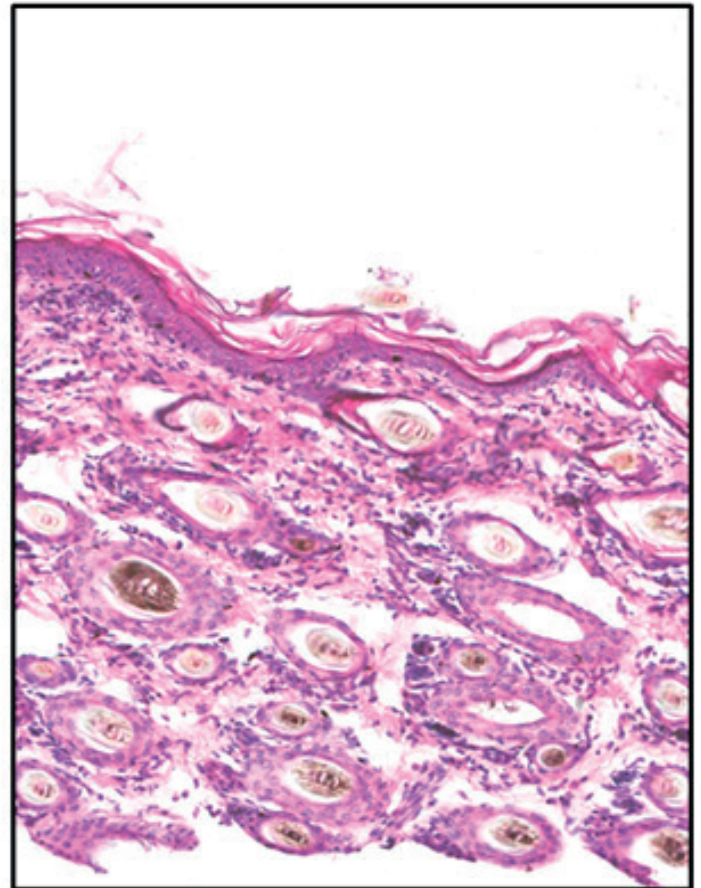
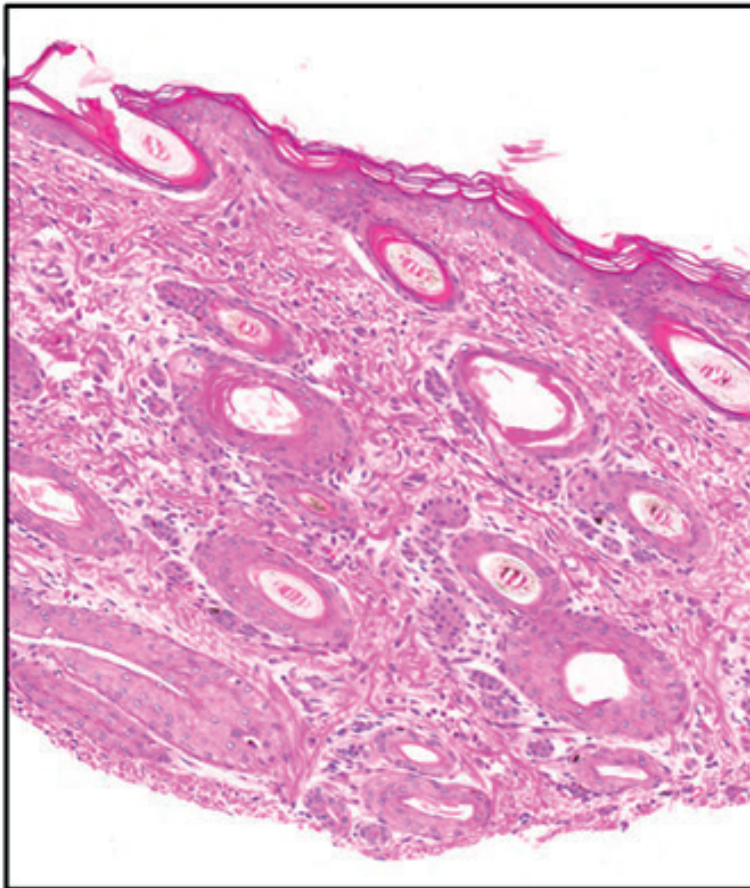


# ANALECTA VETERINARIA



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA

Publicación de la  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
Volumen 37 nº 1 año 2017



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

# ANALECTA

# VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA VOL. 37 n° 1 2017

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

## Autoridades

### Decano

Dr. Claudio Barbeito

### Vicedecano

Dr. Miguel Petrucelli

### Secretaria de Asuntos Académicos

Dra. Vanina Cambiaggi

### Secretario de Posgrado

Dr. Luzbel de la Sota

### Secretario de Ciencia y Técnica

Dr. Enrique Portiansky

### Secretaria de Gestión de Calidad

Dra. Cecilia di Lorenzo

### Secretaria de Extensión

Méd. Vet. Elena del Barrio

### Secretaria de Asuntos Estudiantiles

Méd. Vet. Verano Gómez

### Prosecretario de Relaciones Institucionales

Ms. Sci. Julio Copes

### Coordinador Académico de Campos Experimentales

Méd. Vet. Hugo Marcantoni

## ANALECTA VETERINARIA Consejo Editorial

### Director

Dr. Nestor O. Stanchi  
Microbiología

### Editor Responsable

Dr. Claudio G. Barbeito  
Histología y Embriología

### Editor Asociado

Dr. Enrique L. Portiansky  
Patología

### Coordinador Editorial

Dr. Julio R. Idiart  
Patología

### Secretaria de Redacción

Dra. Mónica E. Diessler  
Histología y Embriología

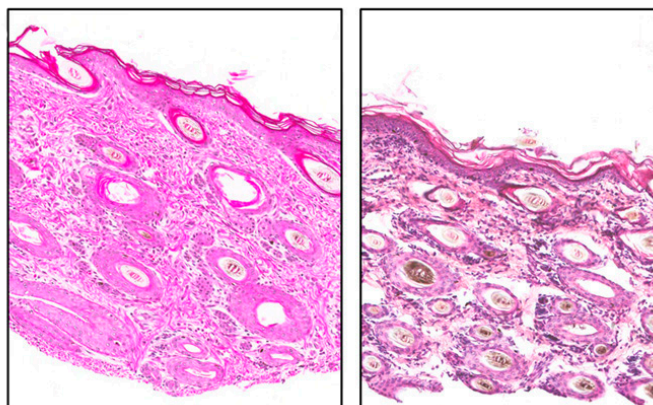


Foto de tapa: Imágenes representativas de secciones de la MMT coloreadas con H-E. Sanz Ressel BL, Massone AR, Barbeito CG.

## ACERCA DE ANALECTA VETERINARIA

Analecta Veterinaria (Analecta vet) es una revista de publicación semestral (cubre los meses de enero/junio y julio/diciembre) y constituye el órgano oficial de comunicación científica de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Se reciben para su consideración trabajos que versen acerca de cualquiera de las áreas de las Ciencias Veterinarias, generados por profesionales de esta u otras Unidades Académicas, entes nacionales o de la actividad privada, escritos en español o en inglés.

Todos los trabajos publicados en ANALECTA VETERINARIA son sometidos a revisión con modalidad doble ciego por parte de expertos del área de conocimiento que no pertenecen a las instituciones de origen del trabajo recibido.

The Journal ANALECTA VETERINARIA is a biannual publication of the School of Veterinary Sciences of the National University of La Plata, Argentina. It is committed to the diffusion of scientific reports in the field of the Veterinary Sciences, generated both in this and in other institutions.

ISSN 1514-2590 Versión Electrónica

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

Registro Propiedad Intelectual 77383

Dirección postal: 60 y 118 (B1900AVW)

La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

## Comité Científico

### **Dr. José I. Aguirre**

Department of Physiological Sciences, College of Veterinary Medicine, University of Florida, USA

### **Dra. María Barrandeguy**

Instituto de Virología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVYA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina

### **Ph.D. Julián A. Bartolomé**

Laboratorio de Reproducción Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Pampa (UNLPam), Argentina

### **Dr. Carlos Campero**

Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria, Argentina

### **Dr. Rodolfo Cantet**

Mejoramiento Genético Animal, Departamento de Producción Animal, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

### **Ph.D. Eduardo R. Cobo**

Production Animal Health, Veterinary Medicine, University of Calgary, Canada

### **Dr. Guillermo M. Denegri**

Laboratorio de Zoonosis Parasitarias, Instituto de Investigaciones en Producción, Salud y Ambiente (IIPROSAM), Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

### **Dr. Eduardo J. Gimeno**

Academia Nacional de Agronomía y Veterinaria; Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

### **Dra. Nélide V. Gómez**

Clinica Médica de Pequeños Animales, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

### **Ph.D. Alberto A. Guglielmo**

Laboratorio de Parasitología, Departamento de Sanidad Animal, Estación Experimental Agropecuaria Rafaela, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina

### **Dr. Carlos Lanusse**

Fisiología y Farmacología Veterinaria, Departamento de Fisiopatología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires (UNCPBA), Argentina

### **Dr. Antonio Javier Masot Gómez-Landero**

Anatomía y Anatomía Patológica Comparada, Departamento de Medicina Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Extremadura, España

### **Dr. Gastón Moré**

Laboratorio de Inmunoparasitología (LAINPA), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

### **Dr. Dadín Prando Moore**

Patología Veterinaria, Estación Experimental Agropecuaria Balcarce, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Unidad Integrada Balcarce, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional de Mar del Plata (UNMDP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

### **Me. Eduardo V. Moras**

Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

### **Dr. Hugo H. Ortega**

Laboratorio de Biología Celular y Molecular Aplicada, Instituto de Ciencias Veterinarias del Litoral, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional del Litoral (UNL); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

### **Ph.D. Luis M. Ortega Mora**

Grupo SALUVET, Departamento de Sanidad Animal, Facultad de Veterinaria, Universidad Complutense de Madrid, España

### **Ph.D. Pablo E. Piñeyro**

Veterinary Diagnostic & Production Animal Medicine, Veterinary Diagnostic Laboratory, College of Veterinary Medicine, Iowa State University, USA

### **Dr. Martí Pumarola i Batle**

Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Barcelona, España

### **Dr. Manuel Quezada Orellana**

Departamento de Patología y Medicina Preventiva, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Concepción, Chile

### **Dr. Francisco Reynaldi**

Micología Médica e Industrial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

### **Dr. Franklin Riet-Correa**

Plataforma de Salud Animal, Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA), INIA-La Estanzuela, Uruguay

### **Dr. Luis E. Samartino**

Instituto de Patobiología, Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias y Agronómicas (CICVYA), Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); Microbiología, Carrera de Veterinaria, Universidad del Salvador (USAL), Argentina

### **Dra. Analía I. Seoane**

Instituto de Genética Veterinaria (IGEvet), Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata (UNLP); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Argentina

### **Dra. Irma E. Sommerfelt**

Salud Pública, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires (UBA), Argentina

### **Ph.D. José M. Verdes García**

Departamento de Patología, Área Patología y Departamento de Biología Molecular y Celular, Área Biofísica, Facultad de Veterinaria, Universidad de la República, Uruguay

### **Equipo técnico**

Revisora del idioma inglés: PhD. Magdalena Rambeaud

Diseño: Dr. Nestor O. Stanchi

Diseño multimedial: Lic. Santiago Ciancaglini

### **ANALECTA**

**Pronunciación:** «a-n&l-'ek-t&

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

**Citación de la versión electrónica:** La citación de los artículos aparecidos en la versión electrónica de ANALECTA VETERINARIA debería seguirse según el siguiente ejemplo:

Costa EF, Portiansky EL, Massone AR, Marino FP, Idiart JR, Gimeno EJ. 1998. Alteraciones en la diferenciación y proliferación celular cutánea en bovinos, inducidas por hipervitaminosis D de origen vegetal. *Analecta vet* 18(1/2):7-13.

ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas

LATINDEX ([www.latindex.unam.mx](http://www.latindex.unam.mx)),

Ulrich's International Periodicals Directory

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

Zoological Records

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

BIOSIS (<http://www.biosis.org>)

Infocyt (<http://www.redhucyt.oas.org/infocyt/>)

Catálogo de LATINDEX (Sistema Regional de Información en Línea para Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal), en la Plataforma Open Access de Revistas Científicas Electrónicas Españolas y Latinoamericanas del CSIC (<http://bibliotecas.csic.es>) y en el Directory of Open Access Journals (<http://doaj.org>).

Las opiniones expresadas por los autores no reflejan necesariamente las opiniones de este medio, ni de las entidades que la auspician o de las instituciones a que pertenecen los autores.

El uso de nombres comerciales tiene como único objetivo facilitar la identificación de los productos mencionados 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.

## Licencia



La obra de los autores se pondrá a disposición del público para que haga de ella un uso justo y respetuoso de los derechos de autor, cumpliendo las condiciones internacionales de la licencia de uso **Creative Commons CC BY-NC-ND**. Este tipo de licencia permite a otros descargar la obra y compartirla siempre y cuando se de crédito a los autores, pero no permite cambiarlas de forma alguna ni usarlas comercialmente.

## Acceso Electrónico a

### ANALECTA VETERINARIA

La revista puede ser recuperada gratuitamente en internet en formato pdf en la dirección electrónica <http://www.fcv.unlp.edu.ar> o en el repositorio institucional SeDiCi UNLP (<http://sedici.unlp.edu.ar>).

Los números de la revista a partir del Volumen 18 están disponibles en formato de archivo: pdf (Portable Document File-Adobe Acrobat Reader®) y pueden imprimirse en cualquier impresora que permita diferenciar escala de grises o colores. Se recomienda que la misma posea un resolución mínima de 600 x 600 dpi.

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

ANALECTA VETERINARIA ha sido editada por la Facultad de Ciencias Veterinarias anteriormente con el nombre de **Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de La Plata**, desde 1905, **Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria**, desde desde 1922, luego como **Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias** desde 1959 y como **Analecta Veterinaria** desde 1969 cumpliendo más de 100 años.

Actualmente se publica sólo en su versión *on line* (ISSN 1514-2590).

## Contacto

Para cualquier comunicación oficial dirigirse al Sr. Director de la Revista Analecta Veterinaria a la dirección [analecta@fcv.unlp.edu.ar](mailto:analecta@fcv.unlp.edu.ar)

## Evaluadores de trabajos de

### ANALECTA VETERINARIA

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

## Todos los trabajos publicados en

### ANALECTA VETERINARIA son sometidos

#### a revisores externos

El Editor se reserva el derecho de editar los artículos para clarificarlos y modificarles el formato para adecuarlos al estilo de

ANALECTA VETERINARIA.

## All articles published in ANALECTA VETERINARIA are submitted to external scientific reviewers.

The Editor reserves the right to edit articles for clarity and to modify the format to fit the publication style of ANALECTA VETERINARIA

# ANALECTA VETERINARIA Vol 37 n° 1, 2017

## Nota Editorial/Editorial note

Proceso de consolidación y jerarquización de la calidad editorial  
de ANALECTA VETERINARIA

V

## Trabajos de investigación/Research works

**Evaluación de la eficacia de algunos fármacos para el tratamiento de la hepatozoonosis canina**

*Evaluation of the effectiveness of some drugs for the treatment of canine hepatozoonosis*

7

**Diversidad de haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad en equinos de la raza Árabe de la República Argentina**

*Major histocompatibility complex haplotype diversity in Arab horses from Argentina*

14

**Determinación de anticuerpos contra patógenos virales y bacterianos seleccionados en la población de cerdos silvestres (*Sus scrofa*) de la Reserva Natural Bahía Samborombón, Argentina**

*Determination of antibodies against selected viral and bacterial pathogens in the feral pigs (*Sus scrofa*) population of the Bahía Samborombón Natural Reserve, Argentina*

21

**Microscopía virtual: una nueva herramienta tecnológica para la enseñanza de la histología y la patología**

*Virtual microscopy: a new technological tool for teaching histology and pathology*

28

## Trabajos de revisión /Reviews

**Evaluación del descarte en cerdas: causas, registros reproductivos e inspección en planta de faena**

*Evaluation of sow removal: culling reasons, reproductive data and slaughterhouse inspection*

33

**Histoplasmosis en caninos y felinos: signos clínicos, métodos de diagnóstico y tratamiento**

*Canine and feline histoplasmosis: clinical signs, diagnostic methods and treatment*

45

## Informes técnicos/Technical reports

**Uso de la técnica de micromatrices de tejido en histología veterinaria**

*Use of tissue microarrays in veterinary histology*

59

**Seroprevalencia de infección por el virus de leucosis bovina durante 2015 en rodeos de cría de la Zona Deprimida del Río Salado, provincia de Buenos Aires, Argentina**

*Seroprevalence of bovine leukosis virus infection during 2015 in breeding herds from Zona Deprimida del Río Salado, Province of Buenos Aires, Argentina*

65

***Instrucciones a los autores***

69

## NOTA EDITORIAL

### Proceso de consolidación y jerarquización de la calidad editorial de *Analecta Veterinaria*

*Analecta Veterinaria* fue previamente editada por la Facultad de Ciencias Veterinarias con el nombre de “Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de La Plata”, desde 1905, como “Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria”, desde 1922, como “Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias”, desde 1959 y, finalmente, como “ANALECTA VETERINARIA”, desde 1969. Así, nuestra revista con más de 110 años de trayectoria, sigue manteniendo, entre otros, un criterio de calidad editorial relevante y sumamente valioso como es la publicación de artículos arbitrados.

Sobre la base de todo lo trabajado, a partir de 2014 fue posible plantearse nuevas metas para fortalecer la calidad de la revista, perfeccionar su desempeño, llegar a una mayor cantidad de lectores y constituir una alternativa interesante de elección para los potenciales autores. En ese sentido, entre otras tareas, se elaboraron nuevas normas de publicación más acordes con la publicación digital y se constituyó un nuevo grupo editorial con un comité integrado por prestigiosos profesionales del país y del exterior.

En esta oportunidad les informamos a nuestros lectores que estamos llevando adelante varias iniciativas tendientes a mejorar la calidad científica y editorial de nuestra revista. En ese marco, próximamente *Analecta Veterinaria* será gestionada mediante el paquete de software de código abierto *Open Journal System* (OJS), lo que le permitirá desarrollar todas las posibilidades que ofrecen las revistas electrónicas. Este sistema, perteneciente al *Public Knowledge Project* (PKP), agiliza los mecanismos de gestión editorial y genera políticas claras que redundan en mayor calidad, visibilidad y citación de las publicaciones.

Una novedad interesante es que, a partir del número actual, nuestros artículos contarán con un identificador de objeto digital (DOI), lo que asegurará su preservación digital, mejorará la posibilidad de los potenciales lectores de recuperarlos en línea y permitirá su identificación unívoca.

Es nuestro deseo que signa creciendo y en  
un futuro cercano pueda integrar diferentes bases de datos bibliográficas internacionales, lo que aumentaría la visibilidad de los trabajos producidos por nuestros autores.

Gracias por acompañarnos en este emprendimiento.

Consejo Editorial



# Evaluación de la eficacia de algunos fármacos para el tratamiento de la hepatozoonosis canina

## Evaluation of the effectiveness of some drugs for the treatment of canine hepatozoonosis

Guendulain C<sup>1</sup>, González G<sup>1</sup>, Babini S<sup>1</sup>, Caffaratti M<sup>1</sup>,  
González P<sup>1</sup>, Bessone A<sup>1</sup>, Soler E<sup>2</sup>, Tissera MC<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Clínica Animal, Facultad de Agronomía y Veterinaria; <sup>2</sup>Departamento de Matemática y Estadística, Facultad de Ciencias Económicas. Universidad Nacional de Río Cuarto.

\*Correo electrónico del autor: [cguendulain@ayv.unrc.edu.ar](mailto:cguendulain@ayv.unrc.edu.ar)

**Resumen:** La hepatozoonosis canina es una enfermedad parasitaria, adquirida por la ingestión de garrapatas infectadas con protozoarios del género *Hepatozoon* (H). *Hepatozoon canis* y *Hepatozoon americanum* son las dos especies que pueden infectar al perro. La presentación clínica de la infección con *Hepatozoon canis* es muy variable, pudiendo ser asintomática o manifestarse con signos de enfermedad leves a severos. Los exámenes hematológicos revelan ligera anemia no regenerativa, marcada leucocitosis neutrofilica con desvío a la izquierda y monocitosis en los casos de hepatozoonosis clínica. El diagnóstico se realiza mediante la visualización mediante el microscopio óptico de los gamontes en neutrófilos y monocitos en frotis de sangre coloreados. No existe, hasta el momento, un tratamiento eficaz para esta parasitosis. El fármaco más utilizado es el dipropionato de imidocarb, aunque con resultados variables. El objetivo de este trabajo fue evaluar tres opciones terapéuticas para la erradicación de *Hepatozoon* spp. de la sangre de perros infectados. Se utilizaron 18 perros parasitados naturalmente y se evaluaron tres fármacos: dipropionato de imidocarb, toltrazuril y espiramicina. En todos los perros tratados disminuyó el promedio de infección, presentando similares valores medios de leucocitos infectados. El análisis estadístico arrojó una diferencia significativa solo en el tratamiento de la parasitosis con dipropionato de imidocarb. En virtud de los resultados obtenidos con los tratamientos llevados a cabo con los diferentes fármacos, se concluye que ninguno es totalmente efectivo para la desaparición del parásito de la sangre, siendo el dipropionato de imidocarb el de mejor comportamiento.

**Palabras clave:** *Hepatozoon*, perros, tratamiento

**Abstract:** Canine hepatozoonosis is a parasitic disease, acquired by ingestion of ticks infected with protozoa of the genus *Hepatozoon* (H). *Hepatozoon canis* and *Hepatozoon americanum* are the two species that can infect dogs. The clinical presentation of *Hepatozoon canis* infection is highly variable and may be asymptomatic or show signs of mild to severe disease. In clinical hepatozoonosis, haematological tests reveal slight non regenerative anemia, marked neutrophilic leukocytosis with left shift and monocytosis. Diagnosis is made by the visualization of gamonts in neutrophils and monocytes in stained blood smears using an optical microscope. To date, there is no effective treatment for hepatozoonosis; imidocarb propionate is the most commonly used drug, although results are variable. The aim of this study was to evaluate three therapeutic options for the eradication of *Hepatozoon* spp. from blood of infected dogs. Three drugs (imidocarb dipropionate, toltrazuril and spiramycin) were evaluated in 18 naturally infected dogs. In all treated dogs the infection averages decreased, showing similar mean values of infected leukocytes. The statistical analysis showed a significant difference only in the treatment of this parasitosis with imidocarb dipropionate. It is concluded that none of the drugs are fully effective in removing the parasite from the blood, but imidocarb dipropionate showed the best results.

**Key words:** *Hepatozoon*, dog, treatment



## Introducción

La hepatozoonosis canina es una enfermedad parasitaria, adquirida por la ingestión de garrapatas infectadas con protozoarios del género *Hepatozoon* (*H*). El perro puede infectarse por dos especies de este género: *Hepatozoon canis*, transmitido por *Rhipicephalus sanguineus*, la garrapata marrón del perro (Baneth *et al.*, 2001), y *Hepatozoon americanum* (Vincent-Johnson *et al.*, 1997), transmitido por *Amblyomma maculatum*, la garrapata de la Costa del Golfo (Ewing *et al.*, 2002; Mathew *et al.*, 2000). En América del Sur la especie reconocida hasta el momento es *Hepatozoon canis*. En Argentina, la enfermedad se describió por primera vez en el año 1999 (Silva *et al.*, 1999), y recién en el año 2007 se realizó la primera caracterización molecular, confirmando que la especie estudiada era *Hepatozoon canis* (Eiras *et al.*, 2007).

El perro se parasita al ingerir una garrapata con esporozoitos, los cuales colonizan distintos órganos: hígado, bazo y linfonódulos (*Hepatozoon canis*). La infección de la garrapata vector se produce cuando ingiere sangre de un perro con leucocitos parasitados con gamontes de *Hepatozoon* spp. (Baneth *et al.*, 2007).

La infección puede ser asintomática, y el parásito encontrarse accidentalmente en animales sanos o que padecen otra enfermedad, o puede manifestarse como una enfermedad severa, potencialmente mortal (Baneth & Weigler, 1997; Baneth *et al.*, 2007). Los signos clínicos observados con mayor frecuencia son mucosas pálidas, emaciación y fiebre intermitente (Gavazza *et al.*, 2003). La deficiencia del sistema inmune en animales jóvenes, la presencia de otros agentes infecciosos; o los tratamientos con agentes inmunosupresores tienen un alto impacto en la persistencia o en la presentación de una nueva infección (Baneth *et al.*, 2001; Elias & Homans, 1988; Mylonakis *et al.*, 2005).

No existe hasta el momento un protocolo de tratamiento totalmente efectivo para la infección con *Hepatozoon canis*, por lo que cobra importancia la prevención de la infección basada en el control efectivo de las garrapatas sobre el perro y el ambiente (Baneth *et al.*, 2007).

El fármaco más utilizado es el dipropionato de imidocarb (5-6 mg/kg), por vías SC o IM, cada 14 días, hasta la desaparición de los gamontes en sangre, aunque los resultados son variables (Baneth & Weigler 1997; Pasa *et al.*, 2011). Usualmente, una o dos aplicaciones son suficientes, pero en infecciones severas puede necesitarse un tratamiento de hasta ocho semanas (Macintire *et al.*, 2001). La doxiciclina (10 mg/kg), administrada por vía oral durante 21 días, suele utilizarse en asociación con el dipropionato de imidocarb, debido a las posibles coinfecciones con otros protozoarios transmitidos por la garrapata (Ba-

neth *et al.*, 2003). Otra alternativa de tratamiento es el toltrazuril, aunque la eficacia también es variable (Krampitz & Haberkorn 1988; Macintire, 2001).

A pesar de que el dipropionato de imidocarb es el fármaco recomendado para la hepatozoonosis, su utilización no garantiza la cura parasitológica. En un ensayo se logró la eliminación de los gamontes de la sangre de perros en el 98 % de los casos dentro de las 24 horas posteriores a la administración de una única dosis. Sin embargo, en muchos casos se produjo la reaparición de la parasitemia pocas semanas después (Ogunkoya, 1981). En otro estudio, en el que se realizó el seguimiento de tres perros tratados durante ocho meses, se determinó, mediante la observación de frotis sanguíneos y métodos moleculares, que la droga no fue efectiva para la eliminación de los gamontes de la sangre. Si bien al finalizar el tratamiento no se observaron parásitos en las muestras de sangre mediante microscopía óptica, sí se detectaron mediante PCR (Sasanelli *et al.*, 2010).

También se ha estudiado el dipropionato de imidocarb en asociación con otras drogas con pobres resultados. Administrado en forma conjunta con tetraciclinas (Elias & Homans, 1988; Parra & Arraga de Alvarado, 1996) y con doxiciclina (Baneth *et al.*, 1995).

Mediante el uso de toltrazuril también se han demostrado resultados dispares en el tratamiento de las infecciones por *Hepatozoon*. Usado en perros infectados (10 mg/kg), por vía oral, durante seis días, ocurrió la remisión de los signos clínicos y la normalización de los parámetros hematológicos, pero no se eliminó la infección (Beaufils *et al.*, 1996). Pérez Tort *et al.* (2007) comunicaron la recuperación clínica y la desaparición de los gamontes de la sangre de doce perros infectados con una dosis diaria de 14 mg/kg, por vía oral, durante siete días.

Del mismo modo que ocurrió con el dipropionato de imidocarb, el toltrazuril se estudió en asociación con otras drogas. Voyvoda *et al.* (2004) utilizaron con éxito toltrazuril con trimetoprim-sulfametoxazol en un caso clínico, aunque el tratamiento con trimetoprim-sulfametoxazol se realizó durante 25 días y debió repetirse el toltrazuril, ya que en la primera administración no se logró la eliminación completa del parásito.

Por otra parte, Pasa *et al.* (2011) realizaron un estudio usando una asociación de dipropionato de imidocarb y toltrazuril en seis perros, concluyendo que la incorporación de toltrazuril no produjo un beneficio adicional con respecto a la terapia con dipropionato de imidocarb como única droga. En un estudio realizado con tres grupos de once perros cada uno, se evaluó la eficacia del dipropionato de imidocarb por un lado, y del toltrazuril/emodepside en asociación con clindamicina por otro. Los resultados indicaron que ninguna de los dos tratamientos lograron la eliminación del

parásito: si bien se produjo disminución del porcentaje de animales infectados, no se logró una completa cura parasitológica (De Tommasi *et al.*, 2014).

A pesar de que con los tratamientos implementados los resultados son dispares, un alto porcentaje de perros que posee baja parasitemia se cura, sobre todo si no existen otras enfermedades concomitantes. En ocasiones, luego del tratamiento se logra la mejoría clínica del paciente, aunque no se logra erradicar el parásito de la sangre. Se recomienda realizar el tratamiento en todos los perros infectados, incluidos aquellos con signos leves, debido a que la parasitemia puede incrementarse y desencadenar una enfermedad severa (Baneth & Weigler, 1997). Se ha informado un intervalo de 28-42 días entre el comienzo del tratamiento y la desaparición de los gamontes de la sangre, probablemente porque desaparecen de la sangre como consecuencia de la muerte de los estadios tisulares de *Hepatozoon canis* (Elias & Homans 1988). Por otra parte, se sugirió que el tratamiento no es efectivo contra los parásitos que se encuentran en los tejidos, por lo cual pueden ocurrir recidivas (Vincent-Johnson *et al.*, 1997).

En ocasiones, durante el tratamiento el porcentaje de neutrófilos parasitados aumenta, a pesar de reproducirse, en algunos casos, la mejoría clínica del paciente; en otros casos, en cambio, se produce un desmejoramiento clínico coincidente con el aumento de la parasitemia. No se conoce bien el mecanismo por el cual se produce este efecto (Beaufils, 1996; Sasanelli *et al.*, 2010; Voyvoda *et al.*, 2004).

La espiromicina es un antibiótico macrólido, bacteriostático, con un potencial particular contra organismos intracelulares ya que se concentra en el interior de las bacterias y de los macrófagos, por lo que presenta un largo efecto post antibiótico (Giguere *et al.*, 2013; Greene, 2008).

El objetivo de este estudio fue evaluar tres fármacos: dipropionato de imidocarb, toltrazuril y espiromicina para la erradicación del *Hepatozoon* spp. de la sangre de perros infectados.

## Materiales y métodos

### Animales en estudio

Se estudiaron 18 perros infectados naturalmente, entre 6 meses y 13 años de edad, de razas puras y mestizas. Algunos se encontraban en el Centro de Reinserción de Caninos dependiente de la Municipalidad de Río Cuarto y otros eran pacientes que acudieron al Hospital de Clínica Animal (Facultad de Agronomía y Veterinaria -FAV- de la Universidad Nacional de Río Cuarto) con diferentes motivos de consulta.

### Toma de muestras y procesamiento

Se extrajeron 5 ml de sangre de la vena cefálica antebraquial y se colectaron en tubos con anticoagulante (EDTA). Estas muestras fueron procesadas en el Laboratorio de Análisis Clínicos de la FAV, donde se realizaron los frotis sanguíneos coloreados con May Grünwald-Giemsa. El diagnóstico se realizó por la observación de los gamontes en los leucocitos mediante el microscopio óptico. Se determinó el porcentaje de leucocitos parasitados (parasitemia relativa) realizando el recuento de los mismos en 100 campos microscópicos con un aumento final de 1000X. Se registraron los datos del paciente y el porcentaje de leucocitos infectados en una ficha elaborada para tal fin. La parasitemia se consideró escasa si se observaban menos del 5% de los leucocitos parasitados (Baneth *et al.*, 2003), moderada con entre 5-20% leucocitos parasitados y abundante con >20%.

### Fármacos utilizados

Se utilizaron dipropionato de imidocarb (5 mg/kg vía SC, cada 14 días), toltrazuril (14 mg/kg vía oral, cada 24 h, durante 7 días) y espiromicina (23 mg/kg vía oral, cada 24 h, durante 10 días). Las dosis y la frecuencia de administración de las drogas utilizadas fueron las indicadas por la bibliografía (Giguere *et al.*, 2013; Greene, 2008; Macintire, 1999).

### Grupos experimentales

Para la administración de las drogas se confeccionaron al azar tres grupos de seis perros cada uno, infectados naturalmente con *Hepatozoon* spp. La mayoría de los perros no presentaba signos clínicos específicos de hepatozoonosis ni otras entidades concomitantes. A todos los animales se les realizó hemograma y frotis sanguíneo previos al tratamiento (día 0). Una semana antes de comenzar los tratamientos se les colocó un antiparasitario externo a base de imidacloprid, permetrina y butóxido de piperonilo *spot-on*, para realizar el estudio en ausencia de garrapatas en los pacientes.

-Grupo 1: recibió tratamiento con dipropionato de imidocarb. A los 14 días del tratamiento se les realizó un hemograma como control para evaluar la presencia de los gamontes en sangre. A los perros que seguían infectados se les administró una segunda dosis. Se realizaron hasta cuatro aplicaciones en los casos necesarios.

-Grupo 2: recibió tratamiento con toltrazuril.

-Grupo 3: recibió tratamiento con espiromicina.

### Seguimiento

A los perros estudiados se les realizó hemograma de control y frotis de sangre al finalizar el mismo y

a los 30 días después de comenzado. Los resultados negativos se reconfirmaron con la observación de la capa leucocitaria.

### Análisis estadístico

Para evaluar el resultado de los tratamientos de manera individual se utilizaron pruebas no paramétricas de Wilcoxon para muestras apareadas. El porcentaje de leucocitos infectados fue la variable estudiada para cada una de las tres drogas probadas. Para la confección de la matriz de datos y el análisis estadístico se utilizó el *software* SPSS.

### Resultados

El resultado de las pruebas de Wilcoxon arrojó una diferencia significativa solo en el tratamiento de la parasitosis con dipropionato de imidocarb ( $p=0,002$ ). Los valores medios de leucocitos parasitados antes y después de los tratamientos pueden observarse en la Tabla 1.

Tabla 1. Valores medios del porcentaje de leucocitos infectados con *Hepatozoon* spp. de los grupos de perros con tratamientos.

