflicts do or do not exist. Reviewers must not use knowledge of the work, before its publication, to further their own interests.

Editors who make final decisions about manuscripts must have no personal, professional, or financial involvement in any of the issues they might judge. Other members of the editorial staff, if they participate in editorial decisions, must provide editors with a current description of their financial interests (as they might relate to editorial judgments) and disqualify themselves from any decisions where they have a conflict of interest. Editorial staff must not use the information gained through working with manuscripts for private gain. Editors should publish regular disclosure statements about potential conflicts of interests related to the commitments of journal staff.

II.E. Privacy and Confidentiality

II. E.1. Patients and Study Participants

Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information, including patients' names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that a patient who is identifiable be shown the manuscript to be published.

Identifying details should be omitted if they are not essential. Complete anonymity is difficult to achieve, however, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity. If data are changed to protect anonymity, authors should provide assurance that alterations of the data do not distort scientific meaning.

The requirement for informed consent should be included in the journal's instructions for authors. When informed consent has been obtained it should be indicated in the published article.

II.E.2. Authors and Reviewers

Manuscripts must be reviewed with due respect for authors' confidentiality. In submitting their manuscripts for review, authors entrust editors with the results of their scientific work and creative effort, on which their reputa-

tion and career may depend. Authors' rights may be violated by disclosure of the confidential details of the review of their manuscript. Reviewers also have rights to confidentiality, which must be respected by the editor. Confidentiality may have to be breached if dishonesty or fraud is alleged but otherwise must be honored.

Editors must not disclose information about manuscripts (including their receipt, content, status in the reviewing process, criticism by reviewers, or ultimate fate) to anyone other than the authors and reviewers. This includes requests to use the materials for legal proceedings.

Editors must make clear to their reviewers that manuscripts sent for review are privileged communications and are the private property of the authors. Therefore, reviewers and members of the editorial staff must respect the authors' rights by not publicly discussing the authors' work or appropriating their ideas before the manuscript is published. Reviewers must not be allowed to make copies of the manuscript for their files and must be prohibited from sharing it with others, except with the permission of the editor. Reviewers should return or destroy copies of manuscripts after submitting reviews. Editors should not keep copies of rejected manuscripts.

Reviewer comments should not be published or otherwise made public without permission of the reviewer, author, and editor.

Opinions differ on whether reviewers should remain anonymous. Authors should consult the information for authors of the journal they have chosen to learn whether the reviews are anonymous. When comments are not signed the reviewers' identity must not be revealed to the author or anyone else without the reviewer's permission.

Some journals publish reviewers' comments with the manuscript. No such procedure should be adopted without the consent of the authors and reviewers. However, reviewers' comments should be sent to other reviewers of the same manuscript, which helps reviewers learn from the review process, and reviewers may be notified of the editor's decision.

II.F. Protection of Human Subjects and Animals in Research

When reporting experiments on human subjects, authors should indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional

and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2000 (5). If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, the authors must explain the rationale for their approach, and demonstrate that the institutional review body explicitly approved the doubtful aspects of the study. When reporting experiments on animals, authors should be asked to indicate whether the institutional and national guide for the care and use of laboratory animals was followed.

III. PUBLISHING AND EDITORIAL ISSUES RELATED TO PUBLICATION IN BIOMEDICAL JOURNALS

III.A. Obligation to Publish Negative Studies

Editors should consider seriously for publication any carefully done study of an important question, relevant to their readers, whether the results are negative (that is, convincingly allow the null hypothesis to be accepted) or positive (that is, allow the null hypothesis to be rejected). Failure to submit or publish negative studies, in particular, contributes to publication bias. Many studies that purport to be negative are, in fact, inconclusive; publication of inconclusive studies is problematic, since they add little to biomedical knowledge and consume journal resources. The Cochrane Library may be interested in publishing inconclusive trials (www.cochrane.org).

III.B. Corrections, Retractions and «Expressions of Concern»

Editors must assume initially that authors are reporting work based on honest observations. Nevertheless, two types of difficulty may arise.

First, errors may be noted in published articles that require the publication of a correction or erratum of part of the work. The corrections should appear on a numbered page, be listed in the contents page, include the complete original citation, and link to the original article and vice versa if online. It is conceivable that an error could be so serious as to vitiate the entire body of the work, but this is unlikely and should be handled by editors and authors on an individual basis. Such an error should not be confused with inadequacies exposed by the emergence of new scientific information in the normal course of research. The latter require no corrections or withdrawals.

The second type of difficulty is scientific fraud. If substantial doubts arise about the honesty or integrity of work, either submitted or published, it is the editor's responsibility to ensure that the question is appropriately pursued, usually by the authors' sponsoring institution. However, it is not ordinarily the task of editors to conduct a full investigation or to make a determination; that responsibility lies with the institution where the work was done or with the funding agency. The editor should be promptly informed of the final decision, and if a fraudulent paper has been published, the journal must print a retraction. If this method of investigation does not result in a satisfactory conclusion, the editor may choose to conduct his or her own investigation. As an alternative to retraction, the editor may choose to publish an expression of concern about aspects of the conduct or integrity of the work.

The retraction or expression of concern, so labeled, should appear on a numbered page in a prominent section of the print journal as well as in the online version, be listed in the contents page, and include in its heading the title of the original article. It should not simply be a letter to the editor. Ideally, the first author should be the same in the retraction as in the article, although under certain circumstances the editor may accept retractions by other responsible persons. The text of the retraction should explain why the article is being retracted and include a full original citation reference to it.