GRUPO	ANTES (Valores medios)	DESPUÉS (Valores medios)
dipropionato de imidocarb	11,17 %	0,50 %
toltrazuril	7,50 %	3,50 %
espiramicina	3,50 %	2,67 %

En el tratamiento con dipropionato de imidocarb se observó que, en cuatro de los seis casos en los que la parasitemia era escasa ( $< 5\%$ , casos 2, 3, 4 y 6), con una única dosis dejaron de observarse leucocitos parasitados. En el caso en el que la parasitemia era moderada (5-20 %, caso 1), también se logró un 0 % de leucocitos parasitados, pero luego de cuatro dosis. En el caso en el que la parasitemia era abundante ( $>20\%$ , caso 5), se requirieron cuatro dosis para disminuir el valor a 3 %, pero no se eliminó completamente la parasitemia (Tabla 2).

Con el tratamiento con toltrazuril se observó que, en uno de los dos casos en los que la parasitemia era escasa (3 %), se llegó a 0 % de leucocitos parasitados pero, en el otro (2 %), dicho porcentaje aumentó levemente (3 %). En dos de los casos en que la parasitemia era moderada (6 % y 18 %) disminuyeron a 0 % los leucocitos parasitados; en otro (8 %) disminuyó a 4 % y en otro caso aumentó de 8 % a 14 % (Tabla 3).

Tabla 2. Porcentaje de leucocitos parasitados antes y después del tratamiento con dipropionato de imidocarb y cantidad de dosis que se administraron para llegar a 0 %.

Perro N°	ANTES (% de leucocitos parasitados)	DESPUÉS (% de leucocitos parasitados)	cantidad de dosis
1	13 %	0 %	4
2	3 %	0 %	1
3	1 %	0 %	1
4	3 %	0 %	1
5	46 %	3 %	4
6	1 %	0 %	1

Tabla 3. Porcentaje de leucocitos parasitados antes y después del tratamiento con toltrazuril.

Perro N°	ANTES (% de leucocitos parasitados)	DESPUÉS (% de leucocitos parasitados)
1	18 %	0 %
2	3 %	0 %
3	8 %	14 %**
4	8 %	4 %
5	6 %	0 %
6	2 %	3 %**

\*\*Casos en los que se registró un aumento en el porcentaje de leucocitos parasitados luego del tratamiento

Luego del tratamiento con espiramicina se observó que, en los cuatro casos en que la parasitemia era escasa, el porcentaje de leucocitos parasitados disminuyó a 0 %. Con respecto a los dos casos en que la parasitemia era moderada, en uno disminuyó el porcentaje (2 %) y en el otro hubo un aumento del valor (14 %) (Tabla 4).

En todos los perros tratados disminuyeron los promedios de infección, presentando valores medios de leucocitos infectados similares (Tabla 1).

### Discusión y conclusiones

En este estudio se utilizaron el dipropionato de imidocarb, por ser considerado de elección por la comunidad científica para el tratamiento de esta parasitosis, y el toltrazuril porque es otro de los fármacos más utilizados, por los profesionales de nuestro país, debido a que existe una formulación disponible para su uso en pequeños animales indicada para esta parasitosis. La espiramicina se eligió por poseer una eficacia potencial particular contra organismos intracelulares,

Tabla 4. Porcentaje de leucocitos parasitados antes y después del tratamiento con espiramicina

Perro N°	ANTES (% de leucocitos parasitados)	DESPUÉS (% de leucocitos parasitados)
1	7 %	2 %
2	1 %	0 %
3	3 %	0 %
4	6 %	14 %**
5	2 %	0 %
6	2 %	0 %

\*\*Caso en el que se registró un aumento del porcentaje de leucocitos parasitados luego del tratamiento

permanecer por más tiempo que otros fármacos de su grupo dentro de los leucocitos, estar disponible en el mercado, ser de fácil administración y no presentar efectos adversos (Giguere *et al.*, 2013).

Mediante los resultados de este trabajo se puso en evidencia que, aunque en general se constató una reducción en la cantidad de leucocitos parasitados, ninguna de las tres opciones fue totalmente eficaz para lograr la eliminación del parásito de la sangre de los perros infectados. Algunos perros respondieron bien al tratamiento y desaparecieron los leucocitos parasitados, pero otros no mostraron una respuesta del todo favorable, ya que si bien la carga parasitaria disminuyó, no se logró la eliminación total de la parasitemia; hubo, inclusive, unos pocos casos en los cuales la parasitemia aumentó.

El dipropionato de imidocarb resultó la mejor opción terapéutica, dado que, de 6 casos, en 5 se eliminó el parásito de la sangre y en el restante (el caso de parasitosis abundante, 46 %) se redujo el porcentaje a 3 %. Con respecto a los animales tratados con toltrazuril y espiramicina, solo se logró la eliminación del parásito en la sangre de 3 y 4 pacientes, respectivamente. A su vez, luego del tratamiento con toltrazuril y espiramicina se observó aumento de la parasitemia en un caso de cada uno. Esto coincide con datos de la bibliografía en que se informan resultados inconsistentes con la utilización de dipropionato de imidocarb y toltrazuril (Baneth *et al.*, 1995; Beaufilet *et al.*, 1996; De Tommasi *et al.*, 2014; Ogunkoya *et al.*, 1981; Parra & Arraga-Alvarado 1996; Pasa *et al.*, 2011; Sasanelli *et al.*, 2010).

En cuanto al tercer fármaco, la espiramicina, a pesar de que los resultados obtenidos en este estudio no fueron satisfactorios, queda abierta la posibilidad de nuevas investigaciones con una muestra más representativa con una mayor cantidad de animales.

Aunque el dipropionato de imidocarb es, por el momento, el fármaco considerado de elección para

el tratamiento de la hepatozoonosis canina, existen estudios que muestran que no es completamente eficaz para lograr la cura parasitológica de los perros infectados (Ogunkoya 1981; Sasanelli *et al.*, 2010). En coincidencia con esto, los resultados obtenidos en esta investigación con este fármaco no fueron totalmente efectivos, pero es de destacar que en casi todos los animales se logró eliminar la parasitemia. La mayoría de los perros que fueron tratados con dipropionato de imidocarb no presentaban signos clínicos ni entidades patológicas concomitantes, por lo cual es factible que su sistema inmune hubiera contribuido con la cura parasitológica (Baneth & Weigler 1997, Baneth *et al.*, 2001, Baneth *et al.*, 2007). Uno de los perros, con alto valor de parasitemia, sí presentaba signos clínicos compatibles con esta parasitosis. Con el tratamiento, si bien se necesitaron cuatro dosis, se produjo una reducción importante de la parasitemia (46 % a 3 %).

Por su parte, el toltrazuril ha mostrado resultados dispares en el tratamiento de las infecciones por *Hepatozoon* en coincidencia con Beaufilet *et al.* (1996) y Pérez Tort *et al.* (2007). De manera similar a lo que ocurrió con el grupo de perros tratados con dipropionato de imidocarb, la mayoría de los perros tratados con toltrazuril no presentaban signos clínicos ni entidades patológicas concomitantes. Uno solo de los perros tenía signos clínicos severos, como paraparesia no ambulatoria y dolor generalizado, compatibles con hepatozoonosis y, a pesar de esto, no se encontraron gamontes en los leucocitos. Luego de una semana, al realizar nuevamente la observación del frotis sanguíneo, se encontró un 6 % de leucocitos parasitados. Se comenzó el tratamiento con toltrazuril y desaparecieron los signos clínicos en forma rápida, en aproximadamente 24 horas, pero aumentó el porcentaje de parasitemia. Este aumento fue reportado por otros autores tanto con el uso de toltrazuril como de dipropionato de imidocarb (Baneth *et al.*, 1995; Sasanelli *et al.*, 2010; Voyvoda *et al.*, 2004). Baneth *et al.* (1995) evidenciaron este efecto usando dipropionato de imidocarb con doxiciclina, aunque la condición clínica del perro desmejoró y volvió a recuperarse al disminuir la parasitemia; esto no sucedió en el caso del presente estudio. Voyvoda *et al.* (2004) reportaron en un perro con infección severa, un aumento de 21 % a 26 % de neutrófilos parasitados al día 10 de tratamiento con una asociación de toltrazuril y trimetoprim-sulfametoxazol, aunque con una mejoría de la condición clínica, que se evidenció dentro de las 72 h de comenzado el tratamiento. Esta observación fue hecha también por Sasanelli *et al.* (2010), quienes encontraron que en uno de los perros la parasitemia aumentó abruptamente de 0,67 % a 4 % durante el tratamiento con dipropionato de imidocarb. Se desconoce la causa de este aumento de la parasitemia durante el tratamiento, por lo cual sería un aspecto a

estudiar en un futuro para lograr un conocimiento más acabado del comportamiento de este parásito en el perro. Baneth et al. (1995) sugieren que este aumento de los neutrófilos parasitados, podría deberse a la dispersión generalizada de los merontes desde los tejidos. También sugieren que el tiempo entre la realización del tratamiento y la desaparición del parásito de la sangre, que se ha reportado como de 28 a 42 días con el uso de dipropionato de imidocarb y tetraciclina (Eliás & Homans, 1988), se podría deber a que se lleva a cabo un largo proceso, en el cual primero se produce la muerte de los merontes en los tejidos, luego la liberación de los merozoítos desde los merontes y seguidamente la disminución de los gamontes en los leucocitos circulantes (Baneth et al., 1995).

Con respecto a la espiromicina, los perros tratados con este fármaco tampoco presentaban signos clínicos compatibles con esta parasitosis ni entidades patológicas concomitantes. En cuanto a los resultados obtenidos con su uso, no fueron los esperados, a pesar de ser un fármaco efectivo contra organismos intracelulares, de lograr una concentración sanguínea persistente y de ser recomendado para el tratamiento de la toxoplasmosis en medicina humana (Couvreur et al., 1988). De todos modos, si bien no fue efectiva en el 100% de los casos, en la mayoría se logró la negativización en sangre de la parasitosis, por lo que se sugieren futuros ensayos con una mayor cantidad de perros.

El hecho de que los tratamientos no fueran del todo eficaces para lograr la eliminación del parásito de la sangre, podría deberse, como lo sugieren De Tommasi et al. (2014), a que los fármacos utilizados no son totalmente eficaces contra el parásito, o a que no alcanzan el nivel óptimo para ejercer su efecto en los tejidos donde se enquistan el *Hepatozoon*, tales como el bazo y la médula ósea. Dado que algunos perros, aún sin tratamiento, disminuyeron la carga parasitaria, se podría pensar que el parásito tiene una actividad cíclica entre la sangre y los órganos de depósito, que el sistema inmune del huésped juega un rol verdaderamente importante y/o que existe una susceptibilidad individual para la infección.

En virtud de los resultados obtenidos en el presente estudio, con los tratamientos llevados a cabo con los diferentes fármacos, se concluye que ninguno de los tratamientos es totalmente efectivo para la desaparición del parásito de la sangre, siendo el dipropionato de imidocarb el de mejor comportamiento. Se destaca la importancia de realizar futuras investigaciones a fin de profundizar el estudio de estos u otros fármacos para el tratamiento de la hepatozoonosis canina.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto

de intereses, relaciones financieras, personales o de otro tipo con personas u organizaciones que pudieran afectar al presente trabajo.

## Bibliografía

- Baneth G, Harmelin A, Presentey BZ. 1995. *Hepatozoon canis* infection in two dogs. Journal of the American Veterinary Medical Association. 206(12): 1891-94.
- Baneth G, Mathew JS, Shkap V, Macintire DK, Barta JR, Ewing SA. 2003. Canine hepatozoonosis: two disease syndromes caused by separate *Hepatozoon* spp. Trends in Parasitology. 19(1):27-31.
- Baneth G, Samish M, Alekseev Y, Aroch I, Shkap V. 2001. Transmission of *Hepatozoon canis* to dogs by naturally fed or percutaneously injected *Rhipicephalus sanguineus* ticks. Journal of Parasitology. (87):606-11.
- Baneth G, Samish M, Shkap V. 2007. Life cycle of *Hepatozoon canis* (Apicomplexa: Adeleorina: Hepatozoidae) in the tick *Rhipicephalus sanguineus* and domestic dog (*Canis familiaris*). Journal of Parasitology. (93):283-99.
- Baneth G. Hepatozoonosis. Infección por *Hepatozoon canis*. En: Greene CE. 2008. Enfermedades infecciosas del perro y el gato. 3° Ed. Vol. 2. Buenos Aires: Ed. Intermédica. pp. 1387-452.
- Baneth G, Weigler B. 1997. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Israel. Journal of Veterinary Internal Medicine. 11(6):365-70.
- Beaufils JP, Martin-Granel J, Jumelle PH. 1996. Hépatozoonose chez le chien et chez le renard: épidémiologie, clinique e traitement. Pratique Médicale et Chirurgicale de l'Animal de Compagnie. 33:243-53.
- Couvreur J, Desmots G, Thulliez P. 1988. Prophylaxis of congenital toxoplasmosis. Effects of spiramycin on placental infection. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 22B:193-200.
- De Tommasi AS, Alessio G, De Caprariis D, Ramos G, Di Paola RAN, Crescenzo G, Dantas-Torres F, Baneth G, Otranto D. 2014. Failure of imidocarb dipropionate and toltrazuril/emodepside plus clindamycin in treating *Hepatozoon canis* infection. Veterinary Parasitology. 200(3-4):242-5. doi: 10.1016/j.vetpar.2013.12.013
- Eiras DF, Basabe J, Scodellaro CF, Banach DB, Matos ML, Krimer A, Baneth G. 2007. First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. Veterinary Parasitology. 149(3-4):275-9.
- Eliás E, Homans PA. 1988. *Hepatozoon canis* infection in dogs: clinical and hematological findings and treatment. Journal of Small Animal Practice. 29:55-62.
- Ewing SA, Mathew JS, Panciera RJ. 2002. Transmission of *Hepatozoon americanum* (Apicomplexa: Adeleorina) by *Ixodides* (Acari: Ixodidae). Journal of Medical Entomology. 39(4):631-4.
- Gavazza A, Bizzeti M, Papini R. 2003. Observations on dogs found naturally infected with *Hepatozoon canis* in Italy. Revue de Medecine Veterinaire. 159:565-71.
- Giguère S. Macrolides, azalides, and ketolides. En: Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, 2013. Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine. 5° Ed. New Jersey (United States).

Wiley-Blackwell pp. 211-32.

Krampitz HE, Haberkorn A. 1988. Experimental treatment of Hepatozoon infections with antococcidial agent toltrazuril. *Journal of Veterinary Medicine*. 35:131-7.

Macintire DK. 1999. Canine hepatozoonosis. 17th Annual Veterinary Medical Forum. American College of Veterinary Internal Medicine. Chicago, USA.

Macintire DK, Vincent-Johnson NA, Kane CW, Lindsay DS, Blagburn BL, Dillon R. 2001. Treatment of dogs infected with *Hepatozoon americanum*: 53 Cases (1989-1998). *Journal of the American Veterinary Medical Association*. 218(1):77-82.

Mathew JS, van den Bussche RA, Ewing SA, Malayer JR, Latha BR, Panciera RJ. 2000. Phylogenetic relationship of *Hepatozoon* (Apicomplexa: Adeleorina) based on molecular, morphologic, and life cycle characters. *Journal of Parasitology*. 86:366-72.

Mylonakis ME, Leontides L, Gonen L, Billinis C, Koutinas AF, Baneth G. 2005. Anti-Hepatozoon canis serum antibodies and gamonts in naturally-occurring canine monocytic ehrlichiosis. *Veterinary Parasitology*. 129:229-33.

Ogunkoya AB, Adeyanju JB, Aliu YO. 1981. Experiences with the use of Imizol in treating canine blood parasites in Nigeria. *Journal of Small Animal Practice*. 22:111-5.

Parra O, Arraga de Alvarado CM. 1996. Hepatozoonosis canina en Venezuela. Hallazgos clínicos y de laboratorio. *Revista Científica*. 6(2):125-33.

Pasa S, Voyvoda H, Karagenc T, Atasoy A, Gazyagci S. 2011. Failure of combination therapy with imidocarb dipropionate and toltrazuril to clear *Hepatozoon canis* infection in dogs. *Parasitology Research*. 109:919-26.

Perez Tort G, Petetta L, Favre ME, Más J, Robles AM. 2007. Primera descripción de un brote de hepatozoonosis en un refugio de perros y su tratamiento mediante una formulación de toltrazuril especialmente preparada para caninos. *Veterinaria Argentina*. 24(235).

Sasanelli M, Paradies P, Greco B, Eyal O, Zaza V, Baneth G. 2010. Failure of imidocarb dipropionate to eliminate Hepatozoon canis in naturally infected dogs based on parasitological and molecular evaluation methods. *Veterinary Parasitology*. 4(171):3-4.

Silva MC, Rodriguez MS, Rosa A, Pereira ME, Marquez AG. 1999. Hepatozoon canis: primer caso en Buenos Aires, Argentina. *Revista de Medicina Veterinaria*. 6(80):489-92.

Vincent-Johnson NA, Macintire DK, Lindsay DS, Lenz SD, Baneth G, Shkap V, Blagburn BL. 1997. A new Hepatozoon species from dogs: description of the causative agent of canine hepatozoonosis in North America. *Journal of Parasitology*. (83):1165-72.

Voyvoda H, Pasa S, Uner A. 2004. Clinical *Hepatozoon canis* infection in a dog in Turkey. *Journal of Small Animal Practice*. 45:613-17.

# Diversidad de haplotipos del complejo principal de histocompatibilidad en equinos de la raza Árabe de la República Argentina

## Major histocompatibility complex haplotype diversity in Arab horses from Argentina

Sadaba SA<sup>1,2\*</sup>, Corbi Botto CM<sup>1,2</sup>, Zappa ME<sup>1</sup>, Carino MH<sup>1</sup>, Villegas Castagnasso EE<sup>1</sup>, Peral García P<sup>1</sup>, Díaz S<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando Noel Dulout" (IGEDET). Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. CCT La Plata – CONICET. La Plata, Argentina.

<sup>2</sup> Becarios de Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET)

\*Correo electrónico del autor: [ssadaba@fcv.unlp.edu.ar](mailto:ssadaba@fcv.unlp.edu.ar)

**Resumen:** La diversidad de los genes del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) es clave en su función en la presentación de antígenos en el sistema inmune. La tipificación indirecta basada en microsatélites (STR) del MHC aporta información de la variabilidad genética y de la estructura poblacional y es una estrategia para conocer procesos selectivos y evolutivos. Con el fin de caracterizar una población de caballos de raza Árabe, se identificaron los haplotipos del MHC sobre la base de tres microsatélites (UM011, DRB2-STR2 y COR112) abarcando una región de ~1Mpb. El ADN genómico se extrajo de sangre y pelo de 30 caballos de cinco haras de la provincia de Buenos Aires y los STRs se amplificaron con cebadores fluorescentes para tipificar en secuenciador automático. Se estimaron parámetros poblacionales y de diversidad y la detección de haplotipos se realizó mediante análisis de segregación y con el programa de reconstrucción de haplotipos PHASE. Se reconocieron 24 haplotipos; entre ellos, 12 se verificaron por segregación en los registros de *pedigree* del Stud Book. Los resultados obtenidos demostraron la existencia de ligamiento con alelos conocidos de genes de clase II del *equine leukocyte antigen* (ELA) y la cantidad de haplotipos identificada permitió expandir la valoración de la diversidad del MHC equino. Esta metodología constituye una herramienta de utilidad y un método alternativo para la tipificación del MHC en linajes de caballos y en estudios poblacionales relacionados con la inmunidad.

**Palabras clave:** Haplotipos; complejo principal de histocompatibilidad; equinos Árabes

**Abstract:** Genetic diversity of the major histocompatibility complex (MHC) is essential for the antigen recognition and presentation during the immune response. Indirect MHC typing by microsatellites (STR) provides data on genetic diversity and population structure, and provides knowledge of selective and evolutionary processes. In order to characterize a sample of Arab horses, we identified MHC haplotypes based on three STRs (UM011, DRB2-STR2 and COR112) covering a region of ~1Mpb. Genomic DNA was extracted from blood and hair of 30 horses from five farms of the province of Buenos Aires. STRs were amplified with fluorescent primers and typed in an automated sequencer. Population and diversity parameters were estimated. Haplotype detection was performed by segregation analysis and with the PHASE program for reconstructing haplotypes. Of the 24 haplotypes identified, 12 were verified by segregation in the Stud Book pedigree records. Our results showed linkage with known equine leukocyte antigen (ELA) class II alleles. The number of haplotypes identified allowed to expand the estimates of diversity in the equine MHC. This methodology is a useful tool and an alternative approach to type MHC in horse lineages and immune-related population studies.

**Key words:** Haplotypes; major histocompatibility complex; Arab horses

## Introducción

En los vertebrados, el complejo principal de histocompatibilidad (MHC) se localiza en una región cromosómica y está constituido por una familia multigénica, cuyos productos cumplen funciones importantes en la respuesta inmune (Lewin *et al.*, 1999). Estos genes pueden dividirse en tres clases principales: clase I, clase II y clase III. El MHC del caballo se conoce como *equine leukocyte antigen* (ELA) y esta región de genes estrechamente ligados es responsable de la presentación de antígenos propios y no propios al sistema inmune y así es fundamental en el reconocimiento y regulación de la respuesta inmune (Figura 1). Las moléculas del MHC cumplen estos roles uniéndose y presentando péptidos antigénicos a los linfocitos T, pudiendo conducir a varios eventos, incluyendo la eliminación de células infectadas o neoplásicas o el rechazo celular a órganos o tejidos trasplantados (Ansari *et al.*, 1988).

En el MHC existen combinaciones características de alelos de diferentes *loci* (haplotipos) con frecuencias elevadas, algunos de los que exhiben desequilibrio de ligamiento en diferentes grupos étnicos y en especies de animales domésticos (Hedrick, 1994). El número de haplotipos también varía entre especies y aún dentro de especies, elevando la variabilidad del sistema. También existen variaciones en el número de genes que componen cada haplotipo (Chardon *et al.*, 1999; Ellis & Ballingal, 1999).

La alta diversidad de los genes de clase I y clase II del MHC de los vertebrados es un rasgo clave en la función que desempeñan en la presentación de antígenos en el sistema inmune (Hughes & Nei, 1992). Sin embargo, en equinos, la asignación de haplotipos del MHC a individuos continua siendo un reto a pesar de los avances tecnológicos y del conocimiento del genoma equino. El principal reporte en caballo doméstico corresponde a los haplotipos de los genes de clase II (Tseng *et al.*, 2010), basados inicialmente en los talleres internacionales establecidos para identificar las especificidades serológicas para el ELA desde la década de 1980 (Lazary *et al.* 1985, 1988). La falta de descripciones completas de haplotipos equinos del MHC de clase II y la falta de métodos específicos para haplotipos como en otras especies, determinan que la genotipificación basada en microsatélites del MHC (*sequence tandem repeat* - STR) sea de utilidad para la tipificación indirecta (Bastos-Silveira *et al.*, 2009; Kalemkerian *et al.*, 2011; Santucci *et al.*, 2007; Wagner *et al.*, 1996) y también son valiosos para estudiar linajes y divergencia de los haplotipos (Brinkmeyer-Langford *et al.*, 2013).

Dado que utiliza microsatélites localizados dentro de o cercanos a genes candidatos de interés, pueden, además, aportar información acerca de la

variabilidad genética y la estructura de la población, y puede ser también una estrategia valiosa para conocer los procesos de selección y evolutivos relacionados con la historia de las razas equinas. Para los propósitos de tipificación, los microsatélites también son herramientas valiosas porque exhiben numerosos alelos (polimorfismo) y elevada heterocigosidad (Meagher & Potts, 1997; Tseng *et al.*, 2010). Tseng *et al.* (2010) demostraron que múltiples haplotipos de microsatélites pueden asociarse con un único serotipo, observando una mayor resolución, sensibilidad y precisión de la genotipificación de ADN en comparación con métodos serológicos (Azor *et al.*, 2007; Brinkmeyer-Langford *et al.*, 2013; Tseng *et al.*, 2010). Además, los estudios genéticos poblacionales del polimorfismo del MHC en numerosas especies, principalmente en humanos, especies domésticas y de laboratorio, han conducido a identificar asociaciones con enfermedades que vinculan determinados genotipos del MHC con susceptibilidad o resistencia a varias condiciones patológicas (Maillard *et al.*, 2002; Meredith *et al.*, 1986; Sharif *et al.*, 1998; Swinburne *et al.*, 2012).

El objetivo de este trabajo consistió en determinar la diversidad genética de tres marcadores de tipo microsatélite localizados dentro de la región del ELA. Estos marcadores serán utilizados para identificar, de forma preliminar, la composición haplotípica en grupos familiares de caballos de raza Árabe y definir su poder de discriminación para la identificación de haplotipos sobre la base del desequilibrio de ligamiento característico del MHC.

## Materiales y métodos

### Muestras y extracción de ADN

Para el análisis experimental se utilizaron un total de 30 caballos de la raza Árabe. Los caballos pertenecen a tres grupos familiares, de diferentes haras de la provincia de Buenos Aires. Se registraron los datos de identificación y genealógicos de cada caballo. Todos se encontraban registrados en el Stud Book Argentino. Las muestras de sangre se tomaron por punción yugular en condiciones de esterilidad y con anticoagulante (EDTA 6%) y se refrigeraron hasta la extracción de ADN. Los pelos fueron arrancados de la cola y se almacenaron en sobres individuales, adecuadamente rotulados. El ADN genómico se extrajo a partir de sangre periférica utilizando la técnica de DNAzol (Gibco, BRL-Life Technologies, Rockville, MD, USA -Cox, 1968-), según las recomendaciones del fabricante. El ADN genómico de los bulbos pilosos se extrajo mediante la técnica de extracción con NaOH 0,2 M. El ADN purificado se cuantificó en espectrofotómetro NanoVue (GE Healthcare), se visualizó en geles de agarosa al 1% p/v y se usó como molde para la reacción de amplificación mediante el método de reacción en cadena de la polimerasa (PCR).



## Genotipificación de los marcadores STRs

La amplificación de los STRs se realizó por separado para cada uno de ellos por medio de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando cebadores oligonucleótidos específicos para cada uno de los STRs (COR112-F 5'-TTACCTGGTTATTGGTTATTTGG-3'; COR112-R5'-TCACCCACTAAATCTCAAATCC-3'; UM011-F 5'-TGAAAGTAGAAAGGGATGTGG3'; 5'-TCTCAGAGCAGAAGTCCCTG3'; DRB2 STR2-F5'-AAGGACGTCCTGGATGACGC-3'; Eca-DRB-STR1-2R 5'AGTTACAAGGGACCGTGTGA3'). Los cebadores *forward* de cada par se marcaron con el colorante fluorescente FAM y se amplificaron en un reactor MAXYGENE (AxygeneInc, Union City, CA) para la posterior identificación mediante análisis de fragmentos. Las condiciones de ciclado consistieron en desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min, 35 ciclos a 94 °C por 1 min, 55 °C por 30 s y 72 °C por 30 s. La extensión final se realizó a 72 °C por 15 min. Los fragmentos de PCR se discriminaron en secuenciador automático MegaBase1000 (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) usando ET550-Rox como estándar de peso molecular (GE Healthcare). Los genotipos se asignaron utilizando el programa FragmentProfiler Software Suit version 2.2 (MegaBase Build 1.2.0311.2500, Amersham Biosciences, GE Healthcare, Buckinghamshire, UK, 2003).

## Análisis estadístico y detección de los haplotipos de clase II del ELA

Para cada marcador se estimaron las frecuencias alélicas y genotípicas, la heterocigosis esperada ( $H_e$ ) y observada ( $h_o$ ), número de alelos ( $n_a$ ) y el equilibrio de HW (EHW), mediante el test de estimación de probabilidad de  $p$ -valores utilizando el programa GENEPOP 4.0 (<ftp://ftp.cefe.cnrsmop.fr/genepop/Rousset2008>). El desequilibrio de ligamiento entre los tres marcadores STRs se estimó también mediante el programa Genepop. La detección de haplotipos se realizó con el programa de reconstrucción de haplotipos

PHASE y se verificó mediante análisis de segregación de acuerdo con los registros del *Stud Book Argentino*.

## Resultados

### Localización genómica de los STRs

Se seleccionaron los marcadores STRs UM011 (Meyer et al. 1997), COR112 (Tseng et al., 2010) teniendo en cuenta reportes previos acerca de su ligamiento con genes de clase II del ELA, y ELA-DRB2 (STR2), desarrollado en este trabajo. Para identificar la localización de los *loci* STRs se realizaron búsquedas BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) enfrentando la secuencia genómica de referencia en el cromosoma Eca20. Se localizó UM011 (número de acceso AF195130) dentro de la secuencia de un intrón del gen ELA-DMA (L100061035), a COR112 en una región no codificante entre los pseudogenes DRB1-4 (LOC100146181; posición 33.246.369-33.251.023) y DOB (LOC100060663; posición 33.302.539-33.307.437pb). Se desarrolló la metodología para detectar el microsatélite del gen ELA-DRB2 (STR2), localizado en el intrón 2 del gen ELA-DRB2 (LOC100052310; posición33.193.749-33.193.985pb). La representación esquemática del mapa de los tres STRs en relación al MHC se muestra en la Figura 1.

### Tipificación y polimorfismo de los STRs

La tipificación de los microsatélites fue realizada en un total de 30 caballos de raza Árabe usando tres *loci* STRs descritos en el apartado Materiales y Métodos. Se detectó un número variable de alelos en cada microsatélite, con 2 alelos en STR2, 5 alelos en COR112 y 7 en UM011 (Tabla 1). Las distribución de frecuencias alélicas, así como los valores de diversidad genética ( $H_e$  y  $H_o$ ), PIC y HWE se detallan en la Tabla 1. Los tres STRs se encontraron en equilibrio de Hardy-Weinberg ( $p < 0,05$ ) y los valores de diversidad genética variaron entre  $H_e = 35$  y 72%. COR112 y UM011 mostraron valores de contenido informativo del polimorfismo (PIC) de 64 y 69%, respectivamente. La

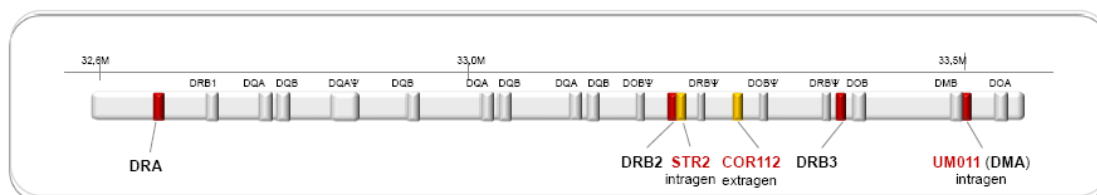


Figura 1. Mapa esquemático que representa la región de clase II del ELA en el Eca20. Se señalaron en color amarillo los marcadores STRs utilizados (microsatélites), indicando su localización con respecto a las secuencias codificantes (intragen/extragen). Se indican también genes y pseudogenes de clase II y su posición dentro de la región cromosómica.

distribución de los alelos mostró uno o dos alelos más frecuentes y varios alelos con frecuencias menores. Se investigó el desequilibrio de ligamiento entre los tres marcadores STRs, con valores altamente significativos entre COR112 y UM011.

los haplotipos A, C, D y E presentaron una frecuencia de 12%. Cuatro haplotipos (F, G, H, J) mostraron frecuencias entre 1,7-4,2%. Cinco de los 10 haplotipos son compartidos y cada grupo familiar presentó entre 1 y 5 haplotipos exclusivos (Tabla 3).

Tabla 1. Distribución de los alelos de los tres STRs y los valores de diversidad genética estimados para He y Ho.

Locus STR					
STR2		COR112		UM011	
Alelo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia	Alelo	Frecuencia
234	0,776	245	0,121	160	0,017
236	0,224	247	0,362	162	0,086
		253	0,086	164	0,138
		255	0,397	166	0,121
		257	0,034	168	0,138
				172	0,034
				178	0,466
na	2	5		7	
He	0,354	0,701		0,734	
Ho	0,448	0,689		0,724	
EHW	0,288	0,852		0,607	
PIC	0,287	0,634		0,692	

Tabla 2. Estimación del desequilibrio de ligamiento entre los marcadores STRs COR112, UM011 y STR2\*\*\*altamente significativo con  $\alpha \leq 0,05$ .

Locus 1	Locus 2	P-Value	S.E.
STR2	COR112	0,0915	0.003904
STR2	UM011	0,6106	0.009589
COR112	UM011	<b>0,0000***</b>	0.000000

### Identificación de haplotipos

Los marcadores microsatélites localizados en ligamiento en la región cromosómica del ELA se consideraron en conjunto para determinar las combinaciones haplotípicas presentes en toda la muestra analizada. El análisis con el algoritmo PHASE permitió identificar la presencia de 24 haplotipos probables con frecuencias entre 0,04% y 19,6%. Con el fin de verificar la presencia de cada combinación haplotípica en los caballos analizados, se realizó un análisis de segregación en tres grupos familiares compuestos por dos y tres generaciones. Se identificaron un total de 10 haplotipos segregantes en las tres familias analizadas. Para identificarlos y realizar las comparaciones se asignó una letra mayúscula a cada haplotipo (A-K). El haplotipo más frecuente fue B (20%), en tanto que

### Discusión

Los caballos de raza Árabe tipificados mostraron un grado apreciable de polimorfismo y de diversidad genética, evidenciado por valores de heterocigosis  $\geq 70\%$  de los marcadores microsatélites analizados, y entre 2 y 7 alelos. Algunos alelos fueron raros (frecuencia  $< 3\%$ ) y se observaron solamente en unos pocos animales, sin una contribución mayor a la identificación de los haplotipos.

El STR2 presentó solamente dos alelos y un valor de heterocigosis esperada de 35%. Dado que se encuentra ubicado en el segundo intrón 2 del gen ELA-DRB2, es probable que se encuentre estrechamente ligado a algunos alelos del exón 2 de este gen, por lo que la presencia de más alelos estaría condicionada por el alelo del exón 2 presente en cada individuo. Sin embargo, el marcador STR2, así como UM011 y COR112, evidenciaron equilibrio de EHW en la población analizada.

El nivel de variación genética observado en la región de clase II del ELA en los caballos de raza Árabe permitió inferir la existencia de numerosas combinaciones haplotípicas. La estimación estadística de las diferentes combinaciones posibles de todos los alelos de los STRs permitió identificar veinticuatro haplotipos diferentes con frecuencias de entre 0,1% y 20%. Los haplotipos con frecuencias menores al 0,5% no fueron considerados en el análisis. Para validar esta premisa, se realizó un análisis de segregación familiar, teniendo

Tabla 3. Combinaciones haplotípicas de los microsatélites del ELA inferidos mediante el análisis con el algoritmo PHASE en los caballos de raza Árabe analizados en este trabajo. Se indica la frecuencia estimada para cada uno de los 10 haplotipos más frecuentes (designados por letras mayúsculas) que fueron también verificados por segregación familiar en tres grupos familiares (I, II y III); además, se indica el número de individuos que se asociaron con cada haplotipo.

Haplotipo	STR/alelo			Frecuencia	Familia	N
A	STR2-234	COR112-245	UMO11-178	0,1196	I, II, III	7
B	STR2-236	COR112-255	UMO11-178	0,1966	I, II	10
C	STR2-234	COR112-255	UMO11-178	0,1244	II, III	9
D	STR2-234	COR112-247	UMO11-166	0,1197	I, II, III	7
E	STR2-234	COR112-247	UMO11-168	0,1202	I, II	7
F	STR2-234	COR112-247	UMO11-172	0,0345	III	2
G	STR2-234	COR112-255	UMO11-162	0,0424	II	3
H	STR2-234	COR112-257	UMO11-160	0,0172	II	1
J	STR2-234	COR112-253	UMO11-164	0,0347	II	2
K	STR2-234	COR112-247	UMO11-164	0,0389	I	1

en cuenta los registros de *pedigree* en el Stud Book Argentino (<http://www.studbook.com.ar/>) de cada individuo de los grupos familiares incluidos en el estudio.

Mediante el análisis de segregación familiar, 10 de los 24 haplotipos estimados pudieron identificarse en los grupos familiares de caballos de raza Árabe. Cada grupo estaba compuesto por 5-7 individuos, y los mencionados haplotipos estaban presentes en distintos individuos de cada generación incluida en el *pedigree*. Como ejemplo, podemos mencionar el haplotipo A, presente en las tres familias. En la familia 1 (n=7), el haplotipo A estaba presente en la abuela 76, en la hija 75 y en el nieto 167 (Figura 2). En esta familia, compuesta por 7 individuos representando tres generaciones, se detectaron 5 haplotipos diferentes (A, B, D, E, K). Cada uno de ellos pudo ser verificado a través del análisis de segregación familiar (Figura 2). Los restantes haplotipos se encontraron asociados a uno o pocos individuos y no se verificaron por segregación familiar.

En todas las familias se hallaron entre 4 y 7 haplotipos diferentes; algunos eran compartidos por todas las familias (haplotipos A, D), en tanto que otros estaban presentes solamente en uno o dos grupos familiares (haplotipos B, C, E).

La presencia de combinaciones haplotípicas compartidas entre diferentes grupos familiares indicaría la posible presencia de haplotipos ancestrales. Dado que la raza árabe se caracteriza por un registro genealógico cerrado y la presencia de padrillos fundadores y líneas maternas bien definidas en el origen de la raza, es probable que estos haplotipos pertenezcan a haplogrupos mayores. Por tal motivo, la ancestría podría comprobarse adicionando al análisis y

caracterización de los haplotipos algunos marcadores de genes estructurales, y evaluando las distancias mínimas necesarias entre marcadores para detectar desequilibrio de ligamiento (DL) y, por lo tanto, definir y validar los haplotipos segregantes con posible relevancia funcional.

El DL altamente significativo dentro del genoma equino entre razas, probablemente refleje la reciente divergencia entre las mismas y el hecho de compartir fundadores (Wade *et al.*, 2009). Mientras que algunos haplotipos del ELA son compartidos entre razas, estudios previos describen diferencias entre razas en la frecuencia de varios haplotipos del ELA, incluyendo la aparente ausencia de algunos haplotipos en varias razas. Además, se hallaron características similares en los haplotipos de microsatélites definidos particularmente en las razas Thoroughbreds y Standardbreds (Tseng *et al.*, 2011). Usando un conjunto de microsatélites, incluyendo los aquí utilizados, Tseng *et al.* (2010) demostraron la presencia de 19 haplotipos en caballos de las razas Standardbreds y Thoroughbreds, en una muestra de alrededor de cien caballos de cada una. Los resultados reportados ponen en evidencia numerosos haplotipos únicos, aun en grupos familiares reducidos y con tres marcadores ligados dentro de la región de clase II. Además, observaron que los haplotipos de microsatélites del MHC se dividen a lo largo de las líneas raciales. Cabe señalar que, por su historia documentada, la raza Thoroughbred se originó hace aproximadamente 300 años en Inglaterra, a partir de un pequeño grupo que, se cree, era producto de la cruce entre caballos Árabes y caballos nativos de Inglaterra (Willett, 1970) y que la raza American Standardbred se originó en los Estados Unidos hace aproximadamente 150 años, e incluye caballos

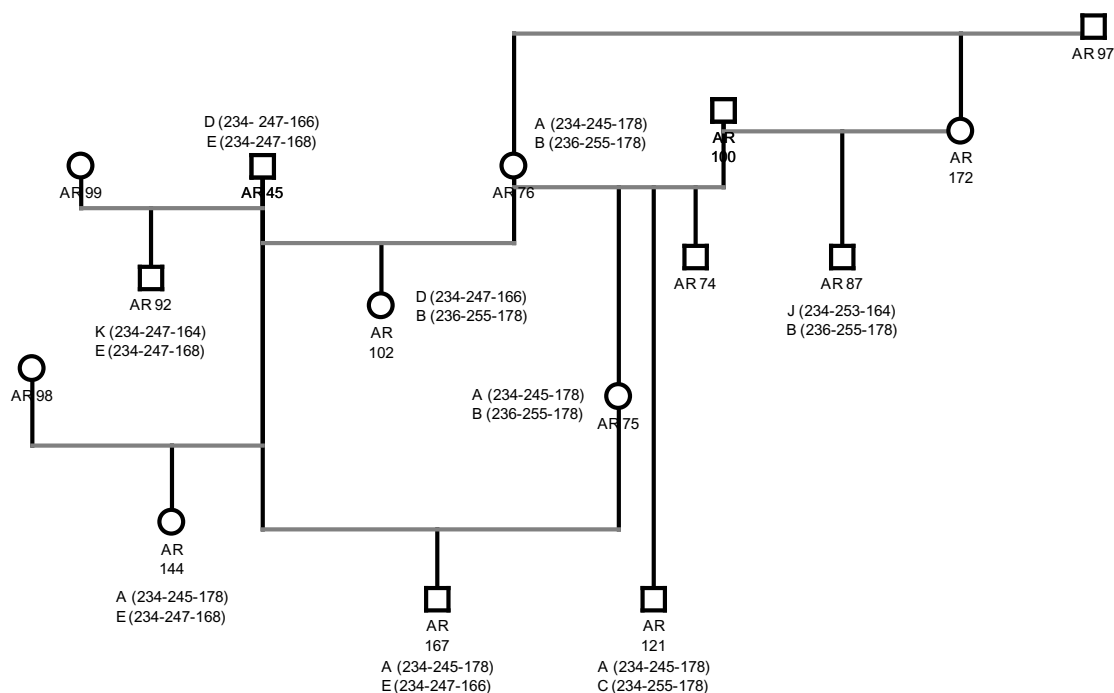


Figura 2. *Pedigree* que demuestra la segregación de los haplotipos conformados por los marcadores STR2, COR112 y UMO11 en una línea familiar de caballos de raza Árabe. La representación del *pedigree* se realizó con el programa Genopro®2016 Versión 3.0.0.

Thoroughbred entre sus fundadores. Sin embargo, estos autores señalan que ninguno de los haplotipos descritos en Thoroughbreds y Standardbreds estaba asociado con los caballos de raza Árabe, aun cuando se demostró que estos eran portadores de algunos de los serotipos del ELA detectados en estudios previos (Crepaldi *et al.*, 1986). En el futuro será de interés determinar la distribución de los haplotipos de los microsatélites entre razas equinas.

La metodología de tipificación mediante el uso de microsatélites del MHC reportada en este estudio permite una identificación rápida de los haplotipos del MHC equino en la mayoría de los caballos/familias analizadas. Constituye un complemento de utilidad para una diferenciación rápida y adecuada de diferentes haplotipos equinos, como alternativa a la secuenciación y/o determinación alelo específica. La cantidad de haplotipos identificada permitió expandir la valoración de la diversidad del MHC equino y brinda herramientas adicionales para el análisis de diversidad genética del MHC de los caballos, haciendo posible analizar la estructura poblacional, el desequilibrio de ligamiento y la asociación con caracteres de producción y en estudios genético-poblacionales relacionados con la inmunidad.

## Agradecimientos

Los autores desean agradecer a los criadores de caballos de la raza Árabe por aportar muestras

para este estudio. Este trabajo fue financiado mediante el Proyecto PICT2012-2610 (ANPCyT) y el Proyecto Acreditado 11/V206 del Programa Nacional de Inventivos.

## Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

## Bibliografía

- Ansari HA, Hediger R, Fries RY, Stranzinger G. 1988. Chromosomal localization of the major histocompatibility complex of the horse (ELA) by *in situ* hybridization. *Immunogenetics*. 28:362-4.
- Antczak DF. The major histocompatibility complex of the horse. En: Plowright W, Rosedale PD, Wade JF. 1992. *Equine Infectious Diseases VI, "Proceedings of the Sixth International Conference"* 7th-11th July, 1991. New York, R&W Publications, pp. 99-112.
- Azor PJ, Mercedes V, Gómez MD, Goyache F, Molina A. 2007. Genetic characterization of the Spanish Trotter horse breed using microsatellite markers. *Genetics and Molecular Biology*. 30(1):37-42.
- Bastos Silveira C, Luís C, Ginja C, Gama LT, Oom MM. 2009. Genetic variation in BoLA microsatellite *loci* in Portuguese cattle breeds. *Animal Genetics*. 40(1):101-5.
- Brinkmeyer-Langford CL, Cai JJ, Gill CA Skow LC. 2013. Microsatellite variation in the equine MHC. *Animal Genetics*. 44(3):267-75.
- Chardon P, Renard CY, Vaiman M. 1999. The major histocompatibility complex in swine. *Immunological Reviews*. 167:179-92.

- Cox RA. 1968. Methods in Enzymology (Grossmann L & Moldave E Eds.) Vol. 12, Part B. Orlando, Academic Press, pp. 120-9.
- Crepaldi T, Crump A, Newman M, Ferrone S, Antczak DF. 1986. Equine T-lymphocytes express MHC class II antigens. *Journal of Immunogenetics*. 13(4):349-60.
- Hedrick, P.W. 1994. Evolutionary genetics of the major histocompatibility complex. *The American Naturalist*. 143(6):945-964.
- Hughes AL, Nei M. 1992. Models of host-parasite interaction and MHC polymorphism. *Genetics*. 132(3):863.
- Ellis SA, Ballingall KT. 1999. Cattle MHC: evolution in action? *Immunology Reviews*. 167:159-68.
- Kalemkerian PB, Metz GE, Peral-García P, López-Gappa J, Echeverría MG, Giovambattista G, Díaz S. 2011. Eca20 microsatellite polymorphisms in equine viral arteritis-infected horses from Argentina. *Tissue Antigens*. 78(4):281-4.
- Lazary S, Gerber H, Glatt PA, Straub R. 1985. Equine leukocyte antigens in sarcoid-infected horses. *Equine Veterinary Journal*. 14:283-6.
- Lazary S, Antczak DF, Bailey E, Bell TK, Bernoco D, Byrns G, McClure JJ. 1988. Joint Report of the Fifth International Joint Report of the Fifth International Workshop on Lymphocyte Alloantigens of the Horse, Baton Rouge, Louisiana, 31 October-1 November 1987. *Animal Genetics*. 19(4):447-56.
- Lewin HA, Russell GC, Glass EJ. 1999. Comparative organization and function of the major histocompatibility complex of domesticated cattle. *Immunological Reviews*. 167:145-58.
- Maillard JC, Chantal I, Berthier D, Thevenon S, Sidibe I, Razafindralaibe H. 2002. Molecular immunogenetics in susceptibility to bovine dermatophilosis: a candidate gene approach and a concrete field application. *Annals of the New York Academy of Science*. 969:92-6.
- Meagher S, Potts WK. 1997. A microsatellite-based MHC genotyping system for house mice (*Mus domesticus*). *Hereditas*. 127:75-82.
- Meredith D, Elser AH, Wolf B, Soma LR, Donawick WJ, Lazary S. 1986. Equine leukocyte antigens: relationships with sarcoid tumors and laminitis in two pure breeds. *Immunogenetics*. 23:221-5.
- Meyer AH, Valberg SJ, Hillers KR, Schweitzer JK, Mickelson JR. 1997. Sixteen new polymorphic equine microsatellites. *Animal Genetics*. 28:69-70.
- Rousset F. 2008. Genepop'007: a complete reimplementation of the Genepop software for Windows and Linux. *Molecular Ecology Resources*. 8:103-6.
- Santucci F, Ibrahim KM, Bruzzone A, Hewit GM. 2007. Selection on MHC-linked microsatellite *loci* in sheep populations. *Heredity*. 99(3):340-8.
- Sharif S, Mallard BA, Wilkie BN, Sargeant JM, Scott HM, Dekkers JC, Leslie KE. 1998. Associations of the bovine major histocompatibility complex DRB3 (BoLA-DRB3) alleles with occurrence of disease and milk somatic cell score in Canadian dairy cattle. *Animal Genetics*. 29(3):185-93.
- Swinburne LS, Meadows JR, Broström H, Eriksson S, Fikse WF, Frey R, Sundquist M, Tseng CT, Mikko S, Lindgren G. 2012. The same ELA class II risk factors confer equine insect bite hypersensitivity in two distinct populations. *Immunogenetics*. 64(3):201-8.
- Tseng CT, Miller D, Cassano J, Bailey E, Antczak DF. 2010. Identification of equine major histocompatibility complex haplotypes using polymorphic microsatellites. *Animal Genetics*. 41:150-3.
- Wade CM, Giulotto E, Sigurdsson S, Zoli M, Gnerre S, Imsland F, Swinburne JE. 2009. Genome sequence, comparative analysis, and population genetics of the domestic horse. *Science*. 326(5954):865-7.
- Wagner JL, Burnett RC, DeRose SA, Francisco LV, Storb R, Ostrander EA. 1996. Histocompatibility testing of dog families with highly polymorphic microsatellite markers. *Transplantation*. 62(6):876-7.
- Willett P. 1970. *The Thoroughbred*. London, Weidenfeld & Nicolson Ltd.

# Determinación de anticuerpos contra patógenos virales y bacterianos seleccionados en la población de cerdos silvestres (*Sus scrofa*) de la Reserva Natural Bahía Samborombón, Argentina

Determination of antibodies against selected viral and bacterial pathogens in the feral pigs (*Sus scrofa*) population of the Bahía Samborombón Natural Reserve, Argentina

Carpinetti B<sup>1,3\*</sup>, Castresana G<sup>3</sup>, Rojas P<sup>3</sup>, Grant J<sup>2</sup>, Marcos A<sup>2</sup>, Monterubbianesi M<sup>2</sup>, Sanguinetti HR<sup>4</sup>, Serena MS<sup>5,6</sup>, Echeverría MG<sup>5,6</sup>, Garciarena M<sup>1</sup>, Aleksa A<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Ecología y Recursos Naturales, Universidad Nacional Arturo Jauretche; <sup>2</sup>Dirección Nacional de Sanidad Animal, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA); <sup>3</sup>Dirección de Áreas Naturales Protegidas, Organismo Provincial para el Desarrollo Sostenible de la Provincia de Buenos Aires; <sup>4</sup>Dirección de Laboratorio Animal, SENASA; <sup>5</sup>Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET); <sup>6</sup>Laboratorio de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

\*Correo electrónico del autor: [brunoelcarpincho@hotmail.com](mailto:brunoelcarpincho@hotmail.com)

**Resumen:** Los cerdos silvestres (*Sus scrofa*) descienden de cruzamientos entre cerdos domésticos liberados durante la colonización con jabalíes salvajes euroasiáticos, liberados con propósitos cinegéticos. Son invasivos y su coexistencia con especies domésticas implica riesgos sanitarios. Argentina es considerada libre de fiebre aftosa (FA), peste porcina clásica (PPC) y africana (PPA) y síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS). La enfermedad de Aujeszky (EA) y la leptospirosis son endémicas en ciertas áreas del país. El objetivo fue evaluar la presencia de ciertas enfermedades zoonóticas y/o de importancia para la producción animal y la conservación de la biodiversidad en cerdos silvestres de la Bahía de Samborombón. Se capturaron 118 animales. Se tomaron muestras de suero, tonsilas, músculo, intestino delgado, linfonódulos, entre otras. Se estudió la presencia de anticuerpos contra *Brucella* spp., coronavirus respiratorio porcino, virus de la estomatitis vesicular, de la FA, de la gastroenteritis transmisible porcina (TGEV), de la PPC, PPA, EA, PRRS y *Leptospira* spp. Se realizaron análisis bacteriológicos para *Mycobacterium* spp. Los resultados ratificaron la ausencia de las enfermedades exóticas e indicaron que 36 % de los animales presentó anticuerpos contra *Leptospira interrogans* serovar *pomona* y 62,5 % contra el virus de la EA. Estos resultados remarcan la importancia del monitoreo de la interfase productiva/silvestre en función de la salud pública, producción animal y conservación de la biodiversidad.

**Palabras clave:** cerdos silvestres, *Sus scrofa*, Bahía Samborombón, zoonosis

**Abstract:** Overlapping between wildlife and domestic species implies the risk of disease transmission. In Argentina, the wild pig (*Sus scrofa*) is a widespread invasive species. *Sus scrofa* wild populations are descendants from domestic pigs released during colonisation and Eurasian wild boars released for sport hunting purposes. Argentina is considered free from foot-and-mouth disease (FMD), classical swine fever (CSF), African swine fever (ASF) and porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). Aujeszky disease (AD) and leptospirosis are considered endemic in certain areas of the country. The aim of this study was to evaluate the presence of some zoonotic and productive diseases in the wild pig population of Bahía Samborombón, Argentina. A total of 118 animals were captured. Samples consisted on serum, tonsils, muscle, small intestine and lymph nodes. Detection of antibodies for *Brucella* spp, porcine respiratory coronavirus (PRCV), vesicular stomatitis virus (VSV), foot-and-mouth disease virus (FMDV), porcine transmissible gastroenteritis virus (TGEV), *Leptospira* spp, CSF virus, ASF virus, AD virus and PRRS virus, as well as bacteriological analysis to detect *Mycobacterium* spp., were performed. Preliminary results indicate that 36 % and 62.5 % of animals had antibodies against *Leptospira interrogans* serovar Pomona, and ADV, respectively. These results highlight the importance of closer monitoring on the wildlife/livestock interface for public health, animal production and biodiversity conservation.

**Keywords:** wild boar, *Sus scrofa*, Bahía Samborombón, zoonosis

## Introducción

El jabalí europeo y una amplia variedad de morfotipos de cerdos domésticos asilvestrados (*Sus scrofa*) se han naturalizado y se encuentran ampliamente distribuidos en Argentina (Merino & Carpinetti, 2003). Algunas de estas poblaciones silvestres son descendientes de cerdos domésticos liberados durante la colonización española (Crosby, 1986; Navas 1987), mientras que otras se originaron a partir de ejemplares de jabalí euroasiático puro deliberadamente introducidos durante la primera década del siglo xx con propósitos cinegéticos (Daciuk, 1978; Navas, 1987). La hibridación entre poblaciones silvestres y cerdos domésticos criados a campo también es común, resultando en un patrón muy confuso de distribución e interrelaciones entre las variedades domésticas, silvestres y formas híbridas (Merino & Carpinetti, 2003).

Las poblaciones silvestres de *Sus scrofa* pueden actuar como reservorios de enfermedades infecciosas para los animales domésticos y la fauna autóctona, como así también ser fuente potencial de enfermedades zoonóticas (Al Dahouk et al., 2005; Carpinetti et al., 2014; Meng et al., 2009). De esta manera, las interacciones entre especies pueden potencialmente resultar en la diseminación de estos patógenos (Vengust et al., 2006). Además, los cambios en el ambiente tienden a favorecer el contacto entre la fauna silvestre, los animales de producción y el ser humano, y esto juega un rol fundamental en el papel cada vez mayor de la vida silvestre en la aparición de enfermedades animales y humanas (Jones et al., 2008).

Entre las enfermedades infecciosas más frecuentemente citadas en poblaciones de cerdos silvestres se encuentran la brucelosis porcina (Al Dahouk et al., 2005; Ebani et al., 2003; Gresham et al., 2002; van der Leek et al., 1993), leptospirosis (Ebani et al., 2003; Mason et al., 1998), enfermedad de Aujeszky -EA- (Corn et al., 2004; Gresham et al., 2002; Lari et al., 2006; Müller et al., 1998; Zupancic et al., 2002), peste porcina clásica -PPC- (Kern et al., 1999; Zupancic et al., 2002) y tuberculosis (Naranjo et al., 2008; Nishi et al., 2006).

Argentina está internacionalmente reconocida como país libre de fiebre aftosa (FA), peste porcina clásica (PPC), peste porcina africana (PPA) y síndrome reproductivo y respiratorio porcino (PRRS). En general, la vigilancia epidemiológica llevada a cabo por los organismos oficiales de control está concentrada principalmente en el muestreo de animales domésticos, aportando escasa información sobre la presencia y prevalencia de agentes infecciosos en poblaciones de animales silvestres.

La Bahía Samborombón es el humedal mixohalino más extenso de Argentina. Se localiza en la costa

de la provincia de Buenos Aires, en el último tramo del estuario del Río de la Plata y se extiende desde Punta Piedras (35°27'S; 56°45'W) hasta Punta Rasa (36°22'S; 56°35'W).

La vegetación del área es un mosaico con presencia de bancos de conchillas donde crecen bosques de tala (*Celtis tala*) y determinado por factores tales como la duración y extensión de las inundaciones de agua dulce o estuariales y por las características del suelo. Dicha región es un área protegida<sup>1</sup> y alberga una gran biodiversidad de especies nativas, algunas de ellas en peligro de extinción, como el venado de las pampas (*Ozoteceros bezoarticus celer*) (Merino & Carpinetti 2003), especies introducidas como el ciervo axis (*Axis axis*), perros asilvestrados (*Canis familiaris*) y cerdos silvestres o cimarrones (*Sus scrofa*). Además, coexisten en el área asentamientos humanos dedicados a la explotación ganadera (Carpinetti et al., 2014).

Se ha sugerido que el incremento de la población de cerdos silvestres (*Sus scrofa*) es una de las causas actuales más importantes que afectan la recuperación del venado de las pampas en la Bahía (Carpinetti 1998; Merino & Carpinetti 2003). Algunos estudios preliminares sugieren que, en Samborombón, el incremento de cerdos silvestres podría afectar la supervivencia del venado a largo plazo (Giménez-Dixon 1991; Merino & Carpinetti 2003), ya que se ha señalado que los cerdos silvestres pueden competir y/o excluir espacialmente a esta especie amenazada, además de no descartarse la predación sobre crías (Merino et al., 1993; Carpinetti 1998). También esta especie afecta otros valores de conservación del área y produce un significativo impacto sobre la biota nativa.

En los últimos años, Argentina ha registrado un fuerte y sostenido crecimiento de la producción y del consumo de carne porcina. Con el aumento en la cantidad y calidad de los establecimientos de producción porcina en el país, aumentan las exigencias de elevar sus niveles sanitarios para garantizar productividad y aspirar a mercados internacionales. En este escenario, la vigilancia epidemiológica de las poblaciones silvestres de cerdos adquiere especial relevancia.

En este sentido, el objetivo de este estudio fue determinar la presencia de anticuerpos contra una serie de patógenos seleccionados por su importancia para la salud humana, la producción animal y/o la conservación de la fauna silvestre, en la población de cerdos silvestres de la Reserva Natural Bahía Samborombón.

<sup>1</sup>Reserva Natural Bahía Samborombón, Ley 12016/97. Categoría de manejo: Reserva Natural Integral, Reserva Natural de Objetivo Definido y Refugio de Vida Silvestre.

## Materiales y métodos

Entre enero de 2013 y abril de 2015, dependiendo de las condiciones climáticas y de la disponibilidad técnica y logística de los guardaparques de la reserva natural, se capturaron cerdos silvestres utilizando distintas técnicas en el marco de las tareas rutinarias de control de esta especie introducida en el área protegida (Figura 1). Con el fin de evitar riesgos sanitarios, los guardaparques fueron instruidos por profesionales del Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA) con respecto a las normas de seguridad durante la apertura de cadáveres.

La extracción y el acondicionamiento de muestras de los cerdos capturados se realizaron de acuerdo con el protocolo elaborado por personal técnico del SENASA. Se colectaron muestras de tonsilas, linfonódulos, hígado, riñones, intestino delgado, músculos (diafragma y músculo masetero) y sangre para la obtención de suero para serología. Las muestras fueron remitidas para su análisis al SENASA, Dirección General de Laboratorio y Control Técnico (DILAB) ubicado en la localidad de Martínez, provincia de Buenos Aires.

Para la determinación de anticuerpos contra PPC, PPA, EA, virus de la gastroenteritis transmisible porcina (TGE) y PRRS se utilizaron kits de ELISA comerciales: IDEXX CSFV Ab Test, Ingezim PPA, IDEXX PRV/ADV gI Ab Test, Ingezim Corona Diferencial 2.0 e IDEXX PRRS X3 Ab Test, respectivamente. Para el diagnóstico de FA se evaluó la presencia de anticuerpos contra el antígeno asociado a la infección (VIA) a través de la técnica de inmunodifusión en gel de agar (IDGA). Asimismo, se realizó la búsqueda de antígeno viral para PPC mediante la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD) a partir de muestras de tonsilas.

En el caso de los patógenos bacterianos, la detección de anticuerpos contra *Brucella* spp. se realizó mediante la técnica de aglutinación con antígeno buferado en placa (BPA) y, como técnica confirmatoria, se utilizó la prueba de seroaglutinación lenta en tubo (SAT). En el caso de *Leptospira* spp. se realizó la microaglutinación en tubo (MAT). Para el diagnóstico de tuberculosis los linfonódulos fueron descontaminados por la técnica de Petroff y sembrados en medios específicos para micobacterias (*Mycobacterium* spp.), Lowestein-Jensen y Stonebrink, durante, al menos, 90 días y en caso de existir desarrollo bacteriano compatible con bacilos ácido-alcohol resistentes se tipificaron mediante métodos moleculares.

Todas las técnicas mencionadas son las recomendadas en el "Manual de las Pruebas de Diagnóstico y de Vacunas para los Animales Terrestres" de la Organización Mundial de Sanidad Animal (OIE, 2015).

## Resultados

En el período comprendido entre enero de 2013 y abril de 2015 se capturaron 118 animales y se realizaron un total de 1325 determinaciones (Tabla 1). Las enfermedades analizadas como FA, PPC, PPA, PRRS y TGE arrojaron resultados negativos en su totalidad. Con respecto a *Leptospira* spp., se detectó un 36% (30/83) de serología positiva para *L. interrogans* serovar pomona. La mayoría de los títulos obtenidos fueron bajos (menos de 1/200). Con respecto a la EA, se registró un 62,5% (65/104) de animales positivos. Asimismo, se detectaron dos casos positivos de *Brucella* spp. mediante la técnica de tamiz, aunque sólo uno fue confirmado con la técnica de SAT sobre un total de 96 animales analizados.

## Discusión

Los resultados obtenidos ratifican la ausencia en la población bajo estudio de enfermedades consideradas exóticas en la Argentina, como PPC, PPA y PRRS, encontrándose ellas bajo plan de vigilancia oficial.

El último foco de PPC fue registrado en el año 1999. Luego de la aplicación de la Resolución N° 834/2002 se logró finalmente erradicar la enfermedad y, en el año 2005, siguiendo las recomendaciones de la OIE, la República Argentina se autodeclaró "libre de peste porcina clásica" mediante la Resolución SAGPYA N° 343/2005.

A partir de ese año, y hasta la actualidad, el SENASA lleva a cabo actividades de vigilancia epidemiológica con el objetivo de detectar en forma precoz la reaparición de la enfermedad y recolectar información para sustentar o documentar el estatus de país libre. Estas actividades se llevan a cabo junto al monitoreo de otras dos enfermedades virales, como son el síndrome respiratorio reproductivo porcino y la peste porcina africana. Estas enfermedades nunca han sido diagnosticadas en la República Argentina, por lo que son consideradas exóticas por Resolución del SENASA 422/2003.

Las actividades de vigilancia que se llevan a cabo para PPC, PPA y PRRS se basan en la prevención debido al impacto económico y social que conllevaría la ocurrencia de un foco.

Con respecto a las enfermedades consideradas endémicas, el porcentaje de cerdos silvestres con anticuerpos contra la EA podría indicar el contacto entre los mismos y los cerdos domésticos, específicamente con la población de cerdos domésticos de traspatio o pequeñas producciones al aire libre, siendo éste el estrato productivo con mayor prevalencia de la enfermedad<sup>2</sup>.

<sup>2</sup> Sobre la base de un muestreo serológico nacional realizado por el SENASA en el año 2010 para determinar la prevalencia de cerdos infectados por el virus de la EA, en el marco del Programa Nacional de Control y Erradicación de la Enfermedad de Aujeszky aprobado por Resolución ex SAGPYA N° 474/2009.



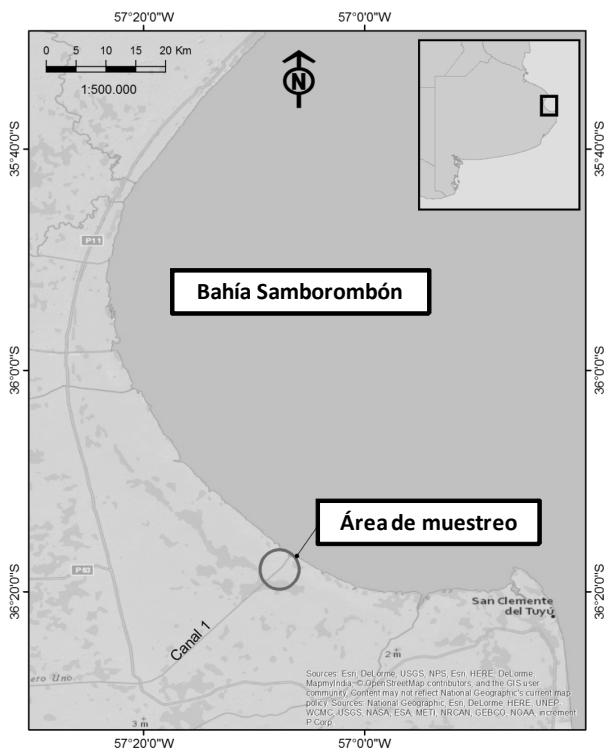


Figura 1. Área de muestreo en Bahía Samborombón, provincia de Buenos Aires.

En Brasil, en la región del Pantanal se realizó un estudio que determinó una prevalencia del 47,3% de positivos a EA (Paes et al., 2013).

Durante 2013-2014 nuestro grupo ha realizado el primer estudio que analizó el estado sanitario de cerdos salvajes con respecto a las principales virosis que afectan a los porcinos. Teniendo en cuenta que estos animales representan una amenaza para la salud del hombre y de los animales domésticos, y que el impacto económico de las enfermedades que los afectan es muy importante, deben ser contemplados dentro de los planes sanitarios llevados a cabo por las distintas agencias del Estado. En relación con los resultados obtenidos para el caso de la EA (casi un 40% de positivos), los mismos revelan la posible presencia de cerdos salvajes con enfermedad en estado de latencia, como así también una posible circulación viral en dicha población de animales, al detectarse títulos serológicos elevados. Estos resultados provenían de muestreos de Bahía Samborombón y de cotos de caza en Quemú-Quemú (provincia de La Pampa) y Villa Huidobro (provincia de Córdoba). De esta manera, se prevé continuar trabajando y utilizar los resultados obtenidos para contribuir con la campaña de erradicación de la enfermedad (Serena et al., 2015).

Asimismo, la detección de anticuerpos contra *Leptospira interrogans* serovar *pomona* indica que en los ambientes de la Bahía Samborombón existe

contacto de los cerdos silvestres (*Sus scrofa*) con la bacteria, representando un posible riesgo no solo para otros animales silvestres sino también para la salud pública, aún cuando el serovar prevalente en Argentina en cerdos domésticos es Castellonis, seguido por *Icterohaemorrhagiae* (Petrakovsky et al., 2013 & 2016). El serovar Pomona está asociado principalmente al ganado bovino y en segundo lugar al ganado porcino (Bharti et al., 2003). En este estudio no fue posible evaluar seroconversión para determinar si se trató de una infección aguda o crónica, ya que los animales fueron capturados y sacrificados. Este mismo serovar ha sido encontrado con mayor frecuencia en *Sus scrofa* en el área de Berlín, Alemania (Jansen et al., 2007).

Además de su distribución mundial, la leptospirosis es una de las enfermedades con mayor impacto económico a causa de las grandes pérdidas que ocasiona en la ganadería en general, como así también en la producción porcina, relacionadas con abortos, alta mortalidad perinatal, disminución en el tamaño de camada, entre otros (AAVLD, 1994). El cerdo es el mejor ejemplo de un animal portador/excretor, ya que una vez que las leptospiras se localizan en el riñón, el animal se transforma en eliminador de bacterias por vida, jugando un rol de gran importancia en el ciclo de la enfermedad, semejante al de varias especies de roedores. Dado el importante rol de los cerdos como reservorios en la cadena epidemiológica de la leptospirosis, los hallazgos presentados en este trabajo ponen de manifiesto la relevancia de continuar los estudios de vigilancia de este tipo sobre la población de estos animales y otros mamíferos silvestres.

Desde el punto de vista de la conservación de especies amenazadas de extinción, las medidas destinadas al control de enfermedades, en general, sólo se han puesto en práctica en el contexto de epidemias que han causado repentinas e importantes bajas en la población de especies en riesgo (Hudson et al., 2002). Sin embargo, los patógenos que causan altas tasas de mortalidad no pueden persistir en poblaciones pequeñas, por lo que los patógenos generalistas, como la leptospira, revisten mucho más riesgo para especies como el venado de las pampas que para los dependientes de él como hospedador específico. Es por ello que las evaluaciones del riesgo de la población del venado de las pampas deberían tener en cuenta, no sólo el impacto de patógenos que causan altas mortalidades, sino el de aquellos causantes de enfermedades crónicas y persistentes en ambientes como el de la Bahía Samborombón, y que podrían causar una declinación de la población a través de sus efectos sobre la fecundidad y la natalidad.