The validity of previous work by the author of a fraudulent paper cannot be assumed. Editors may ask the author's institution to assure them of the validity of earlier work published in their journals or to retract it. If this is not done editors may choose to publish an announcement expressing concern that the validity of previously published work is uncertain.

III.C. Copyright

Many biomedical journals ask authors to transfer copyright to the journal. However, an increasing number of «open access» journals do not require authors to transfer copyright to the journal. Editors should make their position on copyright transfer clear to authors and to others who might be interested in using editorial content from their journals. The copyright status of articles in a given journal can vary: some content cannot be copyrighted (articles written by employees of the U.S. and some other governments in the course of their work, for example); editors may agree to waive copyright

on others; still others may be protected under serial rights (that is, use in publications other than journals, including electronic publications, is permitted).

III.D. Overlapping Publications

III.D.1. Duplicate Submission

Most biomedical journals will not consider manuscripts that are simultaneously being considered by other journals. Among the principal considerations that have led to this policy are: 1) the potential for disagreement when two (or more) journals claim the right to publish a manuscript that has been submitted simultaneously to more than one; and 2) the possibility that two or more journals will unknowingly and unnecessarily undertake the work of peer review and editing of the same manuscript, and publish same article.

However, editors of different journals may decide to simultaneously or jointly publish an article if they believe that doing so would be in the best interest of the public's health.

III.D.2. Redundant Publication

Redundant (or duplicate) publication is publication of a paper that overlaps substantially with one already published in print or electronic media.

Readers of primary source periodicals, whether print or electronic, deserve to be able to trust that what they are reading is original unless there is a clear statement that the article is being republished by the choice of the author and editor. The bases of this position are international copyright laws, ethical conduct, and cost-effective use of resources. Duplicate publication of original research is particularly problematic, since it can result in inadvertent double counting or inappropriate weighting of the results of a single study, which distorts the available evidence.

Most journals do not wish to receive papers on work that has already been reported in large part in a published article or is contained in another paper that has been submitted or accepted for publication elsewhere, in print or in electronic media. This policy does not preclude the journal considering a paper that has been rejected by another journal, or a complete report that follows publication of a preliminary report, such as an abstract or poster displayed at a professional meeting. Nor does it prevent journals considering a paper that has been presented at a scientific meeting but not published in full or that is being considered for publica-

tion in a proceedings or similar format. Press reports of scheduled meetings will not usually be regarded as breaches of this rule, but additional data or copies of tables and illustrations should not amplify such reports.

When submitting a paper, the author must always make a full statement to the editor about all submissions and previous reports that might be regarded as redundant or duplicate publication of the same or very similar work. The author must alert the editor if the manuscript includes subjects about which the authors have published a previous report or have submitted a related report to another publication. Any such report must be referred to and referenced in the new paper. Copies of such material should be included with the submitted paper to help the editor decide how to handle the matter.

If redundant or duplicate publication is attempted or occurs without such notification, authors should expect editorial action to be taken. At the least, prompt rejection of the submitted manuscript should be expected. If the editor was not aware of the violations and the article has already been published, then a notice of redundant or duplicate publication will probably be published with or without the author's explanation or approval.

Preliminary reporting to public media, governmental agencies, or manufacturers, of scientific information described in a paper or a letter to the editor that has been accepted but not yet published violates the policies of many journals. Such reporting may be warranted when the paper or letter describes major therapeutic advances or public health hazards such as serious adverse effects of drugs, vaccines, other biological products, or medicinal devices, or reportable diseases. This reporting should not jeopardize publication, but should be discussed with and agreed upon by the editor in advance.

III.D.3. Acceptable Secondary Publication

Certain types of articles, such as guidelines produced by governmental agencies and professional organizations, may need to reach the widest possible audience. In such instances, editors sometimes choose deliberately to publish material that is also being published in other journals, with the agreement of the authors and the editors of those other journals. Secondary publication for various other reasons, in the same or another language, especially in other countries, is justifiable, and can be ben-

eficial, provided all of the following conditions are met.

1. The authors have received approval from the editors of both journals; the editor concerned with secondary publication must have a photocopy, reprint, or manuscript of the primary version.

2. The priority of the primary publication is respected by a publication interval of at least one week (unless specifically negotiated otherwise by both editors).

3. The paper for secondary publication is intended for a different group of readers; an abbreviated version could be sufficient.

4. The secondary version faithfully reflects the data and interpretations of the primary version.

5. The footnote on the title page of the secondary version informs readers, peers, and documenting agencies that the paper has been published in whole or in part and states the primary reference. A suitable footnote might read: «This article is based on a study first reported in the [title of journal, with full reference].»

Permission for such secondary publication should be free of charge.

III.D.4. Competing Manuscripts Based on the Same Study

Publication of manuscripts to air co-investigators disputes may waste journal space and confuse readers. On the other hand, if editors knowingly publish a manuscript written by only some of a collaborating team, they could be denying the rest of the team their legitimate co authorship rights; they could also be denying the journal's readers access to legitimate differences of opinion about the interpretation of a study.

Two kinds of competing submissions are considered: submissions by coworkers who disagree on the analysis and interpretation of their study, and submissions by coworkers who disagree on what the facts are and which data should be reported.