Por otra parte, en el marco del plan de vigilancia para la erradicación de la EA en el país, la detección de una mayor cantidad de animales portadores del

Tabla 1. Enfermedades estudiadas, tipo de muestras y métodos de diagnóstico utilizados.

Enfermedad y tipo de análisis	Muestra	2013			2014			2015			Total		
		n	Pos	(%)	n	Pos	(%)	n	Pos	(%)	n	Pos	%
Aislamiento bacteriológico*	Linfonódulo	5	-	-	28	8	28,57	nr	nr	nr	33	8	24,24
<i>Brucella</i> spp.: BPA	Suero	65	-	-	28	2	7,14	13	-	-	106	2	1,89
PRCV: ELISA de bloqueo	Suero	43	-	-	21	-	-	9	-	-	73	-	-
VSV: ELISA	Suero	5	-	-	6	-	-	nr	nr	nr	11	-	-
FA: VIA	Suero	65	-	-	29	-	-	9	-	-	103	-	-
<i>Leptospira</i> spp.: Aislamiento	Riñón	52	1	1,92	22	-	-	nr	nr	nr	74	1	1,35
<i>Leptospira</i> spp.: MAT	Suero	50	23	46,00	29	7	24,14	4	-	-	83	30	36,14
<i>Mycobacterium</i> spp: Aislamiento	Linfonódulo	40	-	-	nr	nr	nr	nr	nr	nr	40	-	-
PPA: ELISA de bloqueo	Suero	65	-	-	21	-	-	9	-	-	95	-	-
PPC: IFD	Intestino delgado	27	-	-	37	-	-	nr	nr	nr	64	-	-
PPC IFD	Tonsila	35	-	-	45	-	-	nr	nr	nr	80	-	-
PPC: ELISA IDEXX	Suero	65	-	-	29	-	-	9	-	-	103	-	-
PRRS: Elisa indirecto	Suero	65	-	-	29	-	-	9	-	-	103	-	-
EA: ELISA IDEXX (ADV gp1)	Suero	65	40	61,54	29	18	62,07	10	7	70,00	104	65	62,50
EA: ELISA IDEXX (ADV gp1)	Trasudado muscular	5	1	20,00	8	4	50,00	8	5	62,50	21	10	47,62
EA: PCR	Tonsila	nr	nr	nr	29	11	37,93	9	-	-	38	11	28,95
TGE: ELISA Ingezim Corona Diferencial	Suero	65	-	-	29	-	-	9	-	-	103	-	-

\*Aislamiento de *Pseudomonas* spp. y *Aeromonas* spp. nr: no realizado Pos: Positivo.

virus garantizará la eficacia de las medidas propuestas tendientes a su eliminación, planificada en una tercera etapa por SENASA. Durante el año 2010, y como primera etapa del plan, se realizó el primer relevamiento nacional de la EA teniendo como objetivos: estimar la prevalencia de establecimientos infectados, de cerdas en edad de reproducción infectadas y de cerdas de la categoría crecimiento-terminación infectadas. Los resultados y los análisis epidemiológicos evidenciaron una prevalencia de 19,1 % de predios infectados y 9 % de cerdas infectadas. En ambos casos se evidencia una gran diferencia entre estratos poblacionales, siendo el más afectado el estrato con menor cantidad de madres (SENASA, 2015).

Es evidente la importancia de realizar estudios continuos de vigilancia sanitaria de poblaciones de

cerdos silvestres para conocer las probabilidades de ingreso de un agente patógeno a las explotaciones pecuarias, como así también para disminuir riesgos para las especies amenazadas de la fauna silvestre a las que potencialmente podría afectar.

Los resultados del presente trabajo contribuyen a la vigilancia sanitaria de Argentina y brinda antecedentes de interacción interinstitucional para su mantenimiento en el tiempo. La vigilancia en fauna silvestre es fundamental para el mantenimiento y la documentación del status sanitario nacional. El impacto económico real o potencial de algunas de las enfermedades estudiadas en este trabajo puede ser muy grande y debe ser tenido en cuenta por los entes oficiales relacionados con la sanidad animal y la salud pública de nuestro país.

En relación con la población de jabalíes o cerdos silvestres, el contacto de éstos con explotaciones de cerdos domésticos, como así también su utilización para el consumo de su carne, hace que sea relevante la incorporación de la misma a los planes nacionales de control de enfermedades y de esta manera controlar la aparición de nuevas enfermedades. Dicha población es considerada como de riesgo potencial debido a que está en contacto directo con otras poblaciones de especies domésticas y especies silvestres protegidas, como así también por ser fuente de alimento de pobladores rurales. Ambas características la convierten en una población que puede diseminar patógenos a otros animales y también a los humanos.

En conclusión, resulta evidente la importancia de realizar estudios continuos de vigilancia sanitaria de poblaciones de cerdos silvestres para conocer las probabilidades de ingreso de un agente patógeno a las explotaciones pecuarias, como así también para disminuir riesgos para las especies amenazadas de la fauna silvestre y para la salud pública. Una mejora y sistematización de la vigilancia, logrando interacción interdisciplinaria e interinstitucional, permitirá una mayor comprensión de los fenómenos naturales y no naturales que inciden sobre la ecología y el potencial epidémico de estas enfermedades.

## Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de Andrea Antonuci, Rodrigo Balzano, Graciela Cadenazzi, Rosa De-benedetti, Gabriela Maddonni, Celia Maidana, Ana Nicola, Andrea Pedemonte, Alejandro Pérez, Jessica Petrakovsky, Carlos Rodríguez, Marcos Suarez, Ricardo Veneroni, Carlos Zenobi y el resto del personal del Laboratorio Animal de SENASA. Este trabajo fue parcialmente financiado por el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria de la República Argentina a través del Premio SENASA a la investigación, transferencia y comunicación de la sanidad, la inocuidad y la calidad agroalimentaria otorgado al proyecto: "Vigilancia epidemiológica en poblaciones de cerdos silvestres (*Sus scrofa*) implicancias para la salud pública, la producción animal y la conservación de la biodiversidad." y por un subsidio a la investigación otorgado por la Universidad Nacional Arturo Jauretche.

## Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

## Bibliografía

Al Dahouk S, Nockler K, Tomaso H, Spletstoesser WD, Jungersen G, Riber U, Petry T, Hoffmann D, Scholz HC, Hensel A, Neubauer H. 2005. Seroprevalence of brucellosis, tularemia, and yersiniosis in wild boars (*Sus scrofa*) from north-eastern Germany. *Journal of Veterinary Medicine. Series B.* 52(10):444-55.

Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorios de Diagnóstico (AAVLD). 1994. Manual de Leptospirosis. Buenos Aires.

Bharti A, Nally JE, Ricaldi JN, Matthias MA, Diaz MM, Lovett MA, Levett PN, Gilman RH, Willig MR, Gotuzzo E, Vinetz JM. 2003. Leptospirosis: a zoonotic disease of global importance. *The Lancet. Infectious Diseases.* 3:757-71.

Carpinetti B. 1998. Spatio-temporal variation in a pampas deer (*Ozotocerus bezoarticus celer*) population: influence of habitat structure and sympatric ungulates. Tesis de Master Science, Durrell Institute of Conservation and Ecology, University of Kent at Canterbury, United Kingdom.

Carpinetti B, Castresana G, Rojas P, Grant J, Marcos A, Monterubbianesi M, Borrás P. 2014. Vigilancia epidemiológica en poblaciones de cerdos silvestres (*Sus scrofa*). Implicancias para la salud pública, la producción animal y la conservación de la biodiversidad. *SNS.* 6:67-76.

Corn J, Stallknecht D, Mechlin NM, Page Luttrell M, Fischer JR. 2004. Persistence of pseudorabies virus in feral swine populations. *Journal of Wildlife Diseases.* 40:307-10.

Crosby AW. 1986. Ecological imperialism: the biological expansion of Europe, 900-1900. New York, Cambridge University Press.

Daciuk J. 1978. Estado actual de las especies de mamíferos introducidos en la Subregión Araucana (República Argentina) y grado de coacción ejercido en algunos ecosistemas surcordilleranos. *Anales de Parques Nacionales.* 14:105-30.

Ebani VV, Cerri D, Poli A, Andreani E. 2003. Prevalence of leptospira and brucella antibodies in wild boars (*Sus scrofa*) in Tuscany, Italy. *Journal of Wildlife Diseases.* 39:718-22.

Giménez-Dixon M, 1991. Estimación de parámetros poblacionales del venado de las Pampas (*Ozotoceros bezoarticus celer*, Cabrera 1943 –Cervidae–) en la costa de la Bahía Samborombón (provincia de Buenos Aires) a partir de datos obtenidos mediante censos aéreos. Tesis de Doctorado en Ciencias Naturales, Facultad de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Gresham CS, Gresham CA, Duffy MJ, Faulkner CT, Patton S. 2002. Increased prevalence of Brucella suis and pseudorabies virus antibodies in adults of an isolated feral swine population in coastal South Carolina. *Journal of Wildlife Diseases.* 38:653-6. doi:10.7589/0090-3558-38.3.653

Hudson PJ, Rizzoli A, Grenfell BT, Heesterbeek H, Dobson AP. 2002. The ecology of wildlife diseases. Oxford, Oxford University Press.

Jansen A, Luge E, Guerra B, Wittschen P, Gruber AD, Loddenkemper C, Schneider T, Lierz M, Ehler D, Appel B, Stark K, Nöckler K. 2007. Leptospirosis in Urban Wild Boars, Berlin, Germany. *Emerging Infectious Disease.* 2007 May; 13(5): 739–742. doi: 10.3201/eid1305.061302

Jones K, Patel N, Levy M, Storeygard A, Balk D, Gittleman J, Daszak P. 2008. Global trends in emerging infectious diseases. *Nature.* 451:990-3.

Kern B, Depner KR, Leitz W, Rott M, Thalheim S, Nitschke B, Plagemann R, Liess B. 1999. Incidence of classical swine fever (CSF) in wild boar in a densely populated area indicating CSF virus persistence as a mechanism for virus perpetuation. *Journal of Veterinary Medicine. Series B.* 46:63-7.

Lari A, Lorenzi D, Nigrelli D, Brocchi E, Faccini S, Poli A. 2006. Pseudorabies virus in European wild boar from Central

- Italy. *Journal of Wildlife Diseases*. 42:319-24.
- Mason RJ, Fleming PJ, Smythe LD, Dohnt MF, Norris MA, Symonds ML. 1998. *Leptospira interrogans* antibodies in feral pigs from New South Wales. *Journal of Wildlife Diseases*. 34:738-43.
- Meng XJ, Lindsay DS, Sriranganathan N. 2009. Wild boars as sources for infectious diseases in livestock and humans. *Philosophical transactions- Royal Society. Biological science*. 364:2697-707.
- Merino ML, Carpinetti B. 2003. Feral pig *Sus scrofa* population estimates in Bahía Samborombón conservation area, Buenos Aires Province, Argentina. *Mastozoología Neotropical*. 10(2):269-75.
- Merino M, Vila A, Serret A. 1993. Relevamiento biológico de la Bahía Samborombón, provincia de Buenos Aires. *Boletín Técnico Fundación Vida Silvestre Argentina*. N° 16.
- Müller T, Teuffert J, Ziedler K, Possardt C, Kramer M, Staubach C, Conraths FJ. 1998. Pseudorabies in the European wild boar from eastern Germany. *Journal of Wildlife Diseases*. 34: 251-8.
- Naranjo V, Gortazar C, Vicente J, de la Fuente J. 2008. Evidence of the role of European wild boar as a reservoir of *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Veterinary Microbiology*. 127(1-2): 1-9.
- Navas JA. 1987. Los vertebrados exóticos introducidos en la Argentina. *Revista del Museo Argentino de Ciencias Naturales*. 14 (2):7-38.
- Nishi JS, Shury T, Elkin BT. 2006. Wildlife reservoirs for bovine tuberculosis (*Mycobacterium bovis*) in Canada: strategies for management and research. *Veterinary Microbiology*. 112:325-38.
- Paes R de C, Fonseca AA, Monteiro LA, Jardim GC, Piovezan U, Herrera HM, Mauro RA, Vieira-da-Motta O. 2013. Serological and molecular investigation of the prevalence of Aujeszky's disease in feral swine (*Sus scrofa*) in the subregions of the Pantanal wetland, Brazil. *Veterinary Microbiology*. 165:448-54. doi: 10.1016/j.vetmic.2013.03.028.
- OIE. 2015. Manual de las pruebas de diagnóstico y de las vacunas para los animales terrestres. [ONLINE] Disponible en: <http://www.oie.int/es/normas-internacionales/manual-terrestre/acceso-en-linea/> [Consultado 10/10/2016].
- Petrakovsky J, Tinao J, Esteves J. 2013. Leptospirosis porcina: prevalencia serológica en establecimientos productores de la República Argentina. *Revista MVZ Córdoba*. 18(1):3282-7.
- Petrakovsky J, Carpinetti B, Antonucci A. 2016. Prevalencia serológica de *Leptospira* spp. en cerdos silvestres (*Sus scrofa*) en Bahía Samborombón, provincia de Buenos Aires, República Argentina, en el periodo 2013-2015. *Salud y Tecnología Veterinaria*. 3(1):23-7.
- Serena MS, Artuso MC, Pérez A, Echeverría MG, Laksman Y, Arocena G, Pereyra D, Escobar E, Sanguinetti HR, Zenobi C, Suárez MF, Debenedetti R, Marcos A, Borrás P, Castresana G, Rojas P, Monterubbianesi M, Grant J, Carpinetti B. 2015. Vigilancia epidemiológica de las principales virosis que afectan a las poblaciones de cerdos silvestres (*Sus scrofa*) en distintas zonas de la República Argentina. XI Congreso Argentino de Virología, CABA, Argentina, pp. 114-115.
- van der Leek ML, Becker HN, Humphrey P, Adams CL, Belden RC, Frankenberger WB, Nicoletti PL. 1993. Prevalence of *Brucella* spp. antibodies in feral swine in Florida. *Journal of Wildlife Diseases*. 29:410-5.
- Vengust G, Valencak Z, Bidovec A. 2006. A serological survey of selected pathogens in wild boar in Slovenia. *Journal of Veterinary Medicine. Series B*. 53:24-7.
- SENASA. 2015. Enfermedad de Aujeszky. [ONLINE] Disponible en: (<http://www.senasa.gov.ar/cadena-animal/porcinos/produccion-primaria/sanidad-animal/enfermedades-y-estrassani/enfermedad-de-ajeszky-ea>) [Consultado 10/10/2016].
- Zupancic Z, Jukic B, Lojkic B, Jemers I, Starecina V. 2002. Prevalence of antibodies to classical swine fever, Aujeszky's disease, porcine reproductive and respiratory syndrome, and bovine viral diarrhoea viruses in wild boars in Croatia. *Journal of Veterinary Medicine. Series B*. 49:253-6.

# Microscopía virtual: una nueva herramienta tecnológica para la enseñanza de la histología y la patología

## Virtual microscopy: a new technological tool for teaching histology and pathology

Pachamé AV<sup>1</sup>\*, Portiansky EL<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Análisis de Imágenes. Cátedra de Patología General. Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata.

\*Correo electrónico del autor: [apachame@fcv.unlp.edu.ar](mailto:apachame@fcv.unlp.edu.ar)

**Resumen:** En el curso de Patología General de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata se está llevando a cabo un proceso de transformación de la docencia, al incorporar recursos tecnológicos de la información y la comunicación con el objetivo de mejorar el aprendizaje de la patología por parte de los estudiantes. El presente trabajo proporciona un enfoque general de la microscopía virtual como un novedoso recurso tecnológico complementario, en la enseñanza de disciplinas en las que se emplea el microscopio.

**Palabras clave:** Recurso didáctico, tecnología informática, digitalización, encadenamiento de imágenes digitales

**Abstract:** The General Pathology course from the School of Veterinary Sciences, National University of La Plata, is carrying out a transforming process of teaching by incorporating technological resources of information and communication in order to improve pathology learning by students. This report provides a general approach to virtual microscopy as a novel complementary technological resource in teaching of disciplines based on the use of the microscope.

**Key words:** Teaching resource, information technology, digitization, stitching

## Introducción

La educación superior, en la sociedad actual, requiere de un proceso de flexibilización con respecto a los métodos tradicionales de la enseñanza, que incluyen la aplicación de tecnologías de la información y la comunicación (TIC) en los procesos de formación del estudiante (Salinas, 2010). Sin embargo, su aplicación implica cambios en la concepción del paradigma de la enseñanza de los profesores, acostumbrados al uso de herramientas tradicionales. Se requiere, además, de cambios administrativos en relación con el diseño y distribución de las aulas y el equipamiento necesario para llevar a cabo estas modificaciones. Todo ello implica cambios en los modelos de enseñanza-aprendizaje hacia un modelo más flexible (Salinas, 2010).

Particularizando en los estudiantes de las asignaturas que emplean el microscopio como herramienta fundamental para la observación de muestras histológicas e histopatológicas, resulta evidente la necesidad de buscar nuevos métodos y técnicas al servicio de la educación superior, que fortalezcan el proceso educativo (Figuroa *et al.*, 2015). En este contexto, surge la posibilidad de incorporar la microscopía virtual (MV) como una nueva estrategia metodológica en cursos de carreras de la salud (Figuroa *et al.*, 2015). El aprendizaje de la organización celular y la estructura de tejidos y órganos, constituye una competencia fundamental en la formación básica de los estudiantes. Si bien la habilidad en el uso de la MV estará dirigida por el profesor, es el estudiante quien debe saber reconocer los distintos elementos tisulares, interpretar su morfología y disposición (Peña Amaro, 2006). Para ello se precisa un bagaje previo de información, que le permita al estudiante tener la capacidad resolutive para una correcta interpretación de la muestra, tal como sucede en la microscopía convencional (Peña Amaro, 2006).

El ojo humano, a pesar de sus imperfecciones, es la herramienta biológica ideal para capturar las imágenes que posteriormente serán almacenadas, procesadas y analizadas por el sistema nervioso. Lamentablemente, no existe aún un dispositivo que permita extraer y compartir lo que cada individuo observa, de manera directa y en tiempo real. Existe, en cambio, la posibilidad de registrar físicamente diferentes eventos, a través de dispositivos analógicos y digitales que reproducen imágenes. Estos dispositivos son capaces de capturar procesos que ocurren a niveles inalcanzables para el ojo humano, tanto por su dimensión como por su longitud de onda de emisión (Portiansky, 2013).

La MV es una herramienta que puede ser utilizada por todos los cursos que emplean el microscopio como instrumento de observación de diversos materiales biológicos (tejidos y células animales y vegetales)

y de elementos inanimados. En el presente trabajo describimos las herramientas y los pasos necesarios para la digitalización de muestras histológicas e histopatológicas, para su posterior observación y análisis mediante sistemas informáticos.

## Descripción metodológica

Para la digitalización de las muestras son necesarios un microscopio, una cámara de video y una computadora que contiene un programa capaz de integrar el registro de la cámara de video en tiempo real. En el Laboratorio de Análisis de Imágenes de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata contamos con un microscopio directo de campo ampliado (Olympus BX53, Japón), en el que se reemplazó la platina convencional por otra de carácter motorizado (Prior Scientific Instruments H101AFI, EE.UU.), que permite los desplazamientos de la misma en los ejes X, Y y Z (Fig. 1). De esta manera, el microscopio permite escanear muestras completas procesadas con diferentes técnicas histológicas, histoquímicas, inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia. Sobre este microscopio trinocular se monta una cámara color de video digital (Olympus DP73, Japón), a través de un adaptador, que en nuestro caso cuenta con una lente reductora de 0,5X, lo que permite aumentar el campo de visión de la muestra, reduciendo el aumento del objetivo a la mitad. Esta cámara se conecta a una computadora que contiene el programa cellSens Dimension (Olympus v1.6), que permite capturar las imágenes registradas por la misma. A su vez, el *software* controla la platina motorizada en los tres ejes del microscopio. El uso de la platina es fundamental para integrar todas las imágenes que se capturan de la muestra que se está observando, mediante un proceso de *stitching* (anidamiento digital de imágenes capturadas en secuencia).



Figura 1. Detalle de la platina motorizada. Microscopio de campo ampliado, directo, en la que se instalaron una platina motorizada (1) que controla los ejes X e Y y un dispositivo para movilizar la platina en el eje Z (2).

Para el escaneo de las muestras (proceso por el cual la platina motorizada se desplaza en los ejes X e Y), se requiere que en cada paso de desplazamiento (aproximadamente 400  $\mu\text{m}$ ) se genere un disparo automático de la cámara de video, lo que permite capturar la imagen que se encuentre enfocada en el eje Z. Para ello, el *software* cuenta con una función apropiada llamada MIA (del inglés, *multiple image alignment*). Las imágenes así escaneadas se superponen en un porcentaje (10% en nuestro caso) con la imagen capturada en el paso previo y en la hilera superior. Para la observación posterior, es necesario que el escaneo se realice con la mayor magnificación a la que se quiera arribar. De acuerdo con el grado de resolución que se desee conseguir, el objetivo utilizado será de 20X o 40X, aunque también se pueden utilizar magnificaciones mayores.

La resolución de cada fotograma que forma la imagen final depende de las características de la cámara que se utilice para la captura. En nuestro caso, la resolución de cada imagen individual era de 1600x1200 pixeles, que cubre un área aproximada de 91665  $\mu\text{m}^2$  ( $\sim 0,091 \text{ mm}^2$ ;  $\sim 0,2185 \mu\text{m}/\text{Px}$ ), si se utiliza un objetivo de 40X, que genera un aumento final de 20X (40X del objetivo multiplicado por 0,5X del adaptador de la cámara). De esa manera, para cubrir 10  $\text{mm}^2$  de superficie de un tejido, se requerirán aproximadamente 110 imágenes encadenadas (Fig. 2).

La imagen obtenida del escaneo de la muestra puede ser almacenada en formato TIF, lo que permite que se conserven todas las particularidades de luz y resolución establecidas en el momento de la captura. Esta imagen podrá ser observada con cualquier visualizador, procesador o analizador de imágenes.

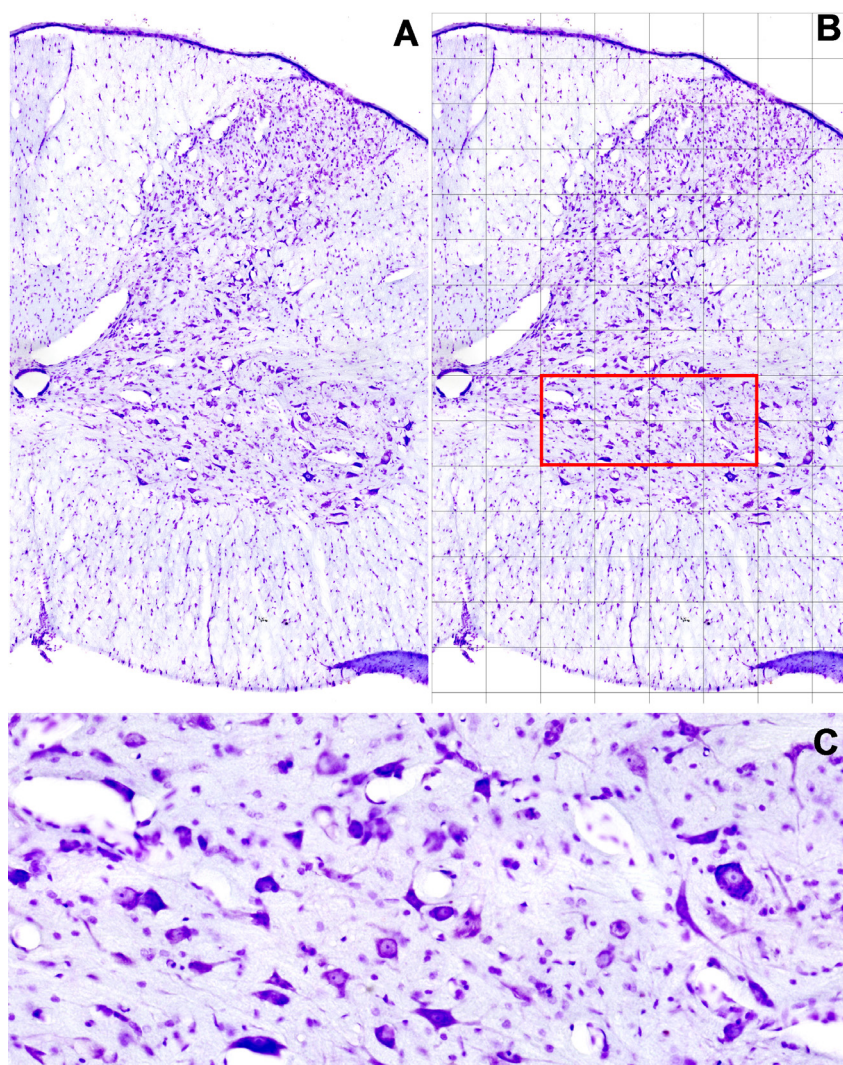


Figura 2. *Stitching* (anidamiento digital de imágenes capturadas en secuencia) de imágenes de la médula espinal de rata. (A) Hemimédula del segmento C5, escaneada con un aumento final de 20X. (B) La misma imagen (A) segmentada en cada una de los fotogramas individuales utilizados para componer la imagen final. (C) Ampliación de la imagen (B) (recuadro rojo circunscribiendo cuatro columnas y dos filas de imágenes) mostrando que la unión entre las imágenes individuales se hace imperceptible.

También puede ser almacenada en el formato VSI, propio del *software* utilizado, que tiene la ventaja de ser interpretado por un visualizador específico de MV, llamado OlyVIA (Olympus). Este visualizador puede ser descargado, de manera gratuita, de la página <http://www.olympus-global.com>. Mediante este programa se puede recorrer toda la muestra, desde el menor (0,5X) hasta el mayor aumento posible (aquel del objetivo del microscopio al que haya sido escaneada la muestra). De esta manera, se podrá integrar toda la muestra y el estudiante podrá recorrer toda la imagen, tal cual lo hubiese hecho con el microscopio (Fig. 3).

## Discusión y conclusiones

Un microscopio virtual puede definirse como el desarrollo de nuevas capacidades digitales que permiten la visión y navegación *on line* a través de muestras digitalizadas a alta resolución (Mikula *et al.*, 2007). El objetivo principal de la MV es crear la llamada “preparación virtual” o “digitalización de la imagen”, guardando toda la información relevante que contiene cada muestra, pero con mayores ventajas que las que brinda el microscopio convencional (García Rojo *et al.*, 2001).

La MV presenta muchas ventajas en relación a la microscopía convencional, entre ellas:

1) Solo se requiere un microscopio para escanear la muestra. Una vez digitalizada, la imagen puede ser enviada a todo el mundo a través de internet o por medios electrónicos de almacenamiento y observadas en cualquier computadora.

2) Los estudiantes pueden observar la imagen de manera simultánea y en el horario que prefieran.

3) La muestra no necesita ser trasladada desde su lugar de procesamiento para su observación evitando, de esa manera, su extravío o ruptura.

4) La imagen digital permite señalar diferentes estructuras y guardarlas en el mismo archivo.

5) Permite realizar estudios morfométricos sin la necesidad de contar con una regla micrométrica, ya que al escanearse se almacena su calibración espacial junto con la imagen.

6) Las imágenes digitales se mantienen estables a lo largo del tiempo, en tanto los cortes montados en portaobjetos pueden decolorarse.

7) La imagen digital solo ocupa un pequeño espacio dentro de un soporte informático, mientras

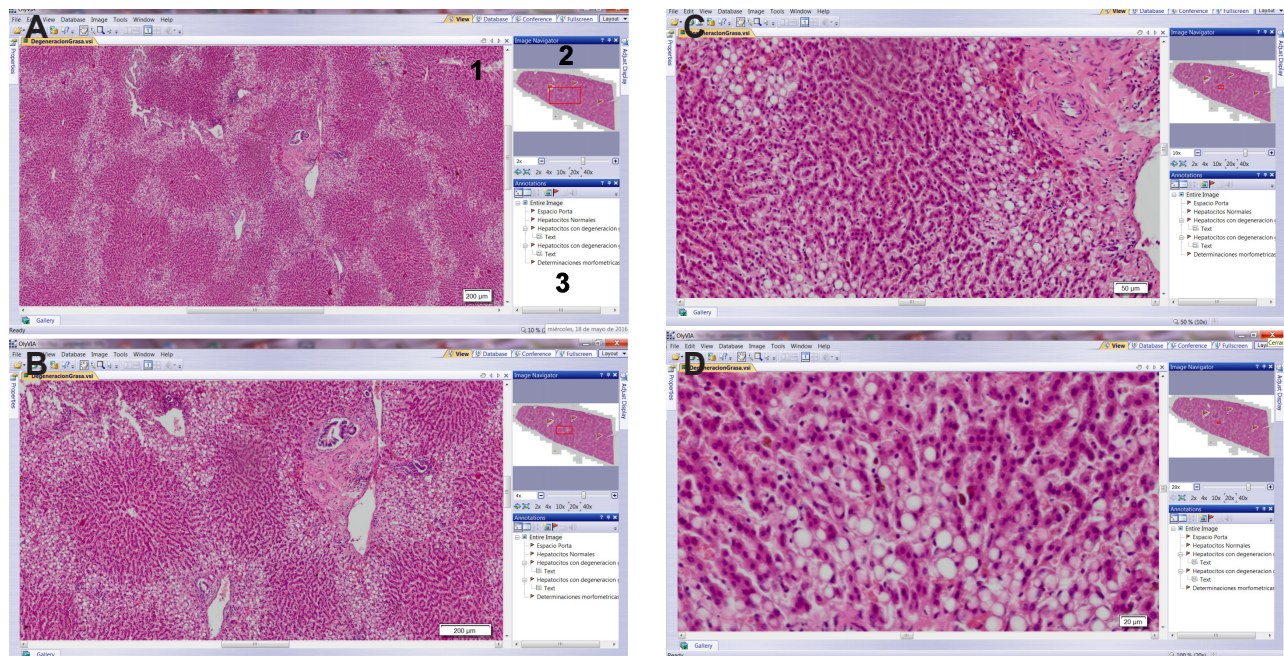


Figura 3. Visualizador de imágenes encadenadas. El programa OlyVIA permite observar distintos aumentos de la imagen escaneada. La pantalla principal del programa se divide en tres sectores. El primero (1) muestra la imagen del tejido en sus distintos aumentos. El sector (2) muestra todo el tejido escaneado y circunscribe en rojo la parte del tejido que se muestra en (1). En el sector (3) se pueden ingresar comentarios acerca de los objetos que se observan en la muestra y se los identifica mediante banderas, las que también se observan en la imagen del sector (2). Esto permite que todos los estudiantes identifiquen los mismos objetos y reconozcan sus características. En esta figura, se observa un corte de hígado, sufriendo un proceso de degeneración grasa. Los aumentos que se observan son A: 2X, B: 4X, C: 10X y D: 20X.



que los cortes montados en portaobjetos ocupan un espacio físico considerable.

A raíz de la relevancia que genera este tipo de método, se han desarrollado nuevos *hardware* y *software* específicos para tal fin (McCullough *et al.*, 2004). Esta herramienta se utiliza desde hace un año en el curso de Patología General de nuestra carrera. De acuerdo con la encuesta realizada oportunamente (Migliorisi *et al.*, 2016; Santelices Iglesias *et al.*, 2016), la implementación de la MV tuvo un alto grado de satisfacción entre los estudiantes del curso.

Se trata, entonces, de una herramienta relevante y prometedora que tiene una gran utilidad, no sólo docente, sino también en la investigación y en el diagnóstico.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses, relaciones financieras, personales o de otro tipo con personas u organizaciones que pudieran afectar al presente trabajo.

## Bibliografía

- García Rojo M, Ferreres LA. Telepatología dinámica. En: Ferreres LA, Rojo MG, 2001. Manual de telepatología. Pamplona; Sociedad Española de Anatomía Patológica, pp. 103-46.
- Figuerola C, Díaz E, Bosco C, Rojas R, Grabe N, Gutiérrez S, López J, García A, Hartel S. 2015. Microscopía virtual: tecnología al servicio de la enseñanza de la Histología/Embriología en cursos de ciencias de la salud. <http://documentos.redclara.net/handle/10786/979> accedido el 1/3/2016.
- McCullough B, Ying X, Monticello T, Bonnefoi M. 2004. Digital microscopy imaging and new approaches in toxicologic pathology. *Toxicologic pathology*. 32(2):49-58.
- Migliorisi AL, Santelices Iglesias OA, Wright C, Grandinetti JAB, Paulovich FB, Saturno PD, Nishida F, Granero Agüero JM, Fontana C, Scenna GS, Sisti MS, Camiña AE, Portiansky EL. Implementación de un microscopio virtual para la enseñanza en el curso de Patología General Veterinaria. Primeras Jornadas sobre las Prácticas Docentes en la Universidad Pública. Dirección de Capacitación y Docencia y la Especialización en Docencia Universitaria. Secretaría de Asuntos Académicos de la UNLP. Abril de 2016.
- Mikula S, Trotts I, Stone JM, Jones EG. 2007. Internet-enabled high-resolution brain mapping and virtual microscopy. *Neuroimage*. 35(1):9-15.
- Peña Amaro J. Competencias y habilidades en histología médica: el potencial formativo de la observación microscópica. *Res Novae Cordubenses IV. Estudios de calidad e Innovación de la Universidad de Córdoba*. 2007; 4:31-46.
- Portiansky EL. Análisis multidimensional de imágenes digitales. 2013. 1a ed. La Plata. Universidad Nacional de La Plata.
- Salinas J. 2010. ¿Qué aportan las tecnologías de la información y la comunicación a las universidades convencionales?

Algunas consideraciones y reflexiones. *Revista Educación y Pedagogía*. 14(33):89-105.

Santelices Iglesias OA, Wright C, Grandinetti JAB, Migliorisi AL, Paulovich FB, Saturno PD, Nishida F, Granero Agüero JM, Fontana C, Scenna GS, Sisti MS, Camiña AE, Portiansky EL. Microscopía virtual como recurso didáctico en actividades presenciales. Primera Jornada de Tecnologías de la Información y la Comunicación (TIC). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de La Plata. Marzo de 2016.

# Evaluación del descarte en cerdas: causas, registros reproductivos e inspección en planta de faena

## Evaluation of sow removal: culling reasons, reproductive data and slaughterhouse inspection

Barrales HS<sup>1, 2, 3\*</sup>, Cappuccio JA<sup>2</sup>, Machuca MA<sup>4</sup>, Williams SI<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Becario Universidad Nacional de La Plata (UNLP); <sup>2</sup>Cátedra de Clínica de Grandes Animales;

<sup>3</sup>Laboratorio de Reproducción Animal; <sup>4</sup>Laboratorio de Patología Especial Veterinaria.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

\*Correo electrónico del autor: [hbarrales@fcv.unlp.edu.ar](mailto:hbarrales@fcv.unlp.edu.ar)

**Resumen:** La evaluación de los registros reproductivos y de las causas de descarte en reproductoras porcinas es una herramienta imprescindible para aplicar estrategias de descarte eficaces y lograr una mayor eficiencia productiva. Esto se debe al impacto económico y productivo que representan la compra y preparación de nuevas reproductoras. Las limitaciones que presenta el examen clínico reproductivo en la hembra porcina hace necesaria la aplicación de herramientas que permitan dar un enfoque más objetivo a las políticas y decisiones de descarte reproductivo. Entre las herramientas que se pueden considerar se incluyen: el análisis de registros reproductivos individuales y poblacionales, la evaluación de longevidad en reproductoras y la inspección del aparato genital en planta de faena.

**Palabras clave:** cerda, descarte, registros reproductivos, aparato genital

**Abstract:** The evaluation of reproductive records and culling reasons in sows is essential to implement effective removal strategies and obtain greater efficiency. This is due to the economic and productive impact represented by the costs of purchasing and preparing new gilts. The anatomical restrictions for a reproductive clinical examination in sows require other tools, such as evaluation of reproductive records, sow longevity and inspection of the genital tracts at the slaughterhouse in order to give more objective approach regarding the breeder removal policies and decisions.

**Keywords:** sow, culling, reproductive data, genital tract

## Introducción

La evaluación de los registros reproductivos y de las causas de descarte en reproductoras porcinas es una herramienta imprescindible para aplicar estrategias de descarte eficaces y lograr una mayor eficiencia productiva. Esto se debe al impacto económico y productivo que representan la compra y preparación de nuevas reproductoras (D'Allaire et al., 1987, 1992, 2006; Engblom et al., 2008; Knauer et al., 2007; Sasaki et al., 2010; Vargas et al., 2009).

Para una completa evaluación del descarte en granjas porcinas deben considerarse cuatro apartados:

- I. Tasa de descarte anual y tasa de reposición anual
- II. Causas de descarte
- III. Registros reproductivos
- IV. Inspección del aparato genital en frigorífico

El análisis de las tasas y de las causas de descarte nos permite conocer no sólo el modo en que se realiza el descarte dentro del establecimiento sino también poder identificar las causas de descarte que generan mayor impacto. Asimismo, el análisis de registros permite evaluar si el descarte de reproductoras se está realizando de manera correcta y, además, medir el impacto económico y productivo que estos representan. Por último, la evaluación del aparato genital (AG) en frigorífico nos permite evaluar si existe asociación entre lesiones del AG y la decisión de descarte (Koketsu et al., 1997a; Rodríguez-Zas et al., 2003; Sasaki et al., 2010). El objetivo del presente trabajo fue realizar una revisión de las principales causas de descarte en productores porcinos, de los factores asociados y de las herramientas disponibles para su análisis.

### I. Tasa de descarte y reposición anual

Se entiende por tasa de descarte anual (TDA) al porcentaje de hembras descartadas por un establecimiento a lo largo de un año. Los valores de TDA presentados por diferentes autores oscilan entre un 15 y un 85 % (D'Allaire et al., 1987, 1992, 2006; Engblom et al., 2008; Knauer et al., 2007; Sasaki et al., 2010; Vargas et al., 2009).

La tasa de reposición anual (TRA) indica la cantidad de cerdas a reponer a lo largo de un año. En Argentina, esta tasa oscila históricamente entre el 25 % y el 35 %, observándose en los últimos años incrementos que alcanzan valores del 40 % al 50 %. En granjas comerciales el objetivo es alcanzar una TRA que oscile entre el 39 % y el 40 %, en la que la reposición por descarte represente el 35 o el 36 % y

la debida a la muerte de reproductoras un 3 % a un 5 % (Dial et al., 1992; D'Allaire et al., 1999; Muirhead, 1976; PIC Latinoamérica, 2015).

Ambas tasas pueden ser calculadas sobre el total de cerdas productivas del establecimiento o bien sobre el inventario promedio de reproductoras (IPR). El IPR es la cantidad de hembras que son servidas en el establecimiento a lo largo del periodo que se desea evaluar (generalmente mensual o anual). Es importante incluir dentro del IPR a las cerdas nulíparas descartadas, para no generar un sesgo en los resultados. La comparación de la TDA y la TRA entre los diferentes establecimientos suele ser difícil de evaluar debido a que existen diferencias en las instalaciones, en el manejo y en la calidad de operarios, entre otros factores (D'Allaire et al., 1987, 1992, 2006; Knauer et al., 2007).

Se sugiere que la TDA y la TRA deben estar equilibradas entre sí y con valores que oscilen entre un 35 % y un 40 %. De esta manera se logra mantener constante el inventario de reproductoras para conseguir la estabilidad reproductiva e inmunológica del plantel, con mayor probabilidad de maximizar la productividad de la granja. Las consecuencias del desequilibrio entre las tasas se presentan en la tabla 1. Hay dos condiciones en las que la falta de equilibrio es aceptada, en granjas que están en periodo de expansión y en aquellas que se encuentran reduciendo la cantidad de cerdas productivas (D'Allaire et al., 1992, 2006; Koketsu et al., 1997a; Sasaki et al., 2010).

### II. Causas de descarte

Las causas de descarte en hembras porcinas pueden agruparse en categorías; esto facilita su estudio y permite realizar comparaciones entre diferentes establecimientos. El conocimiento de dichas causas es útil para determinar la ocurrencia de cada una y detectar problemas (D'Allaire et al., 1987, 1999; Sasaki et al., 2010).

Estas causas suelen dividirse en descartes reproductivos (DR) y descartes no reproductivos (DNR). Los DR representan del 3 % al 42 % de los descartes. Incluyen problemas de fertilidad (retorno al celo regular o irregular, control de preñez negativo), falta de celo, abortos y descarga vulvar. Dentro de los DNR se incluyen: edad avanzada, sobrepeso, trastornos del aparato locomotor, alteraciones de la glándula mamaria y baja productividad (poca cantidad de lechones nacidos vivos y destetados). Estos representan entre el 58 % y el 97 % de los descartes (D'Allaire et al., 1987; Engblom et al., 2007; Heinonen et al., 1998; Koketsu et al., 1997a; Tummaruk et al., 2009; Sasaki et al., 2010; Vestergaard et al., 2006).

El descarte puede realizarse en forma programada y no programada. Las causas de descarte

Tabla 1. Consecuencias sobre la productividad de la relación tasa de descarte anual/tasa de reposición anual (TDA/TRA).

TDA	TRA	Efecto sobre el plantel	Consecuencias
			Disminución de la cantidad de lechones destetados/hembra/año Incremento del riesgo de ingreso de agentes infecciosos
Alta	Alta	Exceso de cerdas jóvenes	Inestabilidad inmunológica del plantel reproductor y posibles fallas en la inmunidad pasiva ("calostrado") Aumento de los costos de producción
Alta	Normal	Disminución de la cantidad de cerdas	Reducción de la cantidad de madres del establecimiento Eficiencia del plantel variable, según la política de descarte
Baja	Baja	Exceso de cerdas con más de 6 partos	Disminución de la productividad individual a partir del quinto parto Disminución de la productividad global de la granja Aumento del número de madres del establecimiento
Normal	Alta	Aumento de la cantidad de cerdas	Eficiencia del plantel variable, según la planificación de la reposición para el crecimiento de la granja Inestabilidad inmunológica del plantel reproductor y posibles fallas en la inmunidad pasiva ("calostrado")

programado son: baja productividad, edad avanzada y sobrepeso. Los descartes programados son planificados por el productor, permiten organizar la reposición y, en consecuencia, no se produce un aumento significativo de los días no productivos (DNP). Los descartes no programados incluyen trastornos locomotores y fallas reproductivas. Estos descartes son los de mayor impacto económico y productivo, dado que en algunos casos no se cuenta con suficientes hembras de reemplazo, lo que lleva a retener hembras en las que estaría indicado el descarte. Esta situación, representa un mayor riesgo de fracaso reproductivo, menor productividad y aumento de los DNP (D'Allaire *et al.*, 1999).

## II.a. Descarte reproductivo

### Problemas de fertilidad

Los problemas de fertilidad están dentro de las causas más comunes de DR y se caracterizan por un fallo en la concepción o en el mantenimiento de la preñez. Ante la presentación de un problema, el desafío para el productor o asesor está en lograr detectar las causas que generaron dicha falla. El primer paso es tener en cuenta la cantidad de partos de las cerdas afectadas, el ambiente, la nutrición y el manejo reproductivo. Luego debe aplicarse el siguiente enfoque sistemático: 1. Determinar si los retornos al celo son regulares o irregulares. 2. Determinar si la falla está relacionada con una causa infecciosa o no infecciosa. 3. Establecer si la causa está relacionada con la hembra, el macho o el error humano. 4. Evaluar minuciosamente la rutina de servicio. De este modo podremos clasificar de manera correcta dichas fallas y aplicar las medidas apropiadas (Kirkwood *et al.*, 2012; Koketsu *et al.*, 1997a).

La aparición de un retorno al celo regular o irregular depende del momento en que se produce la muerte embrionaria en relación al reconocimiento materno de la preñez (RM). Dicho reconocimiento está mediado por la producción de estrógenos fetales, la que comienza el día 12 de gestación y se completa hacia el día 18 (Almond *et al.*, 2006; First & Staigmiller 1973; Kirkwood *et al.*, 2012; Rutter & Russo, 2002). Si no hubo concepción o si se produce una muerte embrionaria que deja viables menos de cuatro embriones antes del RM la cerda retornará al celo a los 21±3 días, lo que se denomina retorno regular. Cuando los embriones mueren luego del RM, los cuerpos lúteos se mantendrán activos por más tiempo, dando como resultado un retorno a intervalo irregular, observándose conducta de celo entre los 25 y 39 días postservicio (Rutter & Russo, 2002). El conocimiento de este concepto es útil en el momento de evaluar las causas de retorno, ya que los retornos regulares generalmente están asociados con causas no infecciosas, tales como: fallas en los padrillos, semen, técnica y momento de inseminación, clima e instalaciones, estrés durante el primer tercio de la gestación, quemaduras por sol en sistemas a campo, intoxicación con zearalenona, entre otros. Por otra parte, los retornos irregulares generalmente están asociados con causas infecciosas (Almond *et al.*, 2006), siendo las más comunes en Argentina la parvovirus, la enfermedad de Aujeszky, la brucelosis y la leptospirosis.

### Falta de celo

La falta de celo es una de las causas de eliminación más comunes en cerdas de menos de 2 partos.

El principal signo asociado es el anestro, es decir, la falta de manifestación externa de celo. El mismo puede ser fisiológico (durante la gestación y la lactancia) o patológico (Safranski & Cox 2007; Soede et al., 2011). A partir de estudios ultrasonográficos y de inspección del aparato genital en frigorífico, se pudo determinar que el anestro patológico se encuentra relacionado, en la mayoría de los casos, con la inactividad de los ovarios (Almond et al., 2007; Knauer et al., 2007; Rodríguez et al., 2008).

La falta de celo se manifiesta productivamente con un retraso o falta de pubertad en cerdas nulíparas y un aumento del intervalo destete-celo o falta del celo posdestete en cerdas primíparas y pluríparas (Almond et al., 2007; Koketsu et al., 1997a). Hay estudios que indican que las cerdas con intervalo destete-celo de más de 30 días presentan un riesgo mayor de descarte que las cerdas con un intervalo menor a 4 días. Es de gran importancia realizar un examen clínico-reproductivo individual y poblacional con el fin de determinar si la falta de celo se debe a un anestro real o a problemas en la detección del mismo por parte de los operarios (Serenius & Stalder 2006). En relación con la edad, el riesgo de descarte por anestro es mayor para las cerdas nulíparas que para las cerdas adultas (D'Allaire et al., 1987; Tummaruk et al., 2006). Son varios los factores que influyen en la presentación de anestro en la cerda. Dentro de los más frecuentes pueden enumerarse: la época del año, la presencia de quistes ováricos, un bajo nivel de consumo de alimento en la lactancia, la duración de la misma, una baja condición corporal y el estado sanitario (Koketsu et al., 1997a, 1997b; Vargas et al., 2009).

### Aborto

El aborto representa un bajo porcentaje de los DR, del 1% a 4% (D'Allaire et al., 1987, 2006). Es necesario realizar un correcto diagnóstico de la causa de aborto para tomar la decisión de descarte. Las causas de aborto pueden ser infecciosas o no infecciosas; dentro de las últimas se incluyen: trauma, afecciones del aparato locomotor, tóxicos, variaciones climáticas y estrés. El diagnóstico de las mismas se basa en la anamnesis, la historia reproductiva y los signos clínicos (Tubbs, 2007).

Como causas de aborto infeccioso en la especie porcina se incluyen agentes bacterianos y virales; dentro de los primeros, *Brucella suis*, diferentes serovariedades de *Leptospira interrogans* y *Erysipelothrix rhusiopathiae* son los involucrados con mayor frecuencia. Los agentes virales más frecuentes son: virus del síndrome respiratorio y reproductivo porcino, virus de la peste porcina clásica

(exóticos en Argentina), virus de la Enfermedad de Aujeszky, parvovirus porcino, circovirus porcino tipo 2 y virus de influenza porcina (SENASA, 2013, 2016; Straw et al., 2006; Torremorrell, 2007).

### Descarga vulvar

En la cerda, las descargas vulvares (DV) pueden ser normales o anormales. Dentro de las DV normales encontramos la observada durante el celo, que es una secreción escasa, serosa, transparente y filante y las descargas puerperales que son sanguinolentas (de Winter et al., 1995). Las DV anormales son generalmente más abundantes y pueden ser serosas, purulentas, hemorrágicas o combinaciones de ellas.

Las descargas purulentas son el principal signo clínico de endometritis y se presentan con mayor frecuencia durante el posparto o en el periodo postservicio. Esto se debe a que el útero, en estos periodos, se encuentra bajo la influencia de la progesterona ( $P_4$ ) que induce inmunosupresión en el endometrio, lo que predispone a infecciones (Almond et al., 2006).

Durante los primeros días posparto los niveles de  $P_4$  se mantienen elevados y permiten la proliferación de los microorganismos presentes en el tracto genitourinario y/o predisponen a infecciones de origen ambiental. Es por esto que una higiene deficiente de las salas de maternidad aumenta el riesgo de presentación de endometritis y DV en este periodo (Almond et al., 2007; Carabin et al., 1995; Dalin et al., 2004; Fangman & Carlson Shannon, 2007). La endometritis postservicio está relacionada con la higiene de la vulva, del prepucio de los padrillos y de los elementos de inseminación artificial. El momento en que se realiza la inseminación artificial puede influir en la presentación de infecciones uterinas. Las cerdas que son inseminadas hacia el final del estro tienen mayor riesgo de presentar endometritis; esto se relaciona con una disminución de las concentraciones plasmáticas de estradiol ( $E_2$ ) y con un aumento de  $P_4$  luego de la ovulación. Resumiendo, una higiene deficiente en el momento del servicio y/o una inseminación tardía incrementan el riesgo de presentación de endometritis y DV (Almond et al., 2006; Carabin et al., 1996; de Winter et al., 1995).

De todos modos, para que una reproductora sea descartada por este motivo debe presentar alguna falla reproductiva, siendo la repetición insidiosa de celo el principal signo clínico asociado. Si se presenta un exceso de descarte por esta causa se deben evaluar las condiciones de higiene y desinfección en el momento de la inseminación artificial y de asistencia durante el parto (Carabin et al., 1995; Fangman & Carlson Shannon, 2007; Tummaruk et al., 2009).

## Baja productividad

Las cerdas son incluidas dentro de esta categoría cuando su nivel de producción se encuentra por debajo de lo esperado en relación con la edad de la misma. Dentro de las razones de descarte se incluyen: tamaño de camada reducido, baja cantidad de lechones destetados y bajo peso (al nacer o al destete). La baja productividad (BP) representa entre el 4 % y 21 % de los descartes. Esta variación depende de los objetivos productivos de cada establecimiento y de otros factores (D'Allaire *et al.*, 1987, 2006).

La BP puede estar asociada a varios factores, tales como la edad, la alimentación de las cerdas, la genética, el manejo del semen, los servicios y los protocolos de IA, entre otros (Soede *et al.*, 1995). Las deficiencias alimentarias, especialmente durante la lactancia y el periodo posdestete, son los problemas observados con mayor frecuencia (Hoving *et al.*, 2010; Knox *et al.*, 2002; Tsakmakidis *et al.*, 2010). Durante estos periodos, un balance energético negativo produce una disminución de la actividad folicular, de la tasa de ovulación, de la viabilidad embrionaria y, en consecuencia, del tamaño de la camada (Hoving *et al.*, 2010). Es necesario tener en cuenta el papel de los machos dentro de las causas de BP, ya que la calidad seminal podría estar relacionada con la viabilidad embrionaria (Knox *et al.*, 2002; Tsakmakidis *et al.*, 2010).

## II.b. Descarte no reproductivo

### Edad avanzada

La edad avanzada representa entre el 3 % y 33 % del total de los descartes. En algunos casos, la edad avanzada está relacionada con una disminución de la productividad (la cual es esperable a partir de séptimo u octavo parto) o con sobrepeso que dificulta el manejo y la contención de las hembras, sobre todo en sistemas de gestación y lactancia en jaula individual (D'Allaire *et al.*, 1987, 2006).

### Trastornos del aparato locomotor

Los trastornos del aparato locomotor (TAL) son, junto con las fallas reproductivas, las causas de descarte prematuro más frecuentes en producción porcina (Engblom *et al.*, 2007; Serenius & Stalder, 2006). El impacto económico que estos representan se atribuye a que las cerdas con TAL generalmente son descartadas antes de su cuarto parto, no pudiendo alcanzar su pico productivo. Estos descartes prematuros se traducen en una menor cantidad de camadas por cerda por año y menor cantidad de lechones destetados por hembra por año, aumentando los costos por lechón destetado (Anil *et al.*, 2005; D'Allaire *et al.*, 1987; Dewey *et al.*, 1993).

Los factores que predisponen a la aparición de TAL son: la genética, las condiciones de alojamiento, el bajo consumo de alimento y/o deficiencias nutricionales, la falta de ejercicio y los pisos no enrejillados y/o demasiado duros (Anil *et al.*, 2005; D'Allaire *et al.*, 1987; Oliviero *et al.*, 2010). Algunos autores indican que las cerdas alojadas en gestaciones grupales presentan mayor riesgo de desarrollar lesiones de origen traumático, artritis y, en consecuencia, cojera, pero un menor riesgo de presentar lesiones en las pezuñas, tales como lesiones de la línea blanca o fracturas de muralla (Calderón Díaz *et al.*, 2014; Heinonen *et al.*, 1998; Schenck *et al.*, 2008).

El signo clínico asociado a los TAL es la claudicación o la imposibilidad para desplazarse y mantenerse en pie. Es importante determinar el tipo de afección presente y su causa para lograr disminuir la cantidad de cerdas descartadas por este motivo. Las afecciones del aparato locomotor más comunes son: ruptura o reblandecimiento de pezuñas, lesiones traumáticas, osteocondrosis, fracturas, osteomalacia y artritis infecciosas o de origen mecánico (Dewey *et al.*, 1993). En relación con los factores genéticos, se ha descrito que las cerdas hiperprolíficas son más susceptibles a presentar osteomalacia, debido a que muchas veces no logran reponer las pérdidas de minerales que ocurren durante la lactancia (Anil *et al.*, 2005).

### Alteraciones de la glándula mamaria

Las alteraciones de la glándula mamaria (AGM) representan entre el 1 % y el 36 % de los descartes. Este amplio rango puede deberse a diferencias en los sistemas de producción, principalmente entre gestaciones individuales y grupales. En estos últimos se registran mayor cantidad de AGM, especialmente procesos inflamatorios, tales como las mastitis y los abscesos mamarios (Heinonen *et al.*, 1998; Kirkwood *et al.*, 2012). Las AGM pueden dividirse en dos grupos: alteración de la producción láctea y procesos inflamatorios. Ambos suelen estar asociados al síndrome de agalaxia o hipogalaxia posparto. Los procesos inflamatorios, que incluyen cuadros de mastitis clínica y subclínica, son de etiología multifactorial y están influenciados por diversos factores predisponentes (Klopfenstein *et al.*, 2006).

En cerdas con mastitis clínica se observa temperatura rectal mayor a 40 °C, anorexia, constipación, tumefacción, enrojecimiento y dolor a la palpación de las mamas, presencia de secreción purulenta a través de los pezones y, en casos crónicos, endurecimiento de las mamas con pérdida del tejido glandular. En las camadas de cerdas con AGM se observa una disminución del aumento diario de peso y aumento de la mortalidad de lechones asociada a la inanición e

infecciones sistémicas (Fangman & Carlson Shannon, 2007; Klopfenstein et al., 2006).

### III. Registros reproductivos

Como se expresó anteriormente, un exhaustivo análisis de registros relacionados con el descarte y reposición nos permite: supervisar cómo se realizan los mismos, aumentar la longevidad de las reproductoras, disminuir el descarte de cerdas jóvenes, aumentar la productividad/cerda/año, disminuir los DNP y reducir los costos relacionados con el descarte y la reposición (Koketsu, 2005; Rodríguez-Zas et al., 2003).

En un establecimiento, la longevidad de las cerdas se encuentra íntimamente relacionada con la cantidad de lechones producidos durante su vida productiva y con los costos y los riesgos de la introducción de nuevas reproductoras al establecimiento (Deen, 2003a; Serenius & Stalder, 2006). En producción porcina se considera que no es económicamente beneficioso descartar una elevada cantidad de cerdas antes de su cuarto parto. Esto se relaciona con un aumento en los costos de reposición debido a la menor cantidad de lechones producidos y al descenso del porcentaje de parición asociados a una elevada cantidad de cerdas jóvenes (D'Allaire et al., 2006).

Los principales registros a evaluar para mejorar las políticas de descarte y reposición son los siguientes (Deen, 2003b):

1. La distribución de partos en el plantel reproductor
2. Los días no productivos (DNP)
3. El tiempo de permanencia en la granja o edad al descarte (*herdlife*)

#### III.a. Distribución de partos en el plantel reproductor

La distribución de partos en el plantel reproductor es el primer dato que debe analizarse, dado que permite evaluar rápidamente las políticas de descarte y reposición y el posible impacto de dichas prácticas. Es un tema complejo y variable, ya que la distribución dentro de cada granja se relaciona con la tasa de concepción, edad de las cerdas al descarte, tamaño de camada y consumo de alimento, entre otros factores. Esto hace que la distribución óptima pueda variar de un establecimiento a otro (Dhuyvetter, 2000; D'Allaire et al., 2006).

Las recomendaciones para una distribución óptima son variables y las propuestas por algunos autores se muestran en la Figura 1. D'Allaire et al (2006) consideran que, para obtener una madurez óptima del plantel reproductor, es necesario que el 90 % de las cerdas nulíparas servidas alcancen el primer parto

y el 90 % de las cerdas de primer parto alcancen el segundo. Spörke (2009) sostiene que la distribución óptima se logra cuando más del 52 % de los partos de la granja son de cerdas de entre 3 y 6 partos.

En lo que coinciden la mayoría de los autores es que, para lograr un plantel equilibrado, la distribución de partos debe tener forma de pirámide escalonada descendente hacia la derecha, como puede observarse en la figura 1, con una reducción porcentual entre parto y parto de 10 % a 15 %. Esta distribución "modelo" deberá adaptarse a los costos y disponibilidad de reposición, la habilidad de los operarios y la situación de mercado para obtener el mayor beneficio económico posible (Dhuyvetter, 2000; D'Allaire et al., 2006; Morrison et al., 2002; Muirhead & Alexander, 2001).

#### III.b. Días no productivos

El análisis de los DNP de una cerda es un paso indispensable para tomar la decisión de descarte, ya que refleja el costo económico y el productivo de la misma. Se define como DNP a los días en los que la cerda se encuentra vacía y no está en lactancia. Para maximizar los resultados del análisis, los DNP pueden ser divididos en categorías basadas en los diferentes periodos de la vida productiva de una cerda, como se muestra en la tabla 2. La identificación de cada una de estas categorías permite obtener información más precisa de cada cerda y tomar una decisión de descarte justificada, sobre la base de sus resultados productivos y económicos (Koketsu, 2005).

Las hembras descartadas por fallas reproductivas presentan una mayor cantidad de DNP relacionados al descarte, especialmente las cerdas de menos de tres partos, contrariamente a lo que ocurre con los descartes programados (Anil et al., 2005; Engblom et al., 2007). La falla más común en el análisis de este registro es no contabilizar los DNP relacionados con el descarte de cerdas nulíparas (Deen, 2003b; D'Allaire et al., 2006).

#### III.c. Tiempo de permanencia en la granja o edad al descarte (*herdlife*)

El índice de longevidad o *herdlife* (HL) indica el tiempo de permanencia de las cerdas en la granja. Puede expresarse de dos maneras: la cantidad de partos al momento del descarte o la cantidad de días transcurridos desde la entrada de una cerda hasta su descarte. El HL permite relacionar las causas de descarte con la edad de las reproductoras, dato de gran importancia para lograr una mejor eficiencia de descarte (Engblom et al., 2007). No es conveniente analizar solamente el valor promedio de HL, dado que el mismo puede estar influenciado por valores

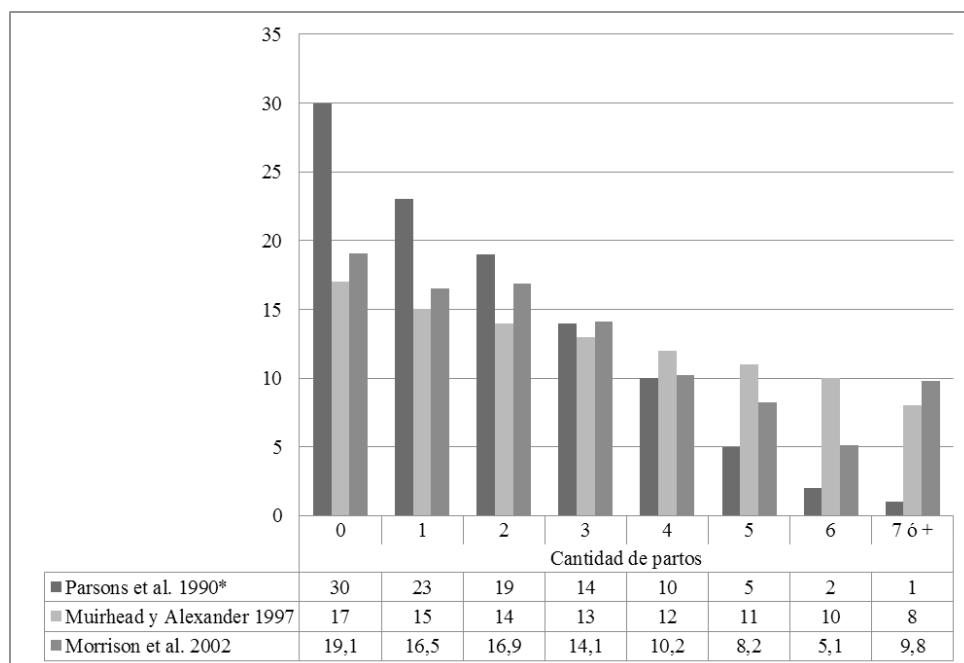


Figura 1. Recomendaciones de distribución óptima de partos según diferentes autores (valores expresados en porcentaje). \*Adaptado de D'Allaire *et al.* 2006.

extremos. Cuando se trabaja con datos de paridad, debería confeccionarse un gráfico similar al utilizado para el análisis de la distribución de partos. Como se observa en la figura 2, la distribución de partos al descarte debe ser inversa a la distribución del plantel en producción, siendo que la mayoría de los descartes se concentran en las cerdas de 6, 7 y 8 partos (Deen, 2003a). Como referencia, valores promedio de HL entre 4 y 5 partos son considerados aceptables (D'Allaire *et al.*, 2006).

La importancia económica del análisis de longevidad en una granja radica en que si una cerda es descartada antes de su cuarta parición solamente se alcanzan a recuperar los costos de compra o preparación de la misma (Rodríguez-Zas *et al.*, 2003). Del mismo modo, las cerdas con valores bajos de HL generan menor cantidad de lechones producidos por

año y una mayor cantidad de DNP (Engblom *et al.*, 2007). Por este motivo, es aconsejable que las tasas y causas de descarte de las cerdas con menos de 3 partos sean analizadas de manera diferenciada, con el objetivo de instaurar medidas de manejo que permitan disminuir el riesgo de descarte prematuro (D'Allaire *et al.*, 1987; Deen, 2003a).

Para mejorar la longevidad dentro del plantel, antes de decidir el descarte de hembras jóvenes debería realizarse un examen clínico individual, considerando: la historia clínico-reproductiva, los costos de reposición y preparación y las pérdidas potenciales de las camadas no producidas. Estas últimas deben calcularse sobre la base de los objetivos planteados en cada establecimiento. Por ejemplo, si se establece como objetivo que cada reproductora produzca, al menos, seis camadas y se descarta una hembra lue-

Tabla 2. Categorías de días no productivos (DNP)

Categorías	Períodos
DNP de las nulíparas	-Primer servicio/preñez -Primer servicios/descarte
DNP relacionados al servicio	-Destete/primer servicio fecundante
DNP asociados a fallas reproductivas <sup>1</sup>	-DNP causados por retorno al celo, aborto, control de preñez negativo y hembra vacía al parto
DNP relacionados con el descarte <sup>1</sup>	-Último evento productivo y/o decisión de descarte hasta la carga de la cerda a frigorífico

<sup>1</sup>Se aplica tanto a hembras nulíparas como pluríparas.



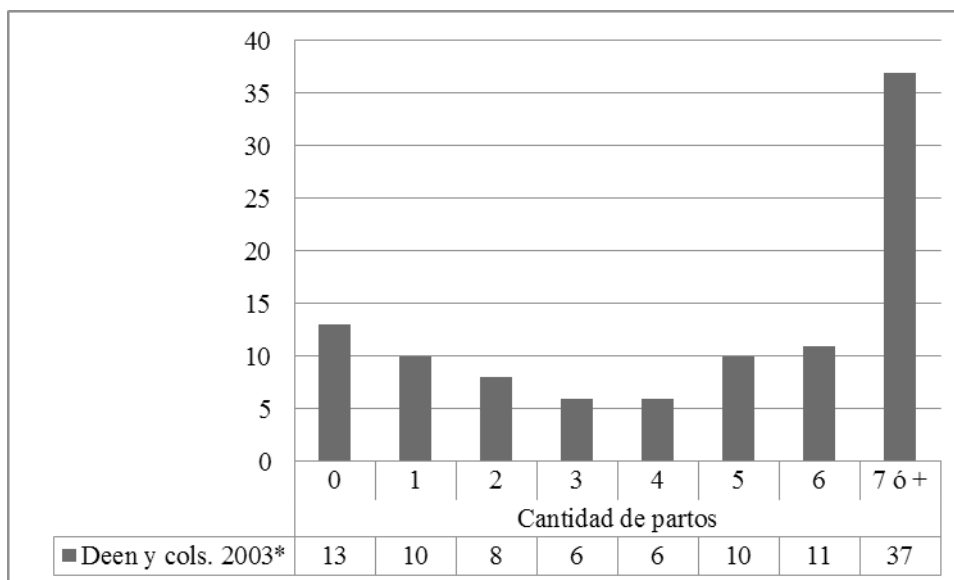


Figura 2. Distribución de partos al descarte (valores expresados en porcentaje).  
\*Adaptado de Deen 2003a.

go de su segundo parto, dentro de los costos de ese descarte deberían contemplarse los ingresos que no se perciben de esas cuatro camadas potenciales no producidas (Deen, 2003b).

#### IV. Inspección del aparato genital en planta de faena

En la cerda, el abordaje por vía rectal de los órganos reproductivos es dificultoso, por lo que la inspección clínica particular del aparato genital (AG) se limita a la exploración de los genitales externos. Esta situación hace que sea difícil, por un lado, tomar una decisión de descarte objetiva y, por el otro, en el caso de los DR, conocer los factores que desencadenaron la falla reproductiva (Almond et al., 2007; Safranski & Cox, 2007; Straw & Meuten, 1992).

En este sentido, la inspección del AG en planta de faena brinda información complementaria para mejorar el criterio de descarte, debido a que podemos evaluar la decisión de descarte basados en la presencia o ausencia de lesiones. Si hay lesiones, debemos relacionarlas con la historia clínica y los registros para determinar si las mismas explican el descarte. Por el contrario, si las cerdas de DR no presentan lesiones podremos realizar un análisis retrospectivo para determinar si dicho descarte estuvo asociado a otros factores como ser: problemas de manejo o gestión, nutrición o ambiente, entre otros (Almond et al., 2007; D'Allaire et al., 1992; Heinonen et al., 1998; Knauer et al., 2007).

En numerosos estudios realizados a partir de muestras obtenidas en planta de faena se describe que entre el 15 y el 49% de las hembras descartadas

presentan alguna alteración del AG. Las lesiones halladas varían de un estudio a otro, destacándose la presencia de ovarios inactivos (8-25%), quistes ováricos (6-20%) y alteraciones uterinas (1-22%) (Heinonen et al., 1998; Karvelienė & Riškevičienė, 2009; Knauer et al., 2007; Rodríguez et al., 2008; Tummaruk et al., 2009). A continuación se hace una breve revisión de cada una.

#### Ovarios inactivos

Los ovarios inactivos son aquellos que presentan estructuras foliculares de un diámetro menor a 4 o 5 mm, con ausencia de cuerpos lúteos y *albicans* (Almond et al., 2007; Knauer et al., 2007; Rodríguez et al., 2008). La inactividad ovárica está relacionada, en muchos casos, con una nutrición deficiente de la cerda nulípara previa a la pubertad o de la cerda primípara y plurípara durante la lactancia (Knauer et al., 2007; Koketsu et al., 1997a; Vargas et al., 2009; Zak et al., 1998).