Setting aside the unresolved question of ownership of the data, the following general observations may help editors and others dealing with these problems.

III. D.4.a. Differences in Analysis or Interpretation

If the dispute centers on the analysis or interpretation of data, the authors should submit a manuscript that clearly presents both

versions. The difference of opinion should be explained in a cover letter. The normal process of peer and editorial review of the manuscript may help the authors to resolve their disagreement regarding analysis or interpretation.

If the dispute cannot be resolved and the study merits publication, both versions should be published. Options include publishing two papers on the same study, or a single paper with two analyses or interpretations. In such cases it would be appropriate for the editor to publish a statement outlining the disagreement and the journal's involvement in attempts to resolve it.

III.D.4. b. Differences in Reported Methods or Results

If the dispute centers on differing opinions of what was actually done or observed during the study, the journal editor should refuse publication until the disagreement is resolved. Peer review cannot be expected to resolve such problems. If there are allegations of dishonesty or fraud, editors should inform the appropriate authorities; authors should be notified of an editor's intention to report a suspicion of research misconduct.

III.D.5. Competing Manuscripts Based on the Same Database

Editors sometimes receive manuscripts from separate research groups that have analyzed the same data set, e.g., from a public database. The manuscripts may differ in their analytic methods, conclusions, or both. Each manuscript should be considered separately. Where interpretations of the same data are very similar, it is reasonable but not necessary for editors to give preference to the manuscript that was received earlier. However, editorial consideration of multiple submissions may be justified in this circumstance, and there may even be a good reason for publishing more than one manuscript because different analytical approaches may be complementary and equally valid.

III.E. Correspondence

Biomedical journals should provide its readership with a mechanism for submitting comments, questions, or criticisms about published articles, as well as brief reports and commentary unrelated to previously published articles. This will likely, but not necessarily, take the form of a correspondence section or column.

The authors of articles discussed in correspondence should be given an opportunity to respond, preferably in the same issue in which the original correspondence appears. Authors of correspondence should be asked to declare any competing or conflicting interests.

Published correspondence may be edited for length, grammatical correctness, and journal style. Alternatively, editors may choose to publish correspondence unedited for length or style, as for example in rapid response sections on the Internet; the journal should declare its editorial practice in this regard. Authors should approve editorial changes that alter the substance or tone of a letter or response.

Although editors have the prerogative to sift out correspondence material that is irrelevant, uninteresting, or lacking in cogency, they have a responsibility to allow a range of opinion to be expressed. The correspondence column should not be used merely to promote the journal's, or the editors', point of view. In all instances, editors must make an effort to screen out discourteous, inaccurate, or libelous statements, and should not allow ad hominem arguments intended to discredit opinions or findings.

In the interests of fairness and to keep correspondence within manageable proportions, journals may want to set time limits for responding to articles and correspondence, and for debate on a given topic. Journals should also decide whether they would notify authors when correspondence bearing on their published work is going to appear in standard or rapid response sections. Journals should also set policy with regard to the archiving of unedited correspondence that appears on line. These policies should be published both in print and electronic versions of the journal.

III.F. Supplements, Theme Issues, and Special Series

Supplements are collections of papers that deal with related issues or topics, are published as a separate issue of the journal or as part of a regular issue, and are usually funded by sources other than the journal's publisher. Supplements can serve useful purposes: education, exchange of research information, ease of access to focused content, and improved cooperation between academic and corporate entities. Because funding sources can bias the content of supplements through the choice of topics and viewpoints, journals should consider adopting the following principles. These same principles ap-

ply to theme issues or special series that have external funding and/or guest editors.

1. The journal editor must take full responsibility for the policies, practices, and content of supplements, including complete control of the decision to publish all portions of the supplement. Editing by the funding organization should not be permitted.

2. The journal editor must retain the authority to send supplement manuscripts for external peer review and to reject manuscripts submitted for the supplement. These conditions should be made known to authors and external supplement editors before beginning editorial work on the supplement.

3. The journal editor must approve the appointment of any external editor of the supplement and take responsibility for the work of the external editor.

4. The sources of funding for the research, publication, and the products the funding source make that are considered in the supplement should be clearly stated and prominently located in the supplement, preferably on each page. Whenever possible, funding should come from more than one sponsor.

5. Advertising in supplements should follow the same policies as those of the rest of the journal.

6. Journal editors must enable readers to distinguish readily between ordinary editorial pages and supplement pages.

7. Journal editors and supplement editors must not accept personal favors or personal remuneration from sponsors of supplements.

8. Secondary publication in supplements (republication of papers previously published elsewhere) should be clearly identified by the citation of the original paper. Supplements should avoid redundant or duplicate publication. Supplements should not republish research results, but the republication of guidelines or other material in the public interest might be appropriate.

9. The principles of authorship and potential conflict of interest disclosure articulated elsewhere in this document should apply to supplements.

III.G. ELECTRONIC PUBLISHING

Most biomedical journals are now published in electronic as well as print versions, and some are published in electronic form only. Electronic publishing (which includes the Internet) is publishing. In the interests of clarity and consistency, the medical and health information published on the Internet should fol-

low the recommendations in this document whenever possible.

The nature of electronic publication requires some special considerations, both within and beyond this document. At a minimum, websites should indicate the following: names, appropriate credentials, affiliations, and relevant conflicts of interest of editors, authors, and contributors; documentation and attribution of references and sources for all content; information about copyright; disclosure of site ownership; and disclosure of sponsorship, advertising, and commercial funding.