La evaluación de la actividad ovárica permite estimar los descartes por falta de celo. Cuando la misma está asociada con ovarios inactivos debe remitirse a la granja y evaluar los posibles factores asociados (principalmente ambiente y nutrición). Por otro lado, pueden existir hembras descartadas por falta de celo y que presenten los ovarios activos; esto se relacionaría con fallas en la estimulación y/o detección de celo (Barrales et al., 2014).

#### Quistes ováricos

Los quistes ováricos (QOV) son aquellos que se forman por una falla en la ovulación o en la luteólisis

(Cianciolo & Mohr, 2007). El tamaño y la cantidad de quistes presentes en cada ovario son variables, pudiendo ser grandes o pequeños, múltiples o simples y uni o bilaterales. En estudios realizados mediante ultrasonografía de tipo B (USG-B), la prevalencia de QOV varió entre el 2% y el 30% en el animal vivo (Cianciolo & Mohr, 2007), mientras que en estudios realizados en planta de faena fue de 7% a 13% (Barrales *et al.*, 2014; D'Allaire *et al.*, 2006; Engblom *et al.*, 2008; Heinonen *et al.*, 1998; Knauer *et al.*, 2007; Rodríguez *et al.*, 2008; Tummaruk *et al.*, 2009).

Se considera QOV a toda aquella estructura que supere el diámetro normal de un folículo o un cuerpo lúteo. El diámetro a partir del cual se considera a una estructura quística es muy variable según los diferentes autores (Tabla 3).

El efecto de los QOV sobre la fisiología reproductiva es diferente según el tipo de quiste presente. En general, los quistes simples y de gran tamaño sufren grados variables de luteinización y secretan  $P_4$ , pudiendo producir una inhibición del eje hipotálamo-hipófisis-gónada que se expresa en falta de celo o anestro patológico. Por el contrario, los quistes múltiples y de tamaño pequeño son secretores de estradiol ( $E_2$ ), por lo que podrían producir retorno de celo a intervalo irregular o ninfomanía (Almond *et al.*, 2006, 2007).

En el estudio realizado por Vargas *et al.* (2009) se observó que cerdas nulíparas con QOV presentaron 7,6 veces más probabilidades de repetir celo en su primer servicio. Estos resultados son similares a los presentados por Dobler Castagna *et al.* (2004) para cerdas primíparas y pluríparas, quienes reportan que el 50% de las cerdas con QOV presentó algún tipo de falla reproductiva.

Los QOV son fáciles de identificar mediante USG-B. En las imágenes ecográficas, dentro de los diagnósticos diferenciales se deben incluir: la preñez temprana, la ovulación retardada, los quistes paraováricos y los cuerpos hemorrágicos (Dobler Castagna *et al.*, 2004). Entre el 60% y el 75% de los quistes son observables mediante USG-B durante 15 días desde el momento de su formación. Es así que el seguimiento de la dinámica de los QOV es una rutina útil para la

aplicación de tratamientos hormonales o para decidir el descarte en caso de que el quiste persista (Dobler Castagna *et al.*, 2004; Cianciolo & Mohr, 2007).

De todos modos, debe considerarse que un quiste ovárico simple raramente afecta la fertilidad o el ciclo estral. Algunos autores afirman que las cerdas deben presentar, al menos, entre 5 y 10 quistes luteinizados de gran tamaño (50 mm de diámetro) para que se produzca el anestro. Para determinar si un QOV está afectando el desempeño reproductivo de una cerda es necesario relacionar varios factores, como por ejemplo, la signología clínica, los registros reproductivos, la cantidad y tamaño de los QOV y de las estructuras normales presentes en el ovario y las concentraciones séricas de hormonas sexuales (Ebbert *et al.*, 1993; Cianciolo & Mohr, 2007; Martinat-Botté *et al.*, 1998; Waberski *et al.*, 1999).

### Endometritis

Los procesos inflamatorios del útero se clasifican según la capa de la pared uterina que se encuentre afectada. El endometrio es el afectado con más frecuencia y su inflamación se define como endometritis (Cianciolo, 2007). El diagnóstico de esta afección se basa en la evaluación clínica, el estudio anatomopatológico y la evaluación mediante USG-B. El principal signo clínico asociado a esta afección suele ser la descarga vulvar purulenta.

En la inspección en planta de faena, en los casos de endometritis clínica, se observa el endometrio de color rojo oscuro con marcado edema y congestión y, en la mayoría de los casos, una colecta purulenta (Almond *et al.*, 2007; Tummaruk *et al.*, 2009). Es importante destacar que el aspecto macroscópico del endometrio varía según el predominio de las hormonas sexuales ( $P_4$  y  $E_2$ ); por esta razón se hace necesario relacionar la etapa del ciclo estral con los hallazgos, para evitar confundir procesos fisiológicos con inflamatorios (Almond *et al.*, 2007; Karvelienė & Riškevičienė, 2009; Tummaruk *et al.*, 2009). Las colectas en la luz uterina varían en cantidad y tipo, pudiendo hallarse desde pequeños flóculos de pus hasta colectas purulentas de gran volumen (Almond *et al.*, 2007). Los microorganismos aislados con mayor frecuencia son *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Actinomyces pyogenes*, *Enterococcus* spp. y *Pasteurella multocida*. Cabe destacar que, en muchas ocasiones, pueden observarse colectas purulentas en la luz uterina sin lesiones endometriales (de Winter *et al.*, 1995). La mayor parte de las endometritis suelen ser causadas por infecciones ascendentes de origen ambiental. Es por esto que, si se detecta un aumento en la ocurrencia en planta de faena, está indicado evaluar las condiciones de higiene, tal como se mencionó para

Tabla 3. Diámetro a partir del cual se considera quiste a una estructura ovárica según diferentes autores.

Autor	Diámetro (mm)
Martinat-Botté <i>et al.</i> 1998	10
Waberski <i>et al.</i> 1999	11
Vargas <i>et al.</i> 2009	12
Heinonen <i>et al.</i> 1998	15
Dobler Castagna <i>et al.</i> 2004	20

el descarte por DV (Almond et al., 2006; de Winter et al., 1995; Rodríguez et al., 2008).

La observación de las endometritis suele ser difícil mediante USG-B, debido a que la ecogenicidad de la pared varía a lo largo del ciclo. En los casos de endometritis detectables mediante USG-B, se observa la luz del útero anecoica y, en su interior, algunos puntos hiperecóticos que aparecen y desaparecen. Estas últimas imágenes son compatibles con la presencia de coagula purulentos en la luz del útero. Sin embargo, en la práctica, estas imágenes no siempre se interpretan de manera correcta, dado que se necesita entrenamiento y experiencia por parte del operador (Almond et al., 2006; Kauffold et al., 2004, 2010).

## Discusión y conclusiones

El aumento de los costos de producción en los últimos años, en especial los relacionados a la alimentación y los recursos humanos, hizo necesario implementar medidas con el objetivo de aumentar la eficiencia económica y productiva. En este sentido, incrementar la longevidad de las reproductoras es una de las más importantes ya que se amortizan los costos de compra y/o preparación de una cerda y se incrementa la cantidad de lechones destetados por madre por año, aumentando la rentabilidad global de la explotación.

Los descartes reproductivos y por problemas locomotores son la principal causa de descarte prematuro y no programado en cerdas, hecho que se mantiene constante en los trabajos publicados. Por este motivo, la estrategia dentro de la granja debería estar dirigida a disminuir la cantidad y el impacto de los mismos.

Un exhaustivo análisis de registros es el primer paso para mejorar la tasa de retención de hembras en la granja. La amplia difusión, en los últimos años, de programas informáticos de gestión permitió obtener mayor cantidad y calidad de información para conocer cuáles son los factores que influyen sobre la longevidad de las cerdas. De todos modos, las limitaciones que presenta el examen clínico reproductivo en la hembra porcina hace necesaria la aplicación de herramientas que permitan dar un enfoque más objetivo a las políticas y decisiones de descarte reproductivo. Este hecho tiene particular importancia para las cerdas de menos de tres partos, por el impacto económico que significa el descarte prematuro de hembras, si se tiene en cuenta que no se logra un flujo positivo de ingresos para la granja si no alcanzan su cuarto parto. El análisis de registros reproductivos individuales y poblacionales, sumado a un examen ecográfico reproductivo y/o a la inspección del aparato genital en planta de faena aportaría objetividad a estas decisiones.

## Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, relaciones financieras, personales o de otro tipo con personas u organizaciones que pudieran afectar al presente trabajo.

## Bibliografía

Almond GW, Flores W, Batista L, D'Allaire S. Diseases of the reproductive system. En: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire, Taylor DJ, editores. 2006. Diseases of swine. 9th ed. Ames, Blackwell Publishing, pp. 113-47.

Almond GW. Clinical examination of female reproductive organs. En: Youngquist RS, Threlfall WR, editores. 2007. Current therapy in large animal theriogenology. 2nd ed. St. Louis, Saunders Elsevier Inc, pp. 749-56.

Anil S, Anil L, Deen J. 2005. Evaluation of patterns of removal and associations among culling because of lameness and sow productivity traits in swine breeding herds. Journal of American Veterinary Medical Association. 226(6):956-61.

Barrales H, Zignago F, Cappuccio J, Machuca M, Pérez E, Lozada I, Perfumo C, Williams S. 2014. Estudio descriptivo de las lesiones presentes en el aparato genital de reproductoras porcinas enviadas a descarte. Memorias del XII Congreso Nacional de Producción Porcina. Mar del Plata, Argentina. S32, p. 198.

Calderón Díaz JA, Fahey AG, Boyle LA. 2014. Effects of gestation housing system and floor type during lactation on locomotory ability; body, limb, and claw lesions; and lying-down behavior of lactating sows. Journal of Animal Science. 92:1673-83.

Carabin H, Desnoyers M, Vaillancourt D, Martineau G. 1995. Influence of vulvar hygiene on cytology of vaginal smears after sham artificial insemination in sows. Canadian Journal of Veterinary Research. 59:193-6.

Carabin H, Martineau G, Vaillancourt D, Higgins R, Bigras-Poulin M. 1996. Detection of cervical bacterial contamination in swine by two methods of swabbing in relation to artificial insemination. Canadian Journal of Veterinary Research. 60:40-4.

Cianciolo RE, Mohr FC. Urinary system. En: Grant Maxie M (Ed). 2007. Jubb, Kennedy and Palmers's pathology of domestic animals. 5th ed. Saunders Elsevier St. Louis. Vol II, pp. 376-463.

D'Allaire S, Drolet R. Longevity in breeding animals. En: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire, Taylor DJ, editores. 2006. Diseases of swine. 9th ed. Iowa, Blackwell Publishing, pp. 1011-25.

D'Allaire S, Stein TE, Leman AD. 1987. Culling patterns in selected Minnesota swine breeding herds. Canadian Journal of Veterinary Research. 51:506-12.

D'Allaire S, Drolet R. Culling and mortality in breeding animals. En: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editores. 1992. Diseases of swine. 7th ed. Iowa State of University Press, Ames, pp. 861-71.

D'Allaire S, Drolet R. Culling and mortality in breeding animals. En: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editores. 1999. Diseases of swine. 8th ed. Iowa State of University Press, Ames, pp. 1003-16.

- Dalin AM, Kaeoket K, Persson E. 2004. Immune cell infiltration of normal and impaired sow endometrium. *Animal Reproduction Science*. 82-83:401-13.
- de Winter PJJ, Verdoncka M, de Kruijff A, Devriese LA, Haesebrouck F. 1995. Bacterial endometritis and vaginal discharge in the sow: prevalence of different bacterial species and experimental reproduction of the syndrome. *Animal Reproduction Science*. 37:325-35.
- Deen J. 2003a. Sow longevity measurement. Allen D. Leman Swine Conference. Minnesota, USA. pp. 192-3.
- Deen J. 2003b. Control points in sow longevity. Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians, Orlando, EE.UU. pp. 147-8.
- Dewey C, Friendship R, Wilson M. 1993. Clinical and post-mortem examination of sows culled for lameness. *Canadian Veterinary Journal*. 34:555-6.
- Dhuyvetter K. 2000. Optimal parity distribution – when is the best time to cull sows? Proceedings of Swine Day Conference, Manhattan, EE.UU. pp. 5-11.
- Dial GD, Marsh WE, Polson DD, Vaillancourt JP. Reproductive failure: differential diagnosis. En: Leman AD, Straw BE, Mengeling WL, D’Allaire S, Taylor DJ, editores. 1992. *Diseases of swine*. 7th ed. Iowa State University Press, Ames, EE.UU. pp. 88-137.
- Dobler Castagna C, Peixoto CH, Bortolozzo FP, Wentz I, Borchardt Neto G, Ruschel F. 2004. Ovarian cysts and their consequences on the reproductive performance of swine herds. *Animal Reproduction Science*. 81:115-23.
- Ebbert W, Elsaesser F, Bostedt H. 1993. Cystic degeneration in porcine ovaries - Second communication: concentrations of progesterone, estradiol-17P, and testosterone in cystic fluid and plasma; interpretation of the results. *Reproduction in Domestic Animals*. 28:451-63.
- Engblom L, Lundeheim N, Dalin A, Andersson K. 2007. Sow removal in Swedish commercial herds. *Livestock Science*. 106:76-86.
- Engblom L, Selling LE, Lundeheim N, Belák K, Andersson K, Dalin A. 2008. Post mortem findings in sows and gilts euthanised or found dead in a large Swedish herd. *Acta Veterinaria Scandinavica*. 50:25.
- Fangman T, Carlson Shannon M. Diseases of the puerperal period. En: Youngquist RS, Threlfall WR, editores. 2007. *Current therapy in large animal theriogenology*. 2nd ed. St. Louis, Saunders Elsevier Inc., pp. 789-94.
- First N, Staigmiller R. 1973. Effects of ovariectomy, dexamethasone and progesterone on the maintenance of pregnancy in swine. *Journal of Animal Science*. 37:1191-4.
- Heinonen M, Leppävuori A, Pyörälä S. 1998. Evaluation of reproductive failure of female pigs based on slaughterhouse material and herd record survey. *Animal Reproduction Science*. 52:235-44.
- Hoving LL, Soede NM, Graat EAM, Feitsma H, Kemp B. 2010. Effect of live weight development and reproduction in first parity on reproductive performance of second parity sows. *Animal Reproduction Science*. 122:82-9.
- Karvelienė B, Riškevičienė V. 2009. Post-mortem evaluation of genital organs from sows with reproductive disturbances. *Veterinarski Archiv*. 79(3):269-79.
- Kauffold J, Bussche B, Failing K, Wehrend A, Wendt M. 2010. Use of B-mode ultrasound and grey-scale analysis to study uterine echogenicity in the pig. *Journal of Reproductive Development*. 56(4):444-8.
- Kauffold J, Rautenberg T, Gutjahr S, Richter A, Sobiraj A. 2004. Ultrasonographic characterization of the ovaries in non-pregnant first served sows and gilts. *Theriogenology*. 61:1407-17.
- Kirkwood RN, Althouse GC, Yaeger MJ, Carr J, Almond GW. Diseases of the reproductive system. En: Zimmerman JJ, Karriker LA, Ramírez A, Schwartz KJ, Stevenson GW, editores. 2012. *Diseases of swine*. 10th ed. Chichester, John Wiley & Sons Ltd, pp. 329-47.
- Klopfenstein C, Farmer C, Martineau G. Diseases of the mammary glands. En: Straw BE, Zimmerman JJ, D’Allaire, Taylor DJ, editores. 2006. *Diseases of swine*. 9th ed. Ames, Blackwell Publishing. pp. 57-86.
- Knauer M, Stalder KJ, Karriker L, Baas TJ, Johnson C, Serenius T, Layman L, McKean JD. 2007. A descriptive survey of lesions from cull sows harvested at two Midwestern U.S. facilities. *Preventive Veterinary Medicine*. 82:198-212.
- Knox R, Miller G, Willenburg K, Rodríguez-Zas S. 2002. Effect of frequency of boar exposure and adjusted mating times on measures of reproductive performance in weaned sows. *Journal of Animal Science*. 80:892-9.
- Koketsu Y, Dial GD, King VL. 1997a. Returns to service after mating and removal of sows for reproductive reasons from commercial swine farms. *Theriogenology*. 47:1347-63.
- Koketsu Y, Dial G. 1997b. Factors influencing the post-weaning reproductive performance of sows on commercial farms. *Theriogenology*. 47:1445-61.
- Koketsu Y. 2005. Six component intervals of nonproductive days by breeding-female pigs on commercial farms. *Journal of Animal Science*. 83:1406-12.
- Martinat-Botté F, Renaud G, Terqui M, Madec F, Costiou P. 1998. *Echographie et reproduction chez la truie*. Paris, INRA editions.
- Morrison B, Larriestra A, Yan J, Deen J. 2002. Determining optimal parity distribution with a push model of gilt supply. En: Allen D. Leman swine conference. Minnesota, USA. pp. 173-7.
- Muirhead MR. 1976. Veterinary problems of intensive pig husbandry. *Veterinary Record*. 99:288-92.
- Muirhead MR, Alexander T. 2001. Manejo sanitario y tratamiento de las enfermedades del cerdo. Buenos Aires, Editorial InterMédica. pp. 158-88.
- Oliviero C, Heinonen M, Valros A, Peltoniemi O. 2010. Environmental and sow-related factors affecting the duration of farrowing. *Animal Reproduction Science*. 119:85-91.
- PIC Latinoamerica. 2015. Análisis de la industria porcina en Latinoamérica: editor PIC Latinoamérica. Disponible en: [http://www.fcv.unlp.edu.ar/images/stories/analecta/Información\\_para\\_autores\\_2014.pdf](http://www.fcv.unlp.edu.ar/images/stories/analecta/Información_para_autores_2014.pdf) [Consultado 21/11/2016].
- Rodríguez M, Puche S, Vale O, Camacho JE. 2008. Hallazgos patológicos del tracto reproductivo en cerdas de descarte en Venezuela. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias UCV*. 49(1):9-15.
- Rodríguez-Zas SL, Southey BR, Knox RV, Connor JF, Lowe JF, Roskamp BJ. 2003. Bioeconomic evaluation of sow longevity and profitability. *Journal of Animal Science*. 81:2915-22.

- Rutter B, Russo AF. 2002. Fundamentos de la fisiología de la gestación y el parto de los animales domésticos. Buenos Aires, Editorial Universitaria de Buenos Aires.
- Safranski T, Cox N. Clinical reproductive physiology and endocrinology of sows: mating management. En: Youngquist RS, Threlfall WR, editores. 2007. Current therapy in large animal theriogenology. 2nd ed. St. Louis. Saunders Elsevier Inc. pp. 738-49.
- Sasaki Y, Koketsu Y. 2010. Culling intervals and culling risks in four stages of the reproductive life of first service and re-serviced female pigs in commercial herds. *Theriogenology*. 73:587-94.
- Schenck E, McMunn K, Rosenstein D, Stroshine RL, Nielsen BD, Richert BT, Marchant-Forde JN, Lay DC Jr. 2008. Exercising stall-housed gestating gilts: effects on lameness, the musculo-skeletal system, production, and behavior. *Journal of Animal Science*. 86:3166-80.
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA). 2013. Muestreo del Senasa ratificó la ausencia de peste porcina clásica y síndrome respiratorio reproductivo porcino en la Argentina. Argentina: SENASA. Disponible en: [www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar) [Consultado 21/11/16]
- Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria (SENASA), 2016. Peste porcina clásica (PPC). Argentina: SENASA. Disponible en: [www.senasa.gov.ar](http://www.senasa.gov.ar) [Consultado 21/11/16]
- Serenius T, Stalder K. 2006. Selection for sow longevity. *Journal of Animal Science*. 84:166-71.
- Soede N, Langendijk P, Kemp B. 2011. Reproductive cycles in pigs. *Animal Reproduction Science*. 124:251-8.
- Soede N, Wetzels C, Zondag W, de Koning M, Kemp B. 1995. Effects of time of insemination relative to ovulation, as determined by ultrasonography, on fertilization rate and accessory sperm count in sows. *Journal of Reproduction and Fertility*. 104:99-106.
- Spörke J. 2009. Improving longevity for a high producing sow. *Proceedings of the American Association of Swine Veterinarians*. Dallas, EEUU. 517-20.
- Straw B, Dewey C, Wilson M. Differential diagnosis of diseases. En: Straw BE, Zimmerman JJ, D'Allaire, Taylor DJ, editores. 2006. Diseases of swine. 9th ed. Iowa, Blackwell Publishing, pp. 241-83.
- Straw BE, Meuten DJ. Physical examination. En: Straw BE, D'Allaire S, Mengeling WL, Taylor DJ, editores. 1992. Diseases of swine. 7th ed. Iowa State University Press, Ames, pp. 793-807.
- Torremorrell M. Viral Causes of Infertility and Abortion in Swine. En: Youngquist RS, Threlfall WR, editores. 2007. Current therapy in large animal theriogenology. 2nd ed. St. Louis, Saunders Elsevier Inc, pp. 801-7.
- Tsakmakidis I, Lymberopoulos A, Khalifa T. 2010. Relationship between sperm quality traits and field-fertility of porcine semen. *Journal of Veterinary Science*. 11(2):151-4.
- Tubbs R. Noninfectious causes of infertility and abortion. En: Youngquist RS, Threlfall WR, editores. 2007. Current therapy in large animal theriogenology. 2nd ed. St. Louis, Saunders Elsevier Inc, pp. 808-11.
- Tummaruk P, Kedsangsakonwut S, Kunavongkrit A. 2009. Relationships among specific reasons for culling, reproductive data, and gross morphology of the genital tracts in gilts culled due to reproductive failure in Thailand. *Theriogenology*. 71:369-75.
- Tummaruk P, Sukamphaichit N, Kitiarpornchai W, Musikjearanan S, Tantasuparuk W. 2006. Seasonal influence on causes of culling in gilts. *Proceedings of the 19th IPVS Congress*. Copenhagen, Denmark. Vol. 2. p. 498.
- Vargas AJ, Bernardi ML, Bortolozzo FP, Mellagi APG, Wentz I. 2009. Factors associated with return to estrus in first service swine females. *Preventive Veterinary Medicine*. 89:75-80.
- Vestergaard K, Bækbo P, Svensmark B. 2006. Sow mortality and causes for culling of sows in Danish pig herds. *Proceedings of the 19th IPVS Congress*. Copenhagen, Denmark. Vol. 1. p. 255.
- Waberski D, Kunz-Schmidt A, Borchardt Neto G, Richter L, Weitze K. 1999. Real-time ultrasound diagnosis of ovulation and ovarian cysts in sows and its impact on artificial insemination efficiency. *Proceedings of the American Society of Animal Science*. Indianapolis, EE.UU. pp. 1-8.
- Zak LJ, Williams IH, Foxcroft GR, Pluske JR, Cegielski AC, Clowes EJ, Aherne FX. 1998. Feeding lactating primiparous sows to establish three divergent metabolic states: I. Associated endocrine changes and postweaning reproductive performance. *Journal of Animal Science*. 76:1145-53.

# Histoplasmosis en caninos y felinos: signos clínicos, métodos de diagnóstico y tratamiento

## Canine and feline histoplasmosis: clinical signs, diagnostic methods and treatment

Martínez Cepeda GE<sup>1\*</sup>, Revelo Ruales AP<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Patología, Carrera de Ingeniería Agropecuaria, Extensión Chone, Universidad Laica "Eloy Alfaro" de Manabí; Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro.

<sup>2</sup>Agencia Ecuatoriana de Aseguramiento de la Calidad del Agro, Ecuador.

\*Correo electrónico del autor: [galomartinez88@gmail.com](mailto:galomartinez88@gmail.com)

**Resumen:** La histoplasmosis es una enfermedad zoonótica, causada por el hongo dimórfico *Histoplasma capsulatum*, endémica en zonas tropicales, subtropicales y templadas de América y África. Suelos con abundante materia orgánica, excremento de aves y guano de murciélagos constituyen el nicho ecológico de este microorganismo. Esta micosis puede afectar a gran variedad de mamíferos. En esta revisión bibliográfica se aborda el tema de la histoplasmosis canina y felina, haciendo referencia, principalmente, a los métodos diagnósticos directos e indirectos empleados para su identificación. Además, se describen las manifestaciones clínicas características de cada fase de la enfermedad y su tratamiento y se presenta un algoritmo de diagnóstico.

**Palabras clave:** *Histoplasma* spp.; zoonosis; signología; diagnóstico; tratamiento

**Abstract:** Histoplasmosis is a zoonotic disease affecting a wide variety of animals caused by *Histoplasma capsulatum*, a dimorphic fungus endemic in tropical, subtropical and temperate regions of America and Africa. Soil with abundant organic material, bird droppings and bat guano, constitutes the ecological niche of this microorganism. In this literature review the issue of canine and feline histoplasmosis is addressed, referring mainly to direct and indirect diagnostic methods employed for identification. Clinical manifestations characteristic of each stage of the disease and their treatments are described; also, a diagnostic algorithm is presented.

**Keywords:** *Histoplasma* spp.; zoonosis; signology; diagnosis; treatment

## Introducción

### Historia de la enfermedad

La histoplasmosis o enfermedad de Darling fue descrita en 1905 por el médico patólogo estadounidense Samuel Taylor Darling (1872-1925), cuando trabajaba en el Hospital Ancón del canal de Panamá, al realizar una autopsia de un paciente de la isla Martinica que había fallecido por una enfermedad parecida a la tuberculosis. En los cortes histológicos encontró corpúsculos intracelulares en los histiocitos. En una primera instancia pensó que había descubierto un nuevo protozoo y lo llamó *Histoplasma capsulatum* porque aparentaba tener cápsula. En Brasil, en 1912, se determinó que el agente no tiene cápsula ni es protozoo, aunque se mantuvo el nombre (Kauffman, 2007; Sánchez-Alemán, 2009).

### Agente etiológico

*Histoplasma capsulatum*, un hongo dimórfico, es el agente etiológico de la histoplasmosis. La micosis sistémica es endémica en zonas tropicales, subtropicales y templadas de América y África. Actualmente, la micosis es considerada cosmopolita. El hongo crece en suelos con abundante materia orgánica, excremento de aves (pollos, gansos, pavos y algunas aves migratorias, entre otras) y guano de murciélagos en ambientes cerrados, tales como minas, cuevas, cavernas, túneles, criptas de iglesias y casas abandonadas, o en espacios abiertos, entre ellos parques y paseos públicos. La materia orgánica en descomposición, en condiciones de humedad y temperatura adecuadas, constituye el nicho ecológico para que desarrolle la fase micelial del hongo y se formen los microconidios que constituyen la principal forma infectante de *Histoplasma* (Castañón-Olivares, 2014; López, 2006).

Existen tres variedades taxonómicas de *H. capsulatum*: *Hc* var. *capsulatum*, var. *duboisii* y var. *farciminosum*. La primera variedad es endémica de

América y algunas zonas de África, Asia y Europa. La segunda únicamente se aisló en África y la tercera se identificó en Europa, África y Asia y es patógena para caballos y mulas. Las variedades *capsulatum* y *duboisii* se diferencian en su fase levaduriforme en tejidos animales. *Hc* var. *duboisii* es ovoide, más grande y de paredes más gruesas que la variedad *capsulatum*, aunque en su fase micelial las dos variedades no muestran diferencias marcadas (Kwon-Chung & Bennett, 1992; Rippon, 1988).

En estudios filogenéticos realizados en 137 aislamientos de *H. capsulatum* pertenecientes a las tres variedades descritas, aislados de pacientes humanos provenientes de 25 países, se utilizaron las secuencias de ADN correspondientes a cuatro genes independientes que codifican a proteínas: *arf* (factor de ribosilación de ADP), *anti-H* (precursor del antígeno H), *ole* (ácido graso desaturasa delta-9) y *tub1* ( $\alpha$ -tubulina) (Kasuga et al., 1999). Como resultado se encontraron ocho clados notoriamente separados e identificados: clado I de América del Norte (*Hc* var. *capsulatum*), clado II de América del Norte (*Hc* var. *capsulatum*), clado III de Sudamérica (*Hc* var. *capsulatum* Grupo A), clado IV de Sudamérica (*Hc* var. *capsulatum* Grupo B), clado V de Australia, clado VI de Holanda (origen indonésico), clado VII euroasiático y clado VIII de África. De los ocho clados descritos, siete representan especies filogenéticas, con excepción del clado euroasiático (Kasuga et al., 2003).

En esta clasificación *Hc* var. *capsulatum* fue encontrado en los ocho clados. El clado africano incluyó a todos los aislamientos de *Hc* var. *duboisii*, así como a miembros de las otras dos variedades, mientras que todos los miembros de la var. *farciminosum* quedaron distribuidos en tres especies filogenéticas, las que al momento de cultivar su forma saprófita forman dos tipos de colonias: el tipo A (albino o blanco) y el tipo B (marrón o pardo) (Kasuga et al., 1999, 2003).

#### Clasificación taxonómica

❖ **División:** Ascomycota

➤ **Clase:** Euascomycetes

▪ **Orden:** Onygenales

• **Familia:** Onygenaceae y/o Ajellomycetaceae

◆ **Género:** *Emmonsia* (*Ajellomyces*) – estado teleomorfo

*Histoplasma* – estado anamorfo

➤ **Especie:** *capsulata* (estado teleomorfo), *capsulatum*, (estado anamorfo) (Peterson et al., 1998; Vite-Garín et al., 2014)

*Hc* var. *capsulatum* es un hongo termodimórfico que a temperaturas inferiores a 35° C crece como un hongo micelial entre los 10 y 14 días. Macroscópicamente, en la fase micelial presenta un micelio blanco y algodonoso. Microscópicamente, los microconidios se presentan sésiles (o en hifas cortas no diferenciadas), lisos, esféricos, piriformes o en forma de clava, sin septos, de pared fina. Pueden medir 1-4 x 2-6 µm. Los macroconidios se observan en conidióforos cortos, son en general esféricos (8-14 µm de diámetro), de paredes gruesas, sin septos, de aspecto tuberculado, bien apreciables al microscopio óptico (Fernández-Andreu *et al.*, 2011).

Las levaduras del hongo se desarrollan a 37 °C; para evidenciarlas se las debe sembrar en medios de cultivo enriquecidos o realizar infecciones experimentales en animales de laboratorio para luego observarlas en los tejidos del animal con alguna técnica histológica. Las levaduras observadas en los cortes histológicos son de forma esférica u ovalada, de 2-3 x 3-4 µm, poseen paredes finas y pueden o no presentar gemación. El hongo puede presentar color grisáceo o castaño claro cuando se lo siembra en medios enriquecidos (Fernández-Andreu *et al.*, 2011).

Los componentes principales de la pared del hongo son: α-1,3 glucano, β-1,3 glucano y quitina. Una de las características destacables de *H. capsulatum* es la cantidad de quitina, que es superior a la encontrada en otros hongos dimórficos (Hearn *et al.*, 1997).

Los factores de virulencia más destacables son los altos niveles de α-1,3 glucano en la fase levaduriforme y de galactomanano, el cual es considerado el más importante polisacárido antigénico (Hearn *et al.*, 1997).

Woods *et al.* (2003) clasificaron los determinantes de patogenicidad y sus causas potenciales como se describen a continuación:

- la formación de numerosos microconidios en su fase micelial asegura una adecuada forma de diseminación y contagio para el animal susceptible
- el dimorfismo térmico y la resistencia frente al fagolisosoma de los macrófagos ayuda a la diseminación y enfermedad pulmonar
- la habilidad de causar infección persistente, debido a su capacidad de modulación del pH que permite proteger al hongo frente a enzimas degradativas lisosomales (hidrolasas ácidas)
- la producción de catalasas y oxidasas le permite defenderse frente al O<sub>2</sub> reactivo del hospedero
- la producción de sideróforos, proteínas fijadoras de calcio y capacidad de reducir los iones férricos

(Fe<sup>3+</sup>) le permite la supervivencia en un ambiente pobre de nutrientes

- el gen *ura5* que otorga al hongo la capacidad de biosintetizar pirimidina y ácidos nucleicos en un microambiente con limitación de nutrientes

## Signos clínicos en caninos y felinos

La histoplasmosis es una infección sistémica que suele iniciarse en los pulmones o en el tracto gastrointestinal, diseminándose posteriormente a linfonódulos, hígado, bazo, médula ósea, ojos y demás órganos (Morgan *et al.*, 2004).

*Histoplasma* spp. es un patógeno intracelular que se ubica en vesículas fagocíticas en el citoplasma de los macrófagos del hospedero. Se mencionan cinco formas clínicas: asintomática, pulmonar aguda benigna, pulmonar crónica, diseminada aguda y diseminada crónica (Kauffman 2007; Wheat 2006).

La enfermedad se desarrolla en una gran variedad de mamíferos. Los gatos son más susceptibles que los perros. Los perros menores de cuatro años son los más vulnerables a la enfermedad. Los perros de las razas pointer, Brittany spaniel y weimaraner se infectan más comúnmente. No existe predilección por sexo, tanto en perros como en gatos (Morgan *et al.*, 2004).

La principal vía de infección suele ser la inhalación de conidios infectivos procedentes del ambiente, tanto en gatos como en perros y seres humanos. Tras la inhalación, los conidios pasan de la fase micelial a la fase de levadura y éstas son fagocitadas por células del sistema mononuclear fagocitario, donde se multiplican como levaduras intracelulares. La diseminación hematológica y linfática dan lugar a la enfermedad multisistémica (Ettinger & Feldman 2004; Morgan *et al.*, 2004).

Aunque la diseminación del agente puede afectar a cualquier sistema, los órganos más afectados en perros son: pulmones, tracto gastrointestinal, linfonódulos, hígado, bazo, médula ósea, ojos y glándulas adrenales. En los gatos los órganos más afectados son: pulmones, hígado, linfonódulos, ojos y médula ósea (Morgan *et al.*, 2004).

El tipo de enfermedad desarrollada, tanto en perros como en gatos, va a depender de la respuesta inmunitaria del hospedero. En los perros, el periodo de incubación es de 16 días, aproximadamente. Cuando el sistema inmunitario es competente las infecciones son subclínicas, mientras que la falta de respuesta conduce a la enfermedad diseminada. Los brotes comúnmente suelen asociarse con exposiciones en zonas muy contaminadas por la fase micelial, como gallineros, cavernas con poblaciones de murciélagos y sitios de nidación de estorninos (Ettinger & Feldman, 2004).



## Fases de la enfermedad

La histoplasmosis se desarrolla en dos fases; la fase primaria, caracterizada por causar una reacción pulmonar o cutánea, y la fase progresiva, que es la diseminación del agente causal en todo el organismo.