Linking from one health or medical Internet site to another may be perceived as an implicit recommendation of the quality of the second site. Journals thus should exercise caution in linking to other sites; when users are linking to another site, it may be helpful to provide an explicit message to that they are leaving the journal's site. If links to other sites are posted as a result of financial considerations, such should be clearly indicated. All dates of content posting and updating should be indicated. In electronic layout as in print, advertising and promotional messages should not be juxtaposed with editorial content, and commercial content should be clearly identifiable as such.

Electronic publication is an area that is in flux. Editors should develop, make available to authors, and implement policies on issues unique to electronic publishing. These issues include archiving, error correction, version control, and choice of the electronic or print version of the journal as the journal of record, publication of ancillary material, and electronic publication

III.H. Advertising

Most medical journals carry advertising, which generates income for their publishers, but advertising must not be allowed to influence editorial decisions. Journals should have formal, explicit, written policies for advertising in both print and electronic versions; website advertising policy should parallel policy for the print version as much as possible. Editors must have full and final authority for approving advertisements and enforcing advertising policy. Where independent bodies for reviewing advertising exist editors should make use of their judgments.

Readers should be able to distinguish readily between advertising and editorial material. The juxtaposition of editorial and advertising material on the same products or subjects

should be avoided. Interleaving advertising pages within articles discourages readers by interrupting the flow of editorial content, and should be discouraged. Advertising should not be sold on the condition that it will appear in the same issue as a particular article.

Journals should not be dominated by advertising, but editors should be careful about publishing advertisements from only one or two advertisers, as readers may perceive that these advertisers have influenced the editor.

Journals should not carry advertisements for products that have proved to be seriously harmful to health—for example, tobacco. Editors should ensure that existing regulatory or industry standards for advertisements specific to their country are enforced, or develop their own standards. The interests of organizations or agencies should not control classified and other non-display advertising, except where required by law. Finally, editors should consider all criticisms of advertisements for publication.

III. I. Medical Journals and the General Media

The public's interest in news of medical research has led the popular media to compete vigorously to get information about research as soon as possible. Researchers and institutions sometimes encourage the reporting of research in the non-medical media before full publication in a scientific journal by holding a press conference or giving interviews.

The public is entitled to important medical information without unreasonable delay, and editors have a responsibility to play their part in this process. Biomedical journals are published primarily for their readers, but the general public has a legitimate interest in their content; an appropriate balance should therefore guide journals' interaction with the media between these complementary interests. Doctors in practice need to have reports available in full detail before they can advise their patients about the reports' conclusions. Moreover, media reports of scientific research before the work has been peer reviewed and fully published may lead to the dissemination of inaccurate or premature conclusions.

An embargo system has been established in some countries to prevent publication of stories in the general media before the original paper on which they are based appears in the journal. The embargo creates a «level playing field,» which most reporters appreciate since it minimizes the pressure on them to publish sto-

ries which they have not had time to prepare carefully. Consistency in the timing of public release of biomedical information is also important in minimizing economic chaos, since some articles contain information that has great potential to influence financial markets. On the other hand, the embargo system has been challenged as being self-serving of journals' interests, and impeding the rapid dissemination of scientific information.

Editors may find the following recommendations useful as they seek to establish policies on these issues.

Editors can foster the orderly transmission of medical information from researchers, through peer-reviewed journals, to the public. This can be accomplished by an agreement with authors that they will not publicize their work while their manuscript is under consideration or awaiting publication and an agreement with the media that they will not release stories before publication in the journal, in return for which the journal will cooperate with them in preparing accurate stories.

Editors need to keep in mind that an embargo system works on the honor system; no formal enforcement or policing mechanism exists. The decision of any significant number of media outlets, or of biomedical journals, not to respect the embargo system would therefore lead to its rapid dissolution.

Very little medical research has such clear and urgently important clinical implications for the public's health that the news must be released before full publication in a journal. In such exceptional circumstances, however, appropriate authorities responsible for public health should make the decision and should be responsible for the advance dissemination of information to physicians and the media. If the author and the appropriate authorities wish to have a manuscript considered by a particular journal, the editor should be consulted before any public release. If editors accept the need for immediate release, they should waive their policies limiting prepublication publicity.

Policies designed to limit prepublication publicity should not apply to accounts in the media of presentations at scientific meetings or to the abstracts from these meetings (see Redundant Publication). Researchers who present their work at a scientific meeting should feel free to discuss their presentations with reporters, but they should be discouraged from offering more detail about their study than was presented in their talk.

When an article is soon to be published, editors should help the media prepare accurate reports by providing news releases, answering questions, supplying advance copies of the journal, or referring reporters to the appropriate experts. Most responsible reporters find this assistance should be contingent on the media's cooperation in timing their release of stories to coincide with the publication of the article.

Editors, authors, and the media should apply the above stated principles to material released early in electronic versions of journals.

IV. MANUSCRIPT PREPARATION AND SUBMISSION

IV.A. Preparing a Manuscript for Submission to a Biomedical Journal

Editors and reviewers spend many hours reading manuscripts, and therefore appreciate receiving with manuscripts that are easy to read and edit. Much of the information in journals' instructions to authors is designed to accomplish that goal in ways that meet each journal's particular editorial needs. The guidance that follows provides a general background and rationale for preparing manuscripts for any journal.

IV.A.1.a. General Principles

The text of observational and experimental articles is usually (but not necessarily) divided into sections with the headings Introduction, Methods, Results, and Discussion. This so-called «IMRAD» structure is not simply an arbitrary publication format, but rather a direct reflection of the process of scientific discovery. Long articles may need subheadings within some sections (especially the Results and Discussion sections) to clarify their content. Other types of articles, such as case reports, reviews, and editorials, are likely to need other formats.

Publication in electronic formats has created opportunities for adding details or whole sections in the electronic version only, layering information, cross-linking or extracting portions of articles, and the like. Authors need to work closely with editors in developing or using such new publication formats and should submit material for potential supplementary electronic formats for peer review.

Double spacing of all portions of the manuscript - including the title page, abstract, text, acknowledgments, references, individual tables, and legends - and generous margins make it possible for editors and reviewers to

edit the text line by line, and add comments and queries, directly on the paper copy. If manuscripts are submitted electronically, the files should be double spaced, because the manuscript may need to be printed out for reviewing and editing.

During the editorial process reviewers and editors frequently need to refer to specific portions of the manuscript, which is difficult unless the pages are numbered. Authors should therefore number all of the pages of the manuscript consecutively, beginning with the title page.

IV.A.1.b. Reporting Guidelines for Specific Study Designs

Research reports frequently omit important information. The general requirements listed in the next section relate to reporting essential elements for all study designs. Authors are encouraged in addition to consult reporting guidelines relevant to their specific research design. For reports of randomized controlled trials authors should refer to the CONSORT statement (www.consort-statement.org). This guideline provides a set of recommendations comprising a list of items to report and a patient flow diagram. Reporting guidelines have also been developed for a number of other study designs that some journals may ask authors to follow. Authors should consult the information for authors of the journal they have chosen.

IV.A.2. Title Page

The title page should carry the following information:

1. The title of the article. Concise titles are easier to read than long, convoluted ones. Titles that are too short may, however, lack important information, such as study design (which is particularly important in identifying randomized controlled trials). Authors should include all information in the title that will make electronic retrieval of the article both sensitive and specific.

2. Authors' names and institutional affiliations. Some journals publish each author's highest academic degree(s), while others do not.

3. The name of the department(s) and institution(s) to which the work should be attributed.

4. Disclaimers, if any.

5. Corresponding authors. The name, mailing address, telephone and fax numbers, and e-mail address of the author responsible for correspondence about the manuscript (the «corresponding author;» this author may or may

not be the «guarantor» for the integrity of the study as a whole, if someone is identified in that role. The corresponding author should indicate clearly whether his or her e-mail address is to be published.

6. The name and address of the author to whom requests for reprints should be addressed or a statement that reprints will not be available from the authors.

7. Source(s) of support in the form of grants, equipment, drugs, or all of these.

8. A running head. Some journals request a short running head or foot line, usually of no more than 40 characters (count letters and spaces) at the foot of the title page. Running heads are published in most journals, but are also sometimes used within the editorial office for filing and locating manuscripts.

9. Word counts. A word count for the text only (excluding abstract, acknowledgments, figure legends, and references) allows editors and reviewers to assess whether the information contained in the paper warrants the amount of space devoted to it, and whether the submitted manuscript fits within the journal's word limits. A separate word count for the Abstract is also useful for the same reason.

10. The number of figures and tables. It is difficult for editorial staff and reviewers to tell if the figures and tables that should have accompanied a manuscript were actually included unless the numbers of figures and tables that belong to the manuscript are noted on the title page.

IV.A.3. Conflict of Interest Notification Page

To prevent the information on potential conflict of interest for authors from being overlooked or misplaced, it is necessary for that information to be part of the manuscript. It should therefore also be included on a separate page or pages immediately following the title page. However, individual journals may differ in where they ask authors to provide this information and some journals do not send information on conflicts of interest to reviewers. (See Section II.D. Conflicts of Interest)

IV.A.4. Abstract and Key Words

An abstract (requirements for length and structured format vary by journal) should follow the title page. The abstract should provide the context or background for the study and should state the study's purposes, basic procedures (selection of study subjects or laboratory

animals, observational and analytical methods), main findings (giving specific effect sizes and their statistical significance, if possible), and principal conclusions. It should emphasize new and important aspects of the study or observations.

Because abstracts are the only substantive portion of the article indexed in many electronic databases, and the only portion many readers read, authors need to be careful that abstracts reflect the content of the article accurately. Unfortunately, many abstracts disagree with the text of the article (6). The format required for structured abstracts differs from journal to journal, and some journals use more than one structure; authors should make it a point prepare their abstracts in the format specified by the journal they have chosen.

Some journals request that, following the abstract, authors provide, and identify as such, 3 to 10 key words or short phrases that capture the main topics of the article. These will assist indexers in cross-indexing the article and may be published with the abstract. Terms from the Medical Subject Headings (MeSH) list of Index Medicus should be used; if suitable MeSH terms are not yet available for recently introduced terms, present terms may be used.

IV.A.5. Introduction

Provide a context or background for the study (i.e., the nature of the problem and its significance). State the specific purpose or research objective of, or hypothesis tested by, the study or observation; the research objective is often more sharply focused when stated as a question. Both the main and secondary objectives should be made clear, and any pre-specified subgroup analyses should be described. Give only strictly pertinent references and do not include data or conclusions from the work being reported.