## Manifestaciones clínicas en caninos

La infección se produce por la inhalación de conidios o filamentos, desencadenando cualquiera de los tipos de presentación de la enfermedad. En el pulmón el hongo pasa a su forma levaduriforme; el sistema inmunitario del individuo reacciona por medio de las integrinas CD11 y CD18 que se encuentran en la superficie de neutrófilos y macrófagos. Gracias a sus mecanismos de defensa, el hongo resiste la acción lisosomal y sobrevive dentro del macrófago, permitiendo su diseminación y afectando principalmente médula ósea, linfonódulos, hígado y bazo.

Las manifestaciones gastrointestinales más habituales en el hospedero, inicialmente, son diarreas de intestino grueso y tenesmo con eliminación de moco y sangre fresca. Con la progresión de la enfermedad aparece la diarrea de intestino delgado de forma voluminosa y asociada con malabsorción y/o enteropatía con pérdida de proteínas. La producción de mediadores inflamatorios produce manifestaciones inespecíficas, tales como anorexia, fiebre, grave pérdida de peso y depresión (Morgan *et al.*, 2004). La tos en los perros no es frecuente. En caso de estar presente se debería al estrechamiento de las vías respiratorias a causa de las múltiples linfadenopatías (Bromel & Sykes, 2005; Nishifuji *et al.*, 2005; Schumacher *et al.*, 2013).

En la mitad de los casos descritos se presentan sonidos pulmonares patológicos con o sin tos, taquipnea o disnea. En algunos casos se pueden detectar esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenopatía. Los signos menos frecuentes son cojeras (debidas a osteomielitis o poliartritis), coriorretinitis, enfermedad del sistema nervioso central, lesiones cutáneas, ulceración oral e insuficiencia adrenal. La neuritis óptica y el desprendimiento de la retina también pueden presentarse en pacientes con enfermedad diseminada (Fernández-Andreu *et al.*, 2011; Castañón-Olivares 2014).

En un estudio retrospectivo, Mitchell y Stark (1980) encontraron que en 18 de 24 casos (75%), un solo informe tenía historia y/o signos clínicos relacionados con el tracto gastrointestinal. Aunque poco común, como en los gatos, la histoplasmosis podría causar un síndrome gastrointestinal sin signos respiratorios detectables (Peterson, 2003).

Curiosamente, la histoplasmosis diagnosticada en un perro en Japón estaba caracterizada por múltiples lesiones granulomatosas o úlceras cutáneas o

gingivales, sin compromiso pulmonar ni gastrointestinal. Las lesiones eran similares a la histoplasmosis equina reportada en Japón (Kagawa *et al.*, 1998). *Hc* var. *farciminosum* fue el agente causal en el perro de Japón, mientras que en América del Norte, los aislados pertenecían a *Hc* var. *capsulatum* (Kagawa *et al.*, 1998).

Los hallazgos hematológicos incluyen anemia normocítica, normocrómica y no regenerativa; es la anomalía hematológica más frecuente, producto de la inflamación crónica, la pérdida de sangre debida a gastro y enterorragias o el compromiso de la médula ósea (Morgan *et al.*, 2004). Es raro observar levaduras en monocitos, neutrófilos o eosinófilos. Por el contrario, es habitual la trombocitopenia producida por un aumento de la utilización de las plaquetas o de su destrucción. La hipoalbuminemia es la alteración más consistente observada en análisis químico del suero. El aumento de las enzimas hepáticas alaninaamino-transferasa (ALT), aspartatoaminotransferasa (AST) y fosfatasa alcalina (FA) y de la bilirrubina total (BT), indica el compromiso hepático (Gómez *et al.*, 2005; Gómez & Guida 2010).

En estudios radiográficos se observaron patrones intersticiales difusos o lineales que podían fusionarse en un patrón intersticial nodular. En muy pocos casos se evidenció infiltrado alveolar. Una de las manifestaciones más comunes en perros es la linfadenopatía hiliar. Los linfonódulos con focos de calcificación suelen ser indicativos de enfermedad inactiva. Las lesiones óseas son muy raras y se hallan en el esqueleto apendicular distal, en especial en carpos y tarsos (Ettinger & Feldman, 2003).

La observación de signos neurológicos en casos de histoplasmosis es inusual, por lo que un examen de líquido cefalorraquídeo no forma parte de las pruebas diagnósticas para identificar esta micosis (Meadows *et al* 1992). Sin embargo, Reginato *et al.* (2014) documentaron el primer caso en Italia de histoplasmosis canina con lesión confinada al sistema nervioso central. El animal presentó paraparesia aguda y progresiva y dolor dorso-lumbar. La resonancia magnética permitió observar una masa epidural que fue extraída mediante laminectomía. Durante el estudio histopatológico se encontraron macrófagos con estructuras intracitoplasmáticas semejantes a levaduras. Mediante técnicas especiales de tinción y de PCR se identificó a *H. capsulatum* como el agente causal.

## Manifestaciones clínicas en felinos

La histoplasmosis afecta más frecuentemente a gatos que a perros. Puede iniciarse tanto en los pulmones como en el tracto gastrointestinal, diseminándose posteriormente a los linfonódulos y de ahí hacia otros órganos. Los gatos jóvenes presentan un mayor

riesgo, aunque la histoplasmosis es una enfermedad que puede afectar a animales de cualquier edad y sexo. El desarrollo de la enfermedad depende del estado inmunitario del animal, puesto que un sistema inmunológico competente evitará el desarrollo de una enfermedad diseminada.

Los signos comunes y habituales son anorexia, fiebre, palidez de mucosas o pérdida de peso. El 50 % de los animales afectados presenta signos respiratorios, tales como disnea, taquipnea y ruidos pulmonares anómalos, aunque la tos no es frecuente. El 35 % de los felinos presenta hepatomegalia, esplenomegalia o linfadenopatía. En casos de infecciones oculares se han comprobado granulomas de párpado, proliferación pigmentada de la retina, edema retiniano, coriorretinitis granulomatosa, uveítis anterior, panoftalmítis y neuritis óptica. Son poco frecuentes los desprendimientos de retina y el glaucoma secundario (Ettinger & Feldman, 2004).

Las lesiones óseas se manifiestan por medio de alteraciones locomotoras evidenciadas por cojeras y por la inflamación de los tejidos blandos (Carne *et al.*, 1993; Gugnani & Muotoe-Okafor, 1997). Las lesiones cutáneas son poco frecuentes y consisten en nódulos que llegan a ulcerarse y drenar o cubrirse con costras. Los signos digestivos, otros que la anorexia, son poco frecuentes. Son muy raras las úlceras orales y linguales; en ocasiones se puede presentar ictericia cuando hay compromiso hepático. Por lo general, la forma de presentación de la enfermedad es multisistémica, produciendo en los órganos afectados lesiones granulomatosas. Las presentaciones clínicas atípicas incluyen las formas ósea diseminada e intestinal (intestinos delgado y grueso) sin compromiso pulmonar concomitante. En esta última se pueden observar caquexia, fiebre, diarrea acuosa con hematoquecia y vómitos (Schaer, 2006).

El periodo de incubación se extiende durante 8-11 semanas. En un estudio, sólo el 36 % de los casos presentó signos clínicos antes de las 4 semanas. Los signos clínicos, en general, eran inespecíficos, aun en la forma diseminada grave, en el 95 % de los 54 casos felinos que fueron diagnosticados en la necropsia (Abidon-Aidé, 2009; Aulakh *et al.*, 2012).

Una revisión de 96 gatos con histoplasmosis reveló la siguiente distribución de los signos clínicos: debilidad, letargo, adelgazamiento y fiebre (67 %), signos respiratorios incluyendo disnea, taquipnea o tos (39 %), signos oculares (24 %) y cojera o hinchazón de uno o más miembros por compromiso óseo (18 %). En este estudio también se comprobaron afecciones oculares en el 24 % de los gatos, incluyendo coroiditis, coriorretinitis, neuritis óptica, uveítis anterior, desprendimiento de retina, panoftalmítis y glaucoma (Davies *et al.*, 1996).

En otro informe los pacientes presentaron pér-

didada de peso, anorexia, signos respiratorios (disnea, taquipnea, tos, estornudos, dificultades para respirar), inflamación cutánea, ulceración, cojera, náuseas y vómitos (Aulakh *et al.*, 2012). Aunque se ha descrito ocasionalmente en la literatura, los gatos con histoplasmosis diseminada y afección pulmonar rara vez tienen tos, a pesar de que las radiografías muestran características consistentes con histoplasmosis pulmonar (Gabbert *et al.*, 1984). En una revisión de casos, en ocho gatos con osteomielitis por *H. capsulatum*, ninguno mostró signos físicos obvios de enfermedad de las vías respiratorias (Gabbert *et al.*, 1984).

Las presentaciones clínicas atípicas incluyen histoplasmosis diseminada que afecta solo al sistema óseo e histoplasmosis intestinal primaria, tanto en gatos jóvenes como en adultos (Rochat & Cristal, 1999). Además, la histoplasmosis intestinal sin compromiso pulmonar concomitante puede manifestarse por signos clínicos como: caquexia crónica, fiebre, diarrea acuosa con hematoquecia y vómito (Stark, 1982).

## Diagnóstico diferencial

La histoplasmosis debe diferenciarse de infecciones por micobacterias, protozoos y otros agentes fúngicos sistémicos y de neoplasias (Schaer, 2006). La histoplasmosis, al causar síntomas gastrointestinales, como la diarrea, puede confundir al médico clínico con otras enfermedades del intestino grueso, por ejemplo, colitis asociadas con las dietas (hipersensibilidad dietaria, colitis inducida por materiales extraños), colitis idiopática (colitis plasmocítica linfocitaria, colitis eosinofílica, colitis granulomatosa, colitis ulcerativa histiocítica de los perros boxer, colitis supurativa), colitis debido a protozoarios o parásitos (trichuriasis, ancilostomiasis, strongiloidiasis, entoamebiasis, balantidiasis, giardiasis), colitis bacteriana (*Salmonella* spp., *Campylobacter jejuni*, *Yersenia enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, micobacterias, *Clostridium perfringens*, *C. difficile*), candidiasis, pitiosis gastrointestinal, prototecosis, intususcepción cecocólica, y colitis asociada a pancreatitis. También debe diferenciarse de infecciones o afecciones del intestino delgado como la enfermedad idiopática inflamatoria del intestino y el linfosarcoma intestinal (Ettinger & Feldman, 2004).

La observación, en cualquier tipo de muestra clínica, de levaduras intracelulares de formas ovoides con gemación de base estrecha es muy sugestiva de histoplasmosis; sin embargo, debe tenerse en cuenta que algunas células pequeñas de *Cryptococcus neoformans* pobremente encapsuladas, así como también las células de *Penicillium marneffeii*, *Pneumocystis* spp., *Toxoplasma gondii* y *Leishmania donovani* pueden crecer de modo intracelular y ser confundidas con *H. capsulatum*, dando lugar a errores de diagnóstico (Guimarães *et al.*, 2006; Kauffman, 2007).

## Métodos de diagnóstico

Las pruebas generales de laboratorio clínico no son útiles en el diagnóstico de la infección dada la inespecificidad de los hallazgos (anemia leve, pancitopenia, aumento de la velocidad de sedimentación globular, hiperbilirrubinemia moderada e incremento de los niveles de lactato deshidrogenasa y fosfatasa alcalina, entre otros) (Aulakh *et al.*, 2012; Brillhante *et al.*, 2012; Bromel & Sykes, 2005; Fernández-Andreu *et al.*, 2011; Gilor *et al.*, 2011; Schumacher *et al.*, 2013; Taylor *et al.*, 2012).

El diagnóstico de laboratorio se basa en técnicas de microscopía, cultivo y detección de antígenos y anticuerpos (Fernández-Andreu *et al.*, 2011; Gilor *et al.*, 2011; Gómez *et al.*, 2005; Gómez & Guida, 2010; Morales-Ruiz, 2010; Wheat, 2006). Las muestras suelen ser muy diversas, dependiendo de la forma clínica que se presente. Las más frecuentes son el esputo y otras secreciones respiratorias, sangre, médula ósea, exudado y raspado de lesiones cutáneas o mucocutáneas, orina, líquido cefalorraquídeo (LCR) y biopsias de distintos órganos (Fernández-Andreu *et al.*, 2011).

Es importante destacar que la recolección del material que será procesado para diagnóstico microbiológico clásico debe realizarse en un recipiente estéril sin formol (Castañón-Olivares, 2014).

## Métodos directos

### Examen directo

El procedimiento con hidróxido de potasio, que por lo regular resulta útil para el diagnóstico de otras enfermedades fúngicas, no es de utilidad para la histoplasmosis. En el caso de infecciones diseminadas en animales inmunodeficientes, el examen microscópico de líquidos orgánicos estériles y de tejidos ayuda al diagnóstico, aunque se ha descrito hasta un 50% de falsos negativos en los exámenes histopatológicos (Gutiérrez *et al.*, 2005, 2008). Las tinciones de Giemsa, May-Grünwald Giemsa (MGG) o Wright permiten observar las levaduras esféricas u ovoides, de 3 a 5 µm de diámetro, rodeadas de una gruesa membrana dentro de macrófagos o monocitos; también puede haber levaduras extracelulares, debido a la destrucción de las células fagocitaria (Fig. 1). La observación de estas levaduras intracelulares teñidas de manera irregular compatibles con *Histoplasma* spp., en general, permite el diagnóstico de la micosis (Schumacher *et al.*, 2013).

En una tinción de Gram, el *H. capsulatum* se identifica como Gram positivo; la pared no se tiñe y simula una cápsula clara que rodea el elemento levaduriforme. Esta tinción no permite observar las levaduras intracelulares y, por lo tanto, no permite el diagnóstico.

Otras tinciones histológicas, como el PAS y la coloración con plata de Gomori-Grocott, pueden teñir al *H. capsulatum* (Fig. 2). Sin embargo, un observador poco experimentado puede confundirlo con levaduras del género *Candida*, cuya morfología es parecida aunque es de mayor tamaño, se tiñe de forma homogénea y es extracelular (Taylor *et al.*, 2012).

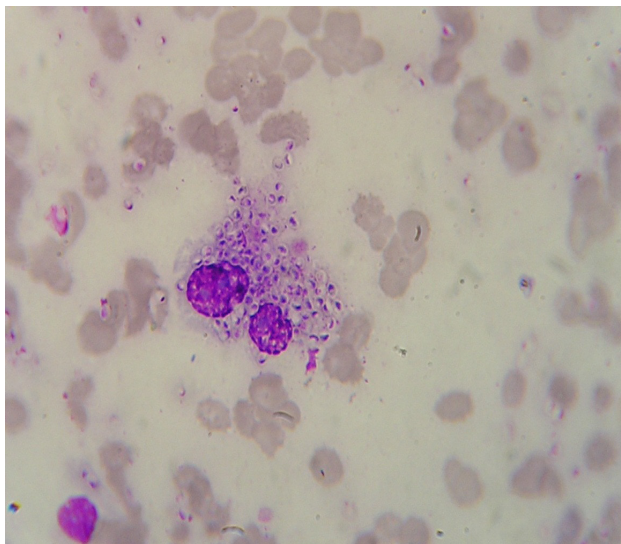


Figura 1. Raspado de lesión cutánea. Tinción de Giemsa (1000X). Gentileza del Dr. Gustavo Giusiano.

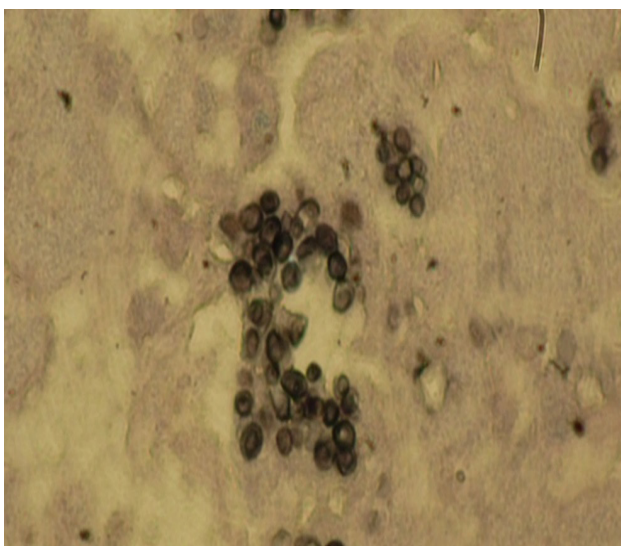


Figura 2. Levaduras de *Hc* var. *capsulatum* en hígado de *Rattus norvegicus*. Tinción de Gomori-Grocott (1000X). Gentileza del Dr. Roberto Suárez-Álvarez. Departamento de Micología. ANLIS-INEI "Dr. Carlos G. Malbrán".

Existen otros microorganismos que pueden ser confundidos con *Histoplasma* entre los que figuran *Leishmania*, *Toxoplasma* y *Paracoccidioides*. La diferenciación con *Leishmania* puede ofrecer dificultades, pero estos protozoarios poseen dos masas cromáticas, núcleo y blefaroplasto. También las levaduras de *Histoplasma* spp. deben diferenciarse de *Toxoplasma*.

Finalmente, las formas pequeñas e intracelulares de *Paracoccidioides* spp. pueden ser confundidas con *H. capsulatum*, pero la observación cuidadosa de varios campos microscópicos permite descubrir alguna forma multibrotante típica de *Paracoccidioides* spp. (Gómez & Guida, 2010).

En los gatos es más probable encontrar levaduras en aspirados de médula ósea o linfonódulos y también en células procedentes de lavados traqueales o broncoalveolares. En los perros, en general, se encuentran más en biopsias, raspados rectales, aspirados de médula ósea, hígado, linfonódulos o bazo y también en células procedentes de lavados traqueales o broncoalveolares. No es frecuente el envío al laboratorio de aspirados de LCR y de lesiones óseas líticas (Morgan *et al.*, 2004).

### Cultivo

Cultivos a 28 °C. La muestra sospechosa de contener el agente se siembra en agar Sabouraud glucosa + antibiótico. Luego de una incubación de 15 a 21 días desarrolla la fase micelial del hongo, que macroscópicamente se caracteriza por presentar micelio aéreo algodonoso y blanco, el que con el tiempo puede tornarse parduzco.

En el examen microscópico de las colonias se puede diferenciar un micelio hialino, ramificado y tabicado, de 2 a 5 µm de diámetro (Fig 3). La ramificación en algunos de los casos es lateral o raramente dicotómica. En general se observan macroconidios que nacen de conidióforos cortos, esféricos o piriformes, de 10 a 25 µm de diámetro, con una pared celular gruesa y prolongaciones digitiformes. Los microconidios son piriformes y miden de 2 a 5 µm de diámetro, con una pared lisa o rugosa. Estos microconidios son sésiles o se disponen sobre cortos conidióforos a lo largo de la hifa. Algunos cultivos pueden presentar macroco-

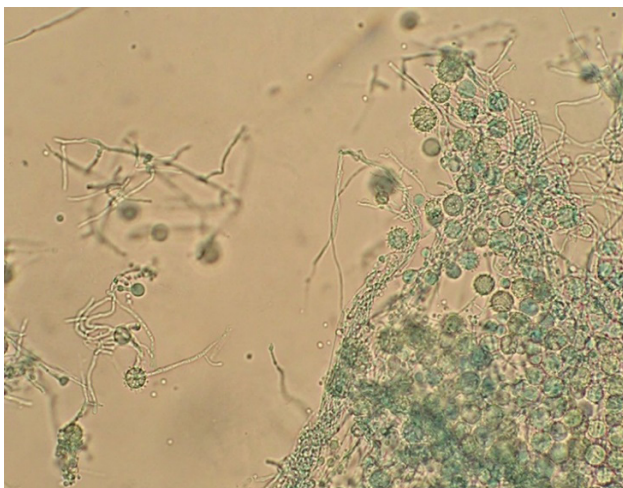


Figura 3. Fase micelial de *H. capsulatum* (400X). Gentileza del Dr. Gustavo Giusiano

nidios atípicos de pared lisa. La técnica ideal para la observación del hongo poscultivo es la tinción con azul de lactofenol.

**Cultivo a 37 °C.** En agar infusión cerebro corazón se pueden observar macroscópicamente colonias de aspecto pastoso o seroso, lisas y de color blanco, crema o rosado. Tienen tendencia a revertir a la fase filamentosa y necesitan medios adicionados con sangre o cisteína para mantener la forma de levadura.

En el examen microscópico de las colonias desarrolladas a 37 °C se pueden observar levaduras brotantes elípticas u ovals, de 2 a 5 µm de diámetro. En estos cultivos suelen encontrarse formas de transición hacia la fase filamentosa, que se identifican como hifas cortas mezcladas con las levaduras. A veces se observan clamidoconidios intercalares y, en algunos casos, brotes intercalares o terminales. Esto sucede cuando los medios de cultivo son deficientes en nutrientes necesarios, por lo que la levadura tiende a desarrollar su fase micelial (López 2006). En la práctica clínica diaria no se recomienda realizar el cultivo del agente en laboratorios que no cuenten con rigurosas normas de bioseguridad, debido al riesgo para la salud pública que éste representa (Morgan *et al.*, 2004).

### Detección de antígeno

Las pruebas de detección de antígeno se han puesto en práctica solamente en humanos, debido a su complejidad de elaboración y a sus elevados costos. Las pruebas que detectan antígenos se consideran mucho más eficientes para el diagnóstico de la histoplasmosis. *H. capsulatum* es capaz de liberar un antígeno polisacárido, que puede ser detectado en el suero, líquido pleural, lavado broncoalveolar, LCR y orina. Este método, aunque es específico para dicho antígeno, con una sensibilidad del 92 % en muestras de orina y un 82 % en muestras de suero, puede dar lugar a reactividad cruzada en muestras de orina de pacientes con otras micosis sistémicas (Wheat, 2006; Swartzentruber, 2009).

Las concentraciones de antígeno disminuyen en respuesta al tratamiento. En los pacientes inmunocomprometidos, tratados con anfotericina B, los niveles caen durante las primeras semanas de terapia y se estabilizan a niveles bajos durante el tratamiento de mantenimiento. En pacientes sin enfermedades que comprometan su estado de inmunocompetencia, la eliminación total del antígeno ocurre más rápidamente. La principal desventaja de este método, además de su elevado costo, es que solo se encuentra disponible en un laboratorio de EE. UU. (Fernández-Andreu *et al.*, 2011).

Otros autores han ensayado diferentes métodos que también detectan antígenos en muestras clínicas,

aunque no han sido comercializados. Mediante el empleo de anticuerpos monoclonales que reconocen la proteína de 70 kDa, Gómez *et al.* (2005) diseñaron un sistema inmunoenzimático capaz de detectar antígenos en muestras de suero y orina, aunque encontraron hasta un 20 % de reacciones cruzadas en sueros de pacientes con aspergilosis, paracoccidiodomicosis y tuberculosis.

Hanzlicek *et al.* (2016) demostraron la utilidad del inmunoensayo enzimático (EIA, del inglés enzyme immunoassay) al evaluar la respuesta de gatos con histoplasmosis al tratamiento antifúngico e identificar una recaída o la remisión de la enfermedad. Los resultados de este estudio demostraron una disminución significativa de la concentración del antígeno en muestras de orina. La sensibilidad del EIA fue de 90 % pero la especificidad fue solo de 64,6 %. Con una prueba positiva a antígeno se debería considerar la continuación del tratamiento pero, debido a su baja especificidad, deben tenerse en cuenta otros indicadores clínicos de remisión de la enfermedad para tomar la decisión de interrumpir el tratamiento. El EIA no sustituye a las pruebas tradicionales para determinar la remisión de la enfermedad.

Otro método de detección de antígenos ha sido evaluado por Scheel *et al.* (2009), quienes utilizando un ELISA de captura con anticuerpos policlonales encontraron 81 % de sensibilidad analizando muestras de orina de individuos con una enfermedad inmunomediada y con histoplasmosis confirmada mediante cultivo.

### Histopatología

Las muestras provenientes de biopsias o material de necropsia se fijan en formol neutro al 10 % y se procesan según la rutina de inclusión en parafina. Los estudios histopatológicos revelan lesiones piogranulomatosas, con numerosos microorganismos intracelulares.

Las tinciones especiales (PAS, fúngica de Gridley y metenaminargéntica de Gomori) son las que mejor demuestran la presencia de microorganismos en los tejidos (Morgan *et al.*, 2004). Además, permiten observar la respuesta celular del hospedero: en individuos inmunodeprimidos, esta respuesta es pobre y se observan abundantes levaduras en el interior de los macrófagos, mientras que en los inmunocompetentes el hongo provoca una reacción granulomatosa, con predominio de células epitelioides y gigantes, en cuyo interior se observan las levaduras de *H. capsulatum*. La sensibilidad de este método es muy baja en las formas autolimitantes y en la histoplasmosis pulmonar aguda; su valor se incrementa en las formas pulmonares crónicas y diseminadas (Kauffman *et al.*, 2007; Guimarães *et al.*, 2006). Con la técnica de PAS se diferencia *Histoplasma* de *Leishmania* y de *Toxoplasma*.

La reacción histológica típica es histiocitaria, con formación de un complejo primario análogo al de la tuberculosis (chancro de inoculación, linfangitis y adenopatía satélite), granuloma tuberculoide y tendencia a la fibrosis, que traducen un proceso defensivo. En los individuos con escasas defensas, se puede presentar una respuesta histiocitaria simple con numerosas levaduras o necrosis caseosa masiva.

La lesión granulomatosa pulmonar puede estar calcificada o activa. En la forma activa se observan numerosos nódulos grises de 0,5 a 1 cm de diámetro, formados por neutrófilos e histiocitos que contienen levaduras. Pueden existir focos de necrosis rodeados de linfocitos y células plasmáticas.

La observación en cualquier tipo de muestra clínica, proveniente de perros o gatos con sospecha de una enfermedad micótica sistémica, de levaduras intracelulares con las características antes mencionadas es sugestiva de histoplasmosis (Fernández-Andreu *et al.*, 2011; Schumacher *et al.*, 2013).

### Técnicas moleculares

Debido a las dificultades que se presentan con el diagnóstico convencional de la histoplasmosis, en particular por la demora y la baja sensibilidad, en especial en algunas formas clínicas, en la actualidad se centran grandes esperanzas en las posibilidades que pueden brindar los métodos moleculares, particularmente las técnicas de PCR, ya que los métodos convencionales de detección como el cultivo requieren nivel de bioseguridad 3 y las pruebas de detección de antígeno muchas veces son inaccesibles (Wheat *et al.*, 1986; Bialek *et al.*, 2001).

En este sentido, uno de los primeros estudios fue publicado por Bialek *et al.* (2001), quienes diseñaron una PCR anidada capaz de detectar ADN de *H. capsulatum* con elevada sensibilidad en muestras de tejidos y sangre de ratones infectados experimentalmente. Sin embargo, también detectó ácido nucleico de *Blastomyces dermatitidis* y *Paracoccidioides brasiliensis*. Mediante la detección de una pequeña región 18S del ADN ribosomal, obtuvieron una buena sensibilidad y especificidad para el diagnóstico de la histoplasmosis.

Bialek *et al.* (2002) evaluaron dos PCR anidadas dirigidas a la amplificación de diferentes fragmentos genómicos. La primera amplifica un fragmento del ADN ribosomal del gen 18S y la segunda amplifica la secuencia genómica de la proteína HC100. Así observaron que la especificidad y la sensibilidad de las pruebas diagnósticas son idénticas. Además, comprobaron la especificidad de la PCR anidada dirigida a la proteína HC100 al enfrentarla con los ácidos nucleicos de *B. dermatitidis* y *P. brasiliensis*, los cuales

comparten la misma secuencia génica del gen 18S de *H. capsulatum* (Porta *et al.*, 1999).

Bracca *et al.* (2003) desarrollaron una PCR semianidada que detecta un gen codificante del antígeno H de *H. capsulatum*, que sirvió para el diseño de 3 oligonucleótidos a los que denominaron Hc1, Hc2 y Hc3. Estos sirvieron para la identificación específica de *H. capsulatum*, sin presentar reacciones cruzadas con ninguna bacteria u hongo. La técnica fue empleada en muestras de pacientes con histoplasmosis diagnosticada por medio del cultivo del agente. La PCR semianidada detecta material genético de *H. capsulatum* en pacientes con cultivo negativo, por lo que se la considera como una buena técnica de diagnóstico.

Los principales antígenos de diagnóstico de *H. capsulatum* son el H y el M. Guedes *et al.* (2003) propusieron una prueba diagnóstica basada en el diseño de oligonucleótidos para amplificar la secuencia genómica del antígeno M del hongo. La prueba se caracterizó por su alta sensibilidad y su especificidad del 100% al contrastarla con *Paracoccidioides brasiliensis*, *Candida* spp., *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans*, *Blastomyces dermatitidis*, *Coccidioides immitis*, *Aspergillus niger* y *Aspergillus fumigatus*, indicando que la técnica es ideal para la identificación de *H. capsulatum* var. *capsulatum*.

La PCR anidada HcP100 ha sido evaluada en distintas partes del mundo en el diagnóstico de histoplasmosis. Maubon *et al.* (2007) evaluaron esa técnica molecular frente al examen microscópico directo y el cultivo (estándar de oro), dando como resultado un 100% de especificidad y sensibilidad en muestras clínicas de pacientes con sospecha de histoplasmosis. Toranzo *et al.* (2009) evaluaron la misma PCR anidada con muestras de sangre entera de pacientes con diagnóstico de histoplasmosis, pacientes con infecciones fúngicas diversas y pacientes sanos como casos controles, obteniendo como resultado un 89% de sensibilidad y un 96% de especificidad para el diagnóstico de la enfermedad en muestras de sangre entera. El único falso positivo que detectó la prueba fue el de un paciente con una infección por *Mycobacterium avium-intracellulare*. Por otra parte, Muñoz *et al.* (2010) realizaron una evaluación en pacientes con sospecha de histoplasmosis, pacientes con enfermedad respiratoria con cultivo negativo a hongos, pacientes con infecciones diversas y pacientes sanos, aplicando la PCR anidada dirigida al gen codificante de la proteína HC100. Con este método obtuvieron una sensibilidad del 100% y una especificidad del 92,4% y 95,2%, en coincidencia con los resultados anteriormente descritos que indican que la PCR anidada es una herramienta útil para el diagnóstico rápido y eficaz de la histoplasmosis en zonas endémicas.

La PCR en tiempo real (PCR-RT) es una de las técnicas vanguardistas que ha sido utilizada para la detección de diversos agentes patógenos. Martagon-Villamil *et al.* (2003) desarrollaron la primera PCR-RT para la identificación de *H. capsulatum* dirigida a la secuencia ITS-1 (*internal transcribed spacer*) y aplicaron los cebadores Hcap-F y Hcap-R hibridados con isotiocianato de fluoresceína. La nueva técnica se puso a prueba con 107 aislamientos micóticos, de los cuales 34 eran *H. capsulatum*. Se comprobó la especificidad de la misma con otros hongos como *Candida* spp., *Blastomyces dermatitidis*, *Aspergillus* spp. y *Cryptococcus* spp., obteniendo un 100% de especificidad y de sensibilidad, lo que la posiciona como una prueba confiable para el diagnóstico de la histoplasmosis.

Buitrago *et al.* (2007) evaluaron la PCR-RT descrita por Martagon-Villamil *et al.* (2003); utilizaron para el diseño de los iniciadores y sondas las regiones de ITS y eligieron fragmentos pertenecientes a la zona ITS-1. Se diseñó un control interno de la técnica de PCR, que consistía en la inclusión de otro oligonucleótido en la reacción, con secuencia complementaria al de los iniciadores y la sonda, pero con algunos cambios en la secuencia, lo cual sirvió para detectar productos de amplificación sin producción de fluorescencia. La sensibilidad y la especificidad de la prueba fueron de 78,6% y 100%, respectivamente, para muestras de secreciones respiratorias, aspirados medulares y muestras de suero. Cabe recalcar que las muestras de elección para la PCR-RT son las secreciones respiratorias y los aspirados medulares, con los cuales se obtienen una sensibilidad y una especificidad del 100%.

Babady *et al.* (2011) detallaron un ensayo PCR-RT capaz de identificar simultáneamente *B. dermatitidis* e *H. capsulatum* empleando los iniciadores BD1, 2, 3, 4 y HC1, 2, 3, 4, respectivamente. La extracción se realizó partiendo de muestras de cultivo y directamente de muestras clínicas, tales como secreciones respiratorias, tejido fresco, sangre, médula ósea y líquido cefalorraquídeo. No se procesaron muestras de orina, ya que en pacientes con histoplasmosis diseminada con frecuencia no se encuentra ADN de *Histoplasma* en la misma. En esos casos es recomendable el uso del ensayo de antígeno de *H. capsulatum*. Se demostró una sensibilidad de 73% y una especificidad de 100% para la detección de *H. capsulatum* en muestras clínicas.

Simon *et al.* (2010) evaluaron la PCR-RT comparándola con otras técnicas, tales como las serológicas, el examen directo y el cultivo (estándar de oro), obteniendo un 95,4% de sensibilidad y un 96% de especificidad. La validación del protocolo se realizó gracias a un estudio multicéntrico que incluyó

5 laboratorios a los que se les entregaron 10 muestras para identificar. Los resultados fueron óptimos. No encontraron falsos positivos y la especificidad alcanzó el 100 %. Sin embargo, la sensibilidad fue del 43 % en un laboratorio donde se aplicó la PCR-RT dirigida a secuencias específicas (SCARS *markers*) (Buitrago *et al.*, 2013).

Fernández-Andreu *et al.* (2011) indicaron que sería muy beneficioso estandarizar una prueba que permita identificar *H. capsulatum* var. *capsulatum* en muestras ambientales; una técnica con estas características sería una herramienta útil para fortalecer estudios epidemiológicos y de salud pública.

## Métodos indirectos

### Detección de anticuerpos

Las pruebas que detectan anticuerpos han sido de gran valor en el diagnóstico de la histoplasmosis, no solo por su relativa rapidez en comparación con los métodos de cultivo e identificación, sino también porque, en muchas ocasiones, son la primera y a veces la única evidencia de infección (Freitas *et al.*, 2009). Las más empleadas han sido la inmunodifusión doble, la fijación del complemento y la técnica de ELISA indirecta. La prueba cutánea de la histoplasmina está disponible pero no es muy conocida por haber sido superada por las otras técnicas serológicas descritas.