IV.A.6. Methods

The Methods section should include only information that was available at the time the plan or protocol for the study was written; all information obtained during the conduct of the study belongs in the Results section.

IV.A.6.a. Selection and Description of Participants

Describe your selection of the observational or experimental participants (patients or laboratory animals, including controls) clearly,

including eligibility and exclusion criteria and a description of the source population. Because the relevance of such variables as age and sex to the object of research is not always clear, authors should explain their use when they are included in a study report; for example, authors should explain why only subjects of certain ages were included or why women were excluded. The guiding principle should be clarity about how and why a study was done in a particular way. When authors use variables such as race or ethnicity, they should define how they measured the variables and justify their relevance.

IV.A.6.b. Technical information

Identify the methods, apparatus (give the manufacturer's name and address in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Give references to established methods, including statistical methods (see below); provide references and brief descriptions for methods that have been published but are not well known; describe new or substantially modified methods, give reasons for using them, and evaluate their limitations. Identify precisely all drugs and chemicals used, including generic name(s), dose(s), and route(s) of administration.

Authors submitting review manuscripts should include a section describing the methods used for locating, selecting, extracting, and synthesizing data. These methods should also be summarized in the abstract.

IV.A.6.c. Statistics

Describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. When possible, quantify findings and present them with appropriate indicators of measurement error or uncertainty (such as confidence intervals). Avoid relying solely on statistical hypothesis testing, such as the use of P values, which fails to convey important information about effect size. References for the design of the study and statistical methods should be to standard works when possible (with pages stated). Define statistical terms, abbreviations, and most symbols. Specify the computer software used.

IV.A.7. Results

Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations, giving the main or most important findings first. Do not repeat in the text all the data in the tables or

illustrations; emphasize or summarize only important observations. Extra or supplementary materials and technical detail can be placed in an appendix where it will be accessible but will not interrupt the flow of the text; alternatively, it can be published only in the electronic version of the journal.

When data are summarized in the Results section, give numeric results not only as derivatives (for example, percentages) but also as the absolute numbers from which the derivatives were calculated, and specify the statistical methods used to analyze them. Restrict tables and figures to those needed to explain the argument of the paper and to assess its support. Use graphs as an alternative to tables with many entries; do not duplicate data in graphs and tables. Avoid non-technical uses of technical terms in statistics, such as «random» (which implies a randomizing device), «normal,» «significant,» «correlations,» and «sample.»

Where scientifically appropriate, analyses of the data by variables such as age and sex should be included.

IV.A.8. Discussion

Emphasize the new and important aspects of the study and the conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data or other material given in the Introduction or the Results section. For experimental studies it is useful to begin the discussion by summarizing briefly the main findings, then explore possible mechanisms or explanations for these findings, compare and contrast the results with other relevant studies, state the limitations of the study, and explore the implications of the findings for future research and for clinical practice.

Link the conclusions with the goals of the study but avoid unqualified statements and conclusions not adequately supported by the data. In particular, authors should avoid making statements on economic benefits and costs unless their manuscript includes the appropriate economic data and analyses. Avoid claiming priority and alluding to work that has not been completed. State new hypotheses when warranted, but clearly label them as such.

IV.A.9. References

IV.A.9.a. General Considerations Related to References

Although references to review articles can be an efficient way of guiding readers to a body of literature, review articles do not always reflect original work accurately. Readers should

therefore be provided with direct references to original research sources whenever possible. On the other hand, extensive lists of references to original work on a topic can use excessive space on the printed page. Small numbers of references to key original papers will often serve as well as more exhaustive lists, particularly since references can now be added to the electronic version of published papers, and since electronic literature searching allows readers to retrieve published literature efficiently.

Avoid using abstracts as references. References to papers accepted but not yet published should be designated as «in press» or «forthcoming»; authors should obtain written permission to cite such papers as well as verification that they have been accepted for publication. Information from manuscripts submitted but not accepted should be cited in the text as «unpublished observations» with written permission from the source.

Avoid citing a «personal communication» unless it provides essential information not available from a public source, in which case the name of the person and date of communication should be cited in parentheses in the text. For scientific articles, authors should obtain written permission and confirmation of accuracy from the source of a personal communication.

Some journals check the accuracy of all reference citations, but not all journals do so, and citation errors sometimes appear in the published version of articles. To minimize such errors, authors should therefore verify references against the original documents.

IV.A.9.b. Reference Style and Format

The Uniform Requirements style is based largely on an ANSI standard style adapted by the National Library of Medicine (NLM) for its databases. (7) For samples of reference citation formats, authors should consult http://www.nlm.nih.gov/bbsd/uniform_requirements.html.

References should be numbered consecutively in the order in which they are first mentioned in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals in parentheses. References cited only in tables or figure legends should be numbered in accordance with the sequence established by the first identification in the text of the particular table or figure. The titles of journals should be abbreviated according to the style used in Index Medicus. Consult the List of Journals Indexed in Index Medicus, published annually as a sepa-

rate publication by the library and as a list in the January issue of Index Medicus. The list can also be obtained through the library's web site (<http://www.nlm.nih.gov>).

Journals vary on whether they ask authors to cite electronic references within parentheses in the text or in numbered references following the text. Authors should consult with the journal that they plan to submit their work to.

IV.A.10. Tables

Tables capture information concisely, and display it efficiently; they also provide information at any desired level of detail and precision. Including data in tables rather than text frequently makes it possible to reduce the length of the text.

Type or print each table with double spacing on a separate sheet of paper. Number tables consecutively in the order of their first citation in the text and supply a brief title for each. Do not use internal horizontal or vertical lines. Give each column a short or abbreviated heading. Authors should place explanatory matter in footnotes, not in the heading. Explain in footnotes all nonstandard abbreviations. For footnotes use the following symbols, in sequence:

* , † , ‡ , § , || , ¶ , ** , †† , ‡‡

Identify statistical measures of variations, such as standard deviation and standard error of the mean.

Be sure that each table is cited in the text.

If you use data from another published or unpublished source, obtain permission and acknowledge them fully.

Additional tables containing backup data too extensive to publish in print may be appropriate for publication in the electronic version of the journal, deposited with an archival service, or made available to readers directly by the authors. In that event an appropriate statement will be added to the text. Submit such tables for consideration with the paper so that they will be available to the peer reviewers.

IV.A.11. Illustrations (Figures)

Figures should be either professionally drawn and photographed, or submitted as photographic quality digital prints. In addition to requiring a version of the figures suitable for printing, some journals now ask authors for electronic files of figures in a format (e.g., JPEG or GIF) that will produce high quality images in the web version of the journal; authors should

review the images of such files on a computer screen before submitting them, to be sure they meet their own quality standard.

For x-ray films, scans, and other diagnostic images, as well as pictures of pathology specimens or photomicrographs, send sharp, glossy, black-and-white or color photographic prints, usually 127 × 173 mm (5 × 7 inches). Although some journals redraw figures, many do not. Letters, numbers, and symbols on Figures should therefore be clear and even throughout, and of sufficient size that when reduced for publication each item will still be legible. Figures should be made as self-explanatory as possible, since many will be used directly in slide presentations. Titles and detailed explanations belong in the legends, however, not on the illustrations themselves.

Photomicrographs should have internal scale markers. Symbols, arrows, or letters used in photomicrographs should contrast with the background.

If photographs of people are used, either the subjects must not be identifiable or their pictures must be accompanied by written permission to use the photograph (see Section III.D.4.a). Whenever possible permission for publication should be obtained.

Figures should be numbered consecutively according to the order in which they have been first cited in the text. If a figure has been published, acknowledge the original source and submit written permission from the copyright holder to reproduce the material. Permission is required irrespective of authorship or publisher except for documents in the public domain.

For illustrations in color, ascertain whether the journal requires color negatives, positive transparencies, or color prints. Accompanying drawings marked to indicate the region to be reproduced might be useful to the editor. Some journals publish illustrations in color only if the author pays for the extra cost.

Authors should consult the journal about requirements for figures submitted in electronic formats.

IV.A.12. Legends for Illustrations (Figures)

Type or print out legends for illustrations using double spacing, starting on a separate page, with Arabic numerals corresponding to the illustrations. When symbols, arrows, numbers, or letters are used to identify parts of the illustrations, identify and explain each one clearly in the legend. Explain the internal scale

and identify the method of staining in photomicrographs.

IV.A.13. Units of Measurement

Measurements of length, height, weight, and volume should be reported in metric units (meter, kilogram, or liter) or their decimal multiples.

Temperatures should be in degrees Celsius. Blood pressures should be in millimeters of mercury, unless other units are specifically required by the journal.

Journals vary in the units they use for reporting hematological, clinical chemistry, and other measurements. Authors must consult the information for authors for the particular journal and should report laboratory information in both the local and International System of Units (SI). Editors may request that the authors before publication add alternative or non-SI units, since SI units are not universally used. Drug concentrations may be reported in either SI or mass units, but the alternative should be provided in parentheses where appropriate.

IV.A.14. Abbreviations and Symbols

Use only standard abbreviations; the use of non-standard abbreviations can be extremely confusing to readers. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement.

IV.B Sending the Manuscript to the Journal

An increasing number of journals now accept electronic submission of manuscripts, whether on disk, as attachments to electronic mail, or by downloading directly onto the journal website. Electronic submission saves time as well as postage costs, and allows the manuscript to be handled in electronic form throughout the editorial process (for example, when it is sent out for review). When submitting a manuscript electronically, authors should consult with the instructions for authors of the journal they have chosen for their manuscript.

If a paper version of the manuscript is submitted, send the required number of copies of the manuscript and figures; they are all needed for peer review and editing, and editorial office staff cannot be expected to make the required copies.

Manuscripts must be accompanied by a cover letter, which should include the following information.

A full statement to the editor about all submissions and previous reports that might be regarded as redundant publication of the same or very similar work. Any such work should be referred to specifically, and referenced in the new paper. Copies of such material should be included with the submitted paper, to help the editor decide how to handle the matter.

A statement of financial or other relationships that might lead to a conflict of interest, if that information is not included in the manuscript itself or in an authors' form

A statement that the manuscript has been read and approved by all the authors, that the requirements for authorship as stated earlier in this document have been met, and that each author believes that the manuscript represents honest work, if that information is not provided in another form (see below); and

The name, address, and telephone number of the corresponding author, who is responsible for communicating with the other authors about revisions and final approval of the proofs, if that information is not included on the manuscript itself.