En las zonas endémicas, entre el 50 y el 80 % de adultos presenta positividad a la prueba cutánea de histoplasmina; aunque menos del 5 % de las personas desarrollan la enfermedad sintomática, después de un bajo nivel de exposición, la tasa de ataque puede ser superior al 75 % después de una exposición prolongada (Wheat 2003; Wheat *et al.*, 2004). Las altas tasas de histoplasmina positiva en humanos de zonas endémicas plantean el interrogante sobre cuál podría ser el porcentaje de animales de la misma zona positivos a histoplasmina.

En 1939, De Monbreum comunicó el primer caso de histoplasmosis en un perro. A partir de entonces, diversos investigadores buscaron comprobar la presencia del hongo en los animales mediante métodos fáciles y prácticos. Prior *et al.* realizaron una evaluación de la reacción de la histoplasmina positiva en perros, encontrando que la reacción positiva era similar a la producida por tuberculina en el ganado bovino positivo a *Mycobacterium bovis* (Prior *et al.*, 1949).

Okudaira *et al.* (1962) estudiaron las características de la reacción cutánea a la histoplasmina en perros, constatando la formación de vesículas y erosiones y, microscópicamente, una moderada a abundante infiltración de células mononucleares y neutrófilos. La

intensidad de esta respuesta varió cuantitativamente en animales negativos y positivos.

En San Pablo, Brasil, se realizó un estudio epidemiológico para identificar el porcentaje de seropositividad en diferentes mamíferos del zoológico mediante la prueba cutánea de histoplasmina. Se encontró un 44,8 % de reacciones positivas en total: de este valor, un 15,1 % correspondió a los *Cebidae*, 6,2 % a los *Callithricidae*, 86,5 % a los *Procyonidae* y 50 % a los *Felidae* (Costa *et al.*, 1994).

Las pruebas serológicas se utilizan en perros y gatos de áreas endémicas para establecer un diagnóstico presuntivo cuando las manifestaciones clínicas sugieren la enfermedad pero el microorganismo no se ha logrado detectar. Se cree que los anticuerpos precipitantes representan la inmunoglobulina M y se detectan 2-4 semanas después de la infección inicial en animales. La prueba de anticuerpos precipitantes puede ser negativa y convertirse en positiva cuando la enfermedad se disemina (Morgan *et al.*, 2004).

La inmunodifusión doble se considera una prueba sencilla, económica y muy específica, debido a la aparición de las bandas de precipitación H y M entre las 4 y 6 semanas después de la exposición, aunque su sensibilidad es baja. La presencia de una banda M indica una infección activa o pasada o la aplicación reciente de una prueba intradérmica de histoplasmina. La banda H aparece después de la banda M e indica infección activa (Fernández-Andreu *et al.*, 2011).

Los anticuerpos anti-M pueden persistir durante años en el suero del paciente, mientras que los anti-H tienden a desaparecer mucho más rápidamente. La prueba de fijación del complemento es más sensible y menos específica que la inmunodifusión, pero requiere de gran experiencia y, en general, está siendo abandonada por la mayoría de los laboratorios por su complejidad (Morgan *et al.*, 2004).

Los anticuerpos fijadores del complemento aparecen más tardíamente que las precipitinas (30 días después del contacto infectante). En las primoinfecciones leves, esta prueba es negativa, mientras que en las moderadas se vuelve negativa luego de mostrar una leve positividad. Es una técnica ideal para seguir la evolución de la enfermedad (Gómez & Guida, 2010). Un título de 1:32 se considera positivo, mientras que los títulos de 1:8 y 1:16 se consideran débilmente positivos y, en algunos casos, indican una infección anterior, en especial en individuos de áreas endémicas. Si se pretende alcanzar una mayor sensibilidad se recomienda realizar de manera simultánea la FC y la ID (Ettinger & Feldman, 2004; Gómez & Guida, 2010; Morgan *et al.*, 2004).

Las pruebas serológicas son positivas en, aproximadamente, el 71 % de las formas diseminadas de histoplasmosis, en el 100 % de las pulmonares

crónicas y en el 98% de las pulmonares agudas y autolimitadas. Sin embargo, en individuos inmunocomprometidos la positividad es mucho menor (Fernández-Andreu *et al.*, 2011).

Los ensayos inmunoenzimáticos también han sido empleados en el diagnóstico de histoplasmosis, aunque de manera limitada, y han mostrado buena sensibilidad aunque menor especificidad que las pruebas de inmunoprecipitación. Las pruebas se tornan positivas a los 4-7 días del contacto con el agente y alcanzan su título máximo a las 2-3 semanas, valores que luego decrecen y persisten bajos. Son útiles para diagnosticar neumonitis de primoinfección con evoluciones de menos de 1 año (Gómez & Guida, 2010).

En todos los casos, la interpretación de las pruebas serológicas debe realizarse integrando sus resultados con los datos clínico-epidemiológicos y micológicos. También se han desarrollado pruebas de hemaglutinación pasiva, inmunofluorescencia, inmunoelectroforesis e *immunoblotting*, entre otras (Gómez & Guida 2010).

## Tratamiento

Para el tratamiento, las drogas de primera elección son el ketoconazol y el itraconazol. El primero es suministrado a dosis de 5-15 mg/kg vía oral (v.o.) cada 12 h y el segundo a dosis de 5-10 mg/kg v.o. cada 24 h. Los tiempos de retiro de los fármacos antimicóticos dependen mucho del paciente y del tipo de enfermedad. Para procesos pulmonares es de esperar una pronta curación, pero en casos de enfermedades sistémicas diseminadas el tiempo de retiro puede extenderse hasta 12 meses (Morgan *et al.*, 2004). La administración de ketoconazol en animales durante mucho tiempo debe ser evaluada mensualmente mediante análisis químico del suero completo, incluido el perfil hepático. No debe indicarse en hembras reproductoras, debido a que el ketoconazol es teratogénico y hepatotóxico. Para las formas sistémicas es útil la anfotericina B, por vía intravenosa, en solución glucosada al 5%, a razón de 0,5 mg/kg/día administrada durante 4-6 horas durante 6 semanas (Gómez & Guida, 2010).

La enfermedad pulmonar puede remitir de forma espontánea. Sin embargo, igualmente se recomienda el tratamiento antifúngico para evitar posibles cuadros de cronicidad.

El tratamiento recomendado para la histoplasmosis felina se basa en el itraconazol, a dosis de 5mg/kg v.o. cada 12 h durante, al menos, 2-4 meses. La biodisponibilidad de la cápsula es variable y algunos gatos pueden requerir dosis de hasta 10 mg/kg v.o. cada 12 h. Además, se debe suplementar con 250 µg de cobalamina, por vía subcutánea, durante 7 días, dada la comprobada deficiencia de esta vitamina,

tanto en gatos sanos como en enfermos (Reed *et al.*, 2007). El ketoconazol es eficaz en un tercio de los gatos que padecen la enfermedad. La anfotericina B puede ser agregada al tratamiento cuando están gravemente afectados.

En caninos el tratamiento ideal es el itraconazol 10 mg/kg v.o. cada 12 h. En casos graves como es el caso de animales inmunodeficientes, se aconseja utilizar anfotericina B. La administración de corticosteroides está indicada en perros con obstrucción de las vías respiratorias por aumento de tamaño de los linfonódulos hiliares (Morgan *et al.*, 2004).

## Algoritmo de diagnóstico

En la figura 4 se muestra un algoritmo simple para arribar al diagnóstico de histoplasmosis. Es recomendable que se obtengan resultados positivos de tres o más pruebas para confirmar el diagnóstico.

## Discusión

*Histoplasma* spp., un hongo dimórfico del cual según el lugar de origen del aislamiento se han identificado tres variedades taxonómicas (*H. capsulatum*: var. *capsulatum*, var. *duboisii* y var. *farciminosum*), es el agente causal de la histoplasmosis.

La formación de microconidios promueve la diseminación y contagio; además, la resistencia al fagolisosoma de los macrófagos favorece la presentación de enfermedad pulmonar (Woods *et al.*, 2003). Sin embargo, pueden verse afectados otros sistemas, tanto en caninos como en felinos, como el tracto gastrointestinal, linfonódulos, hígado, bazo, médula ósea, ojos y glándulas adrenales.

Esta infección fúngica puede afectar a una gran variedad de mamíferos, siendo más susceptibles los felinos y los caninos menores de 4 años (Morgan *et al.*, 2004). La enfermedad presenta dos fases, una primaria que puede ser pulmonar o cutánea y otra progresiva que corresponde a la forma diseminada.

En caninos la histoplasmosis se evidencia principalmente con signología gastrointestinal, esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenopatía, a diferencia de los felinos, en los cuales las alteraciones gastrointestinales son poco frecuentes. No obstante, es posible que haya presentaciones atípicas de histoplasmosis diseminada con alteraciones del sistema óseo o histoplasmosis intersticial primaria (Rochat & Cristal, 1999).

La inespecificidad de los signos clínicos hace que entre los diagnósticos diferenciales se incluyan las infecciones por micobacterias, protozoos, otras micosis sistémicas y neoplasias. Se han evaluado distintos métodos directos e indirectos de diagnóstico



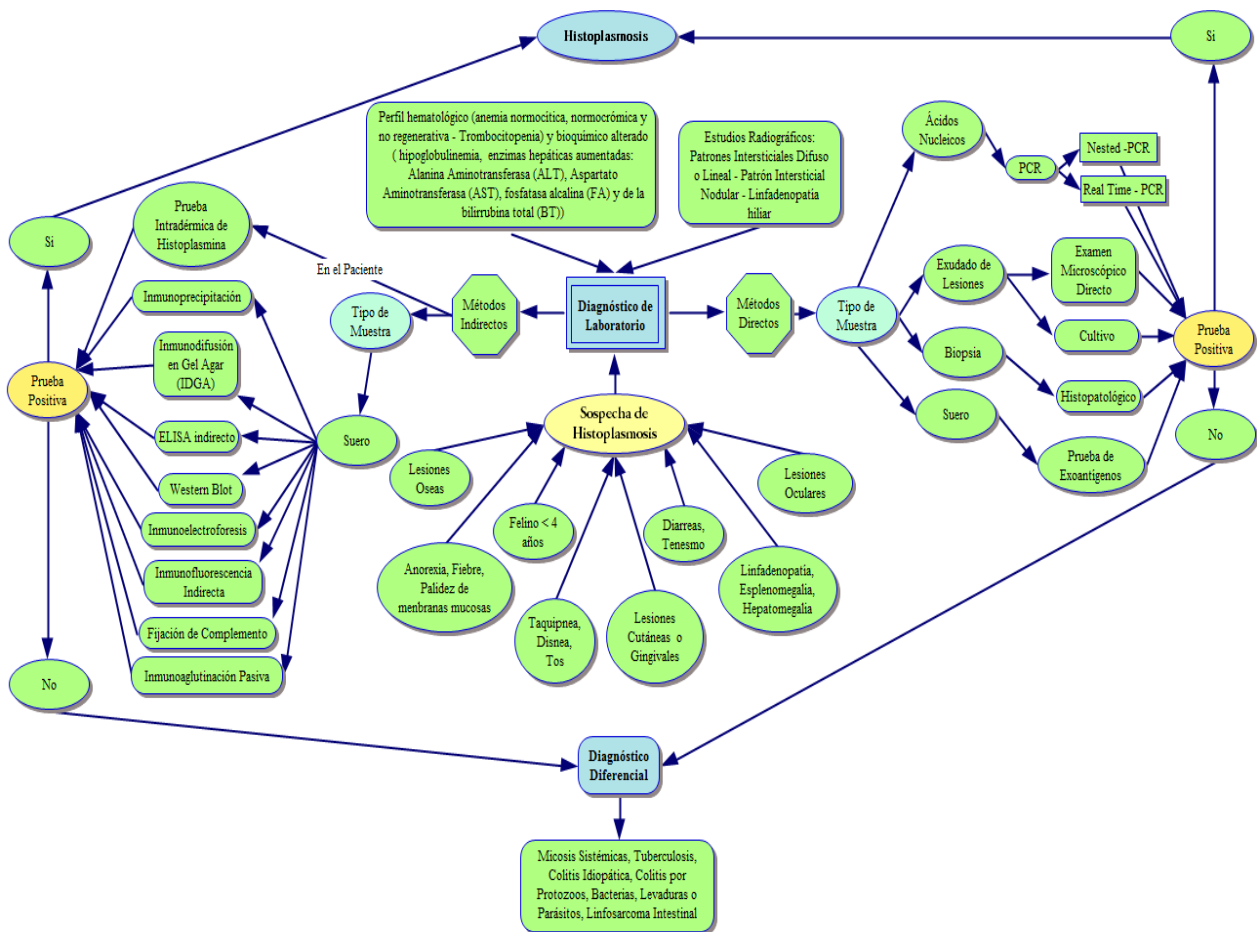


Figura 4. Algoritmo para el diagnóstico de la histoplasmosis

a partir de una variedad de muestras clínicas, tales como esputo, sangre, médula ósea, exudado y raspado de lesiones cutáneas o mucocutáneas, orina, líquido cefalorraquídeo y biopsias de distintos órganos.

Los métodos indirectos, utilizados para el diagnóstico de histoplasmosis son pruebas rápidas, en comparación con el cultivo, y detectan anticuerpos. Entre los métodos diagnósticos directos se encuentran técnicas como microscopía directa, detección de antígeno, histopatología y métodos moleculares.

Utilizando la microscopía directa es probable que se cometan errores de diagnóstico por una confusión de *Histoplasma* con otros microorganismos como *Candida* spp., *Leishmania*, *Toxoplasma* y *Paracoccidioides*. Los métodos de cultivo representan un alto riesgo de contagio para el personal de laboratorio y es necesario un nivel de bioseguridad 3. En consecuencia, en la actualidad se opta por métodos moleculares que ofrecen resultados rápidos y precisos para la identificación de esta micosis. Entre los métodos moleculares empleados se encuentran PCR anidada para la amplificación de un fragmento del ADN ribosomal del gen 18S y para la secuencia genómica de la proteína HC100, PCR semianidada para detectar el gen del antígeno H y la PCR-RT que posee una elevada sensibilidad y especificidad y es

considerada como una herramienta valiosa para estudios epidemiológicos.

### Bibliografía

Abidon-Aidé M. 2009. Histoplasmosis. Revista de Neumología de Brasil. 35:1145-51.

Aulakh HK, Aulakh KS, Troy GC. 2012. Feline histoplasmosis: a retrospective study of 22 cases (1986-2009). Journal of the American Animal Hospital Association. 48(3):182-7.

Babady NE, Buckwalter S P, Hall L, Le Febre K M, Binnicker M, Wengenack NL. 2011. Detection of Blastomyces dermatitidis and Histoplasma capsulatum from culture isolates and clinical specimens by use of real-time PCR. Journal of Clinical Microbiology. 49(9): 3204-8. doi:10.1128/JCM.00673-11

Bialek R, Feucht A, Aepinus C, Just-Nübling G, Robertson VJ, Knobloch J, Hohle R. 2002. Evaluation of two nested PCR assays for detection of Histoplasma capsulatum DNA in human tissue. Journal of Clinical Microbiology. 40(5):1644-7.

Bialek R, Fischer J, Feucht A, Najvar LK, Dietz K, Knobloch J, Graybill JR. 2001. Diagnosis and monitoring of murine histoplasmosis by a nested PCR assay. Journal of Clinical Microbiology. 39(4):1506-9. doi:10.1128/JCM.39.4.1506-1509.2001

Bracca A, Tosello ME, Girardini JE, Amigot SL, Gómez C, Serra E. 2003. Molecular detection of Histoplasma capsulatum var. capsulatum in human clinical samples. Journal of Clinical Microbiology. 41(4):1753-5.

- Brilhante RS, Coelho CG, Sidrim JJ, de Lima RA, Ribeiro JF, de Cordeiro RA, Rocha, MF. 2012. Feline histoplasmosis in Brazil: clinical and laboratory aspects and a comparative approach of published reports. *Mycopathologia*. 173(2-3), 193-7. doi:10.1007/s11046-011-9477-8
- Bromel C, Sykes JE. 2005. Histoplasmosis in dogs and cats. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 20(4):227-32.
- Buitrago M J, Canteros CE, Frías De León G, González Á, Marques-Evangelista de Oliveira M, Muñoz CO, Cuenca-Estrella, M. 2013. Comparison of PCR protocols for detecting *Histoplasma capsulatum* DNA through a multicenter study. *Revista Iberoamericana de Micología*. 30(4),256–60. doi:10.1016/j.riam.2013.03.004
- Buitrago MJ, Gómez-López A, Monzón A, Rodríguez-Tudela JL, Cuenca-Estrella M. 2007. Assessment of a quantitative PCR method for clinical diagnosis of imported histoplasmosis. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*. 25(1):16-22.
- Martínez Cepeda GE. *Micosis Sistémicas Endémicas*. Trabajo final, Especialización de Diagnóstico Veterinario de Laboratorio, Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad nacional de La Plata. 2012.
- Carne B, Hayette MP, Itoua Ngaporu A, Ngolet A, Darozzin F, Moyikoua A, Lehenaff YM. 1993. Histoplasmosis africaine à *Histoplasma duboisii* (*Histoplasma capsulatum* var. *duboisii*): quatorze cas congolais observés en 10 ans (1981-1990). *Journal de Mycologie Médicale*. 3:67-73.
- Castañón-Olivares L. 2014. Histoplasmosis. Departamento de Microbiología y Parasitología - Recursos de Micología. [ONLINE] Disponible en: <http://www.facmed.unam.mx/depotos/microbiologia/micologia/histoplasmosis.html>. [Consultado 30/05/2014]
- Costa EO, Diniz LS, Netto CF, Arruda C, Dagli ML. 1994. Epidemiological study of sporotrichosis and histoplasmosis in captive Latin American wild mammals. Sao Paulo, Brazil. *Mycopathologia*. 125(1):19-22.
- Davies C, Troy GC. 1996. Deep mycotic infections in cats. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 32(5):380-91.
- Ettinger SJ, Feldman EC, eds. *Micosis sistémicas-Histoplasmosis*. En: Ettinger SJ, 2004. *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. 6ª Ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, pp. 680-682.
- Fernández-Andreu C, Illnait-Zaragozí M, Martínez-Machín G, Perurena-Lancha M, Monroy-Vaca E. 2011. Una actualización acerca de histoplasmosis. *Revista Cubana de Medicina*. 63(3):20.
- Freitas RS, Carvalho-Vivi JO, Zamboni IM, Assis CM, Costa-Martins JE, Vicentini Moreira AP. 2009. The importance of serological assays in diagnosing acute pulmonary histoplasmosis. *The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*. 15:278-88
- Gabbert NH, Campbell TW, Beiermann RL. 1984. Pancytopenia associated with disseminated histoplasmosis in a cat. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 20(1): 119-22.
- Gilor C, Ridgway MD, Singh K. 2011. DIC and granulomatous vasculitis in a dog with disseminated histoplasmosis. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 47(3):26-30.
- Gómez J, Orío-Hernández M, Bilbao-Garagoitia A, García-Rodríguez J, Baquero F. 2005. Histoplasmosis diseminada. *Notas Clínicas*. 63(3):249-52.
- Gómez N, Guida N. Histoplasmosis. En: Gómez N, Guida N. 2010. *Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos*. Buenos Aires, Ed. Inter-Médica, pp. 273-7.
- Guedes HL, Guimarães AJ, Muniz M de M, Pizzini CV, Hamilton AJ, Peralta JM, Deepe GS Jr, Zancopé-Oliveira RM. 2003. PCR assay for identification of *Histoplasma capsulatum* based on the nucleotide sequence of the M antigen. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(2):535-9.
- Gugnani, HC, Muotoe-Okafor F. 1997. African histoplasmosis: a review. *Revista Iberoamericana de Micología*. 14(4),155-9.
- Guimarães AJ, Nosanchuk JD, Zancopé-Oliveira RM. 2006. Diagnosis of histoplasmosis. *Brazilian Journal of Microbiology*. 37(1):1-13.
- Gutiérrez ME, Canton A, Connolly P, Zarnowski R, Wheat LJ. 2008. Detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in Panamanian patients with disseminated histoplasmosis and AIDS. *Archive of "Clinical and Vaccine Immunology*. 15(4):681-3.
- Gutiérrez ME, Canton A, Sosa N, Puga E, Talavera L. 2005. Disseminated histoplasmosis in patients with AIDS in Panama: a review of 104 cases. *Clinical Infectious Disease*. 40(8):1199-202.
- Hanzlicek AS, Meinkoth JH, Renschler JS, Goad C, Wheat LJ. 2016. Antigen concentrations as an indicator of clinical remission and disease relapse in cats with histoplasmosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 30(4):1065-73. doi:10.1111/jvim.13962.
- Hearn VM. Structure and function of the fungal cell wall. En: Jacobs PH, Nall L, eds, 1997. *Fungal diseases. Biology, immunology, and diagnosis*. New York: Marcel Dekker, Inc., pp. 27-60.
- Kagawa Y, Aoki S, Iwatomi T, Yamaguchi M, Momiyama N, Hirayama K, Taniyama H. 1998. Histoplasmosis in the Skin and Gingiva in a Dog. *Journal of Veterinary Medical Science*. 60(7), 863–5. doi:10.1292/jvms.60.863
- Kasuga T, Taylor J, White T. 1999. Phylogenetic relationships of varieties and geographical groups of the human pathogenic fungus *Histoplasma capsulatum* Darling. *Journal of Clinical Microbiology*. 37(3):653-63.
- Kasuga T, White TJ, Koenig G, Mcewen J, Restrepo A, Castañeda E, Da Silva Lacaz C, Heins-Vaccari EM, de Freitas RS, Zancopé-Oliveira RM, Qin Z, Negroni R, Carter DA, Mikami Y, Tamura M, Taylor ML, Miller GF, Poonwan N, Taylor JW. 2003. Phylogeography of the fungal pathogen *Histoplasma capsulatum*. *Molecular Ecology*. 12(12), 3383-401. doi:10.1046/j.1365-294X.2003.01995.x
- Kauffman CA. 2007. Histoplasmosis: a clinical and laboratory update. *Clinical Microbiology Reviews*. 20(1):115-32.
- Kwon-Chung KJ, Bennett JE, 1992. Infections due to Trichosporon and other miscellaneous yeast-like fungi. *Medical Mycology*. Malvern: Lea & Febiger, pp. 768-82.
- López CE. 2006. Dimorfismo y patogenia de *Histoplasma capsulatum*. *Revista Argentina de Microbiología*. 38:235-42
- Meadows RL, MacWilliams PS, Dzata G, Delauche AJ. 1992. Diagnosis of histoplasmosis in a dog by cytologic examination of CSF. *Veterinary Clinical Pathology*. 21(4), 122-4. doi:10.1111/j.1939-165X.1992.tb00598.x

- Martagon-Villamil J, Shrestha N, Sholtis M, Isada CM, Hall GS, Bryne T, Lodge BA, Reller LB, Procop GW. 2003. Identification of *Histoplasma capsulatum* from culture extracts by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 41(3):1295-8.
- Maubon D, Simon S, Aznar C. 2007. Histoplasmosis diagnosis using a polymerase chain reaction method. Application on human samples in French Guiana, South America. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 58(4):441-4.
- Mitchell M, Stark DR. 1980. Disseminated canine histoplasmosis: a clinical survey of 24 cases in Texas. *The Canadian Veterinary Journal*. 21(3):95-100.
- Morales-Ruiz J. Histoplasmosis. 2010. *Revista de la Facultad de Medicina*. 4(3):1-3.
- Morgan RV, Bright RM, Swartout MS. Micosis sistémicas - Histoplasmosis. En: Morgan RV, 2004. *Clínica de pequeños animales*. 4º Ed. Madrid: Elsevier, pp. 1079-81.
- Muñoz B, Martínez MA, Palma G, Ramírez A, Frías MG, Reyes MR, Taylor ML, Higuera AL, Corcho A, Manjarre ME. 2010. Molecular characterization of *Histoplasma capsulatum* isolated from an outbreak in treasure hunters. *BMC Infectious Diseases*. 10:264.
- Nishifuji K, Ueda Y, Sano A, Kadoya M, Kamei K, Sekiguchi M, Nishimura K, Iwasaki T. 2005. Interdigital involvement in a case of primary cutaneous canine histoplasmosis in Japan. *Journal of Veterinary Medicine. A, Physiology, Pathology, Clinical Medicine*. 52:478-80.
- Okudaira M, Straub M, Schwarz J. 1962. The histologic features of the histoplasmin skin test in dogs. *American Journal of Pathology*. 40:721-7.
- Peterson PB, Willard MD. 2003. Protein-losing enteropathies. *Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice*. 33(5):1061-82.
- Peterson SW, Sigler L. 1998. Molecular genetic variation in *Emmonsia crescens* and *Emmonsia parva*, etiologic agents of adiaspiromycosis, and their phylogenetic relationship to *Blastomyces dermatitidis* (*Ajellomyces dermatitidis*) and other systemic fungal pathogens. *Journal of Clinical Microbiology*. 36:2918-25.
- Porta A, Colonna-Romano S, Callebaut I, Franco A, Marzullo L, Kobayashi GS, Maresca B. 1999. An homologue of the human 100-kDa protein (p100) is differentially expressed by *Histoplasma capsulatum* during infection of murine macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 254(3):605-13.
- Prior JA, Cole CR, Torbet V. 1949. An evaluation of the histoplasmin reaction in the detection of naturally occurring histoplasmosis in dogs. *Public Health Reports*. 64(48):1562-6.
- Reed N, Gunn-Moore D, Simpson K. 2007. Cobalamin, folate and inorganic phosphate abnormalities in ill cats. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 9(4):278-88.
- Reginato A, Giannuzzi P, Ricciardi M, De Simone A, Sanguinetti M, Porcellato I, Mandara MT. 2014. Extradural spinal cord lesion in a dog: first case study of canine neurological histoplasmosis in Italy. *Veterinary Microbiology*. 170(3-4), 451-5. doi:10.1016/j.vetmic.2014.02.024
- Rippon JW, 1988. *Medical Mycology*. Philadelphia: WB Saunders Company, pp. 154-275.
- Rochat MC, Crystal MA. 1999. Challenging cases in internal medicine (what's your diagnosis? Osteomyelitis caused by histoplasmosis in a cat). *Veterinary Medicine*. 94:520-527.
- Sánchez-Alemán MA. 2009. Histoplasmosis, la micosis del viajero. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología*. 29:5.
- Schaer M. *Enfermedades Infecciosas - Histoplasmosis*. En: Schaer M, 2006. *Medicina clínica del perro y el gato*. 8º Ed. Madrid: Ed Elsevier, p. 52.
- Scheel CM, Samayoa B, Herrera A, Lindsley MD, Benjamin L, Reed Y, Hart J, Lima S, Rivera BE, Raxcaco G, Chiller T, Arathoon E, Gómez BL. 2009. Development and evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay to detect *Histoplasma capsulatum* antigenuria in immunocompromised patients. *Clinical and Vaccine Immunology*. 16(6):852-8.
- Schumacher LL, Love BC, Ferrell M, De Silva U, Fernando R, Ritchey JW. 2013. Canine intestinal histoplasmosis containing hyphal forms. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 25(2):304-7.
- Simon S, Verón V, Boukhari R, Blanchet D, Aznar C. 2010. Detection of *Histoplasma capsulatum* DNA in human samples by real-time polymerase chain reaction. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*. 66(3):268-73.
- Stark DR. 1982. Primary gastrointestinal histoplasmosis in a cat. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 18:154-156.
- Swartzentruber S, Rhodes L, Kurkjian K, Zahn M, Brandt ME, Connolly P, Wheat LJ. 2009. Diagnosis of acute pulmonary histoplasmosis by antigen detection. *Clinical Infectious Disease*. 49:1878-82.
- Taylor AR, Barr JW, Hokamp JA, Johnson MC, Young BD. 2012. Cytologic diagnosis of disseminated histoplasmosis in the wall of the urinary bladder of a cat. *Journal of the American Animal Hospital Association*. 48(3):203-8.
- Toranzo AI, Tiraboschi IN, Fernández N, Ibarra-Camou B, Rivas MC, Lee W, Davel G, Canteros CE. 2009. Diagnóstico molecular de histoplasmosis humana en muestras de sangre entera. *Revista Argentina de Microbiología*. 41:20-6.
- Vite-Garín T, Estrada-Bárceñas DA, Cifuentes J, Taylor ML. 2014. The importance of molecular analyses for understanding the genetic diversity of *Histoplasma capsulatum*: an overview. *Revista Iberoamericana de Micología*. 31(1). doi:10.1016/j.riam.2013.09.013
- Wheat L. 2006. Histoplasmosis: a review for clinicians from non-endemic areas. *Mycoses*. 49(2006):274-82.
- Wheat LJ, Conces D, Allen SD, Blue-Hnidy D, Loyd J. 2004. Pulmonary histoplasmosis syndromes: recognition, diagnosis, and management. *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 25(2):129-44.
- Wheat LJ, Kauffman CA. 2003. Histoplasmosis. *Infectious Disease Clinics of North America*. 17(1):1-19, vii.
- Wheat LJ, Kohler RB, Tewari RP. 1986. Diagnosis of disseminated histoplasmosis by detection of *Histoplasma capsulatum* antigen in serum and urine specimens. *The New England Journal of Medicine*. 314(2):83-8.
- Woods JP. 2003. Knocking on the right door and making a comfortable home: *Histoplasma capsulatum* intracellular pathogenesis. *Current Opinion in Microbiology*. 6(4):327-31.

# Uso de la técnica de micromatrices de tejido en histología veterinaria

## Use of tissue microarrays in veterinary histology

Sanz Ressel BL<sup>1,2\*</sup>, Massone AR<sup>3</sup>, Barbeito CG<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Histología y Embriología Descriptiva, Experimental y Comparada, Facultad de Ciencias Veterinarias (FCV), Universidad Nacional de La Plata (UNLP); <sup>2</sup>FCV, CONICET, UNLP, La Plata, Argentina;

<sup>3</sup>Laboratorio de Patología Especial Veterinaria Dr. B. Epstein, FCV, UNLP.

\*Correo electrónico del autor: [lsanzressel@fcv.unlp.edu.ar](mailto:lsanzressel@fcv.unlp.edu.ar)

**Resumen:** Las micromatrices de tejido son plataformas de alto rendimiento que permiten el análisis de decenas a cientos de muestras de tejidos en forma simultánea. Estas se han utilizado, en especial, para analizar tejidos neoplásicos. Sin embargo, los beneficios de su aplicación pueden ser aprovechados en otras áreas de investigación, como la embriología y la histología. El presente trabajo explora el uso de la técnica de micromatrices de tejido para el análisis morfológico y molecular de tejidos animales normales. Un total de 82 muestras de piel canina normal prenatal y posnatal fueron utilizadas para construir la matriz. A partir de ésta, se obtuvo una gran cantidad de secciones en las que se aplicaron técnicas de histología convencional y de inmunohistoquímica. Los resultados nos muestran la eficacia de la técnica para realizar el análisis morfológico y molecular de decenas de muestras de tejido normal en forma simultánea. Esto permite la evaluación más estandarizada de los tejidos, reduciendo así la variabilidad que puede ocurrir cuando se realizan ensayos sobre muestras individuales.

**Palabras clave:** micromatrices de tejido, inmunohistoquímica, piel, caninos

**Abstract:** Tissue microarrays are platforms for high throughput simultaneous analysis of tens to hundreds of tissue samples. They have been used especially to analyze neoplastic tissues. However, the advantages of this technique could be applied to other research areas such as embryology and histology. This study explores the use of tissue microarrays for morphological and molecular analysis of normal tissues from animals. A total of 82 samples of normal skin from prenatal and postnatal dogs were selected and used to construct the array. A large number of sections from this array block were obtained and routine stain and immunohistochemistry techniques were applied. The results show the effectiveness of the technique for morphological and molecular analysis of a large number of normal tissue samples simultaneously. This allows the standardized assessment of tissues, thus reducing the variability that can occur when testing is performed on individual samples.

**Key words:** tissue microarrays, immunohistochemistry, skin, dogs

## Introducción

Las micromatrices de tejidos incluidos en parafina (MMsT) son plataformas de alto rendimiento que permiten el análisis de múltiples muestras de tejidos en forma simultánea (Hewitt 2004). Estas plataformas se construyen mediante la obtención de biopsias cilíndricas a partir de decenas a cientos de bloques de parafina donantes, las cuales son reincorporadas en un único bloque de parafina receptor (Kononen *et al.* 1998). Por lo tanto, una sección obtenida a partir de esta matriz contiene pequeñas muestras de tejido representativas de los diferentes casos, sobre la cual se pueden aplicar las mismas técnicas que se usarían sobre una sección de tejido convencional en un portaobjetos, como por ejemplo la inmunohistoquímica (IHQ) (Hewitt 2004; Kononen *et al.* 1998).

Una micromatriz de tejidos (MMT) bien diseñada permite ahorrar tiempo y materiales, así como también facilita el análisis simultáneo de dianas moleculares en condiciones idénticas y estandarizadas sobre muestras múltiples, reduciendo la variabilidad de los experimentos al evitar la necesidad de realizarlos una y otra vez (Hewitt 2004). Por ejemplo, una sola inmunotinción puede proporcionar información valiosa sobre todas las muestras que se encuentran sobre el portaobjetos en forma simultánea, mientras que las secciones posteriores de la matriz pueden ser utilizadas para analizar otros anticuerpos (Molinolo *et al.* 2007). Estas ventajas llevaron a que la aplicación de esta técnica surja como una herramienta esencial en el campo de la oncología, en la que ha permitido la detección rápida y rentable de biomarcadores de utilidad diagnóstica, pronóstica y predictiva (Hewitt 2009; Hewitt 2012; Kononen *et al.* 1998).

Aunque la técnica de MMsT fue descrita inicialmente para la investigación del cáncer y se utiliza principalmente en este campo, la posibilidad de su aplicación se ha ampliado hacia otras áreas de investigación (Avninder *et al.* 2008). Así, sus beneficios pueden ser aprovechados en estudios en los que se trabaje, por ejemplo, con múltiples muestras de tejido normal (Kononen *et al.* 1998), como la embriología y la histología. En estas áreas, la técnica de MMsT surge como una alternativa atractiva para la investigación de aspectos morfológicos y funcionales, dado que, para realizar un aporte de relevancia es indispensable contar con una gran cantidad de muestras en las que se realicen los análisis en forma estandarizada.

El presente trabajo explora por primera vez el uso de la técnica de MMsT en el estudio de la piel canina durante el desarrollo ontogénico, a partir de una gran cantidad de muestras provenientes de diferentes regiones corporales de fetos y adultos.

## Materiales y métodos

### Micromatriz de tejido

Se