The letter should give any additional information that may be helpful to the editor, such as the type or format of article in the particular journal that the manuscript represents. If the manuscript has been submitted previously to another journal, it is helpful to include the previous editor's and reviewers' comments with the submitted manuscript, along with the authors' responses to those comments. Editors encourage authors to submit these previous communications and doing so may expedite the review process.

Many journals now provide a pre-submission checklist that assures that all the components of the submission have been included. Some journals now also require that authors complete checklists for reports of certain study types (e.g., the CONSORT checklist for reports of randomized controlled trials). Authors should look to see if the journal uses such checklists, and send them with the manuscript if they are requested.

Copies of any permission to reproduce published material, to use illustrations or report information about identifiable people, or to name people for their contributions must accompany the manuscript.

V. REFERENCES

A. References Cited in this Document

1. Davidoff F for the CSE Task Force on Authorship.

. Who's the Author? Problems with Biomedical Authorship, and Some Possible Solutions. *Science Editor*. July-August 2000: Volume 23 - Number 4: 111-119.

2. Yank V, Rennie D. Disclosure of researcher contributions: a study of original research articles in *The Lancet*. *Ann Intern Med*. 1999 Apr 20;130(8):661-70.

3. Flanagan A, Fontanarosa PB, DeAngelis CD. Authorship for research groups. *JAMA*. 2002;288:3166-68.

4. *Peer Review in Health Sciences*. F Godlee, T Jefferson. London: BMJ Books, 1999.

5. World Medical Association Declaration of Helsinki: ethical principles for medical research involving human subjects. *JAMA*. 2000 Dec 20;284(23):3043-5.

6. Pitkin RM, Branagan MA, Burmeister LF. Accuracy of data in abstracts of published research articles. *JAMA*. 1999 Mar 24-31;281(12):1110-1.

7. Patrias K. National Library of Medicine recommended formats for bibliographic citation. Bethesda (MD): The Library; 1991.

B. OTHER SOURCES OF INFORMATION RELATED TO BIOMEDICAL JOURNALS

World Association of Medical Editors (WAME) www.WAME.org

Council of Science Editors (CSE) www.councilscienceeditors.org

European Association of Science Editors (EASE) www.ease.org.uk

Society for Scholarly Publishing (SSP) www.ssp.net

Cochrane Collaboration www.cochrane.org

The Mulford Library, Medical College of Ohio www.mco.edu/lib/instr/libinsta.html

VI. ABOUT THE INTERNATIONAL COMMITTEE OF MEDICAL JOURNAL EDITORS

The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) is a group of general medical journal editors whose participants meet annually and fund their work on the Uniform Requirements for Manuscripts. The ICMJE invites comments on this document and suggestions for agenda items.

VII. Authors of The Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals

The ICMJE participating journals and organizations and their representatives who approved the revised Uniform Requirements for manuscripts in June 2003 include *Annals of Internal Medicine*, *Canadian Medical Association Journal*, *Croatian Medical Journal*, *Jour-*

nal of the American Medical Association, Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde, New England Journal of Medicine, New Zealand Medical Journal, The Lancet, The Medical Journal of Australia, Tidsskrift for Den Norske Llegeforening, Ugeskrift for Laeger, and the U.S. National Library of Medicine.

VIII. Use, Distribution, and Translation of the Uniform Requirements

Users may print, copy, and distribute this document without charge for not-for-profit, educational purpose. The ICMJE does not stock paper copies (reprints) of this document.

The ICMJE policy is for interested organizations to link to the official English language document at www.ICMJE.org. The ICMJE does not endorse posting of the document on web sites other than www.ICMJE.org.

The ICMJE welcomes organizations to translate this document into languages other than English for non-profit purposes. However, the ICMJE does not have the resources to translate, to back translate, or to approve translated versions of the document. Thus, any translations should prominently include the following statement: «This is a (insert language name) language translation of the ICMJE Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals. (insert name of organization) prepared this translation with support from (insert name of funding source, if any). The ICMJE has not endorsed nor approved the contents of this translation. The official version of the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals is located at www.ICMJE.org.»

IX. INQUIRIES

Inquiries about the Uniform Requirements should be sent to Christine Laine, MD, MPH at the ICMJE Secretariat office, American College of Physicians, 190 N. Independence Mall West, Philadelphia, PA 19106-1572, USA. phone, 215-351-2660; fax 215-351-2644; e-mail claine@acponline.org. Please do not direct inquiries about individual journal styles or policies to the ICMJE secretariat office.

ICMJE International Committee of Medical Journal Editors www.icmje.org.

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 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 disquete (MS-Word 2000® o Word Perfect 8.0®); 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 ma-

terial impreso deberá ser expresamente solicitado al editor. El material enviado estará listo para su reproducción, podrán enviarse fotografías o gráficos en formato TIF, CRD, JPG, GIF o BMP. El costo de cada artículo será de \$ 50 hasta 7 hojas (publicadas) y \$ 10 por cada hoja adicional que deberá ser abonado por los autores indefectiblemente antes de su publicación.

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

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

Normas particulares de redacción:

1.Trabajos de investigación:

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

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

b)Resumen: será redactado en castellano y en inglés (abstract) incluyendo además en este último caso el título en idioma in-

glés. 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 mis-

mos 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.

II. Artículos de revisión

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

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

III. Comunicaciones breves

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

IV. Información institucional

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

V. Cartas al editor

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

Correspondencia

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

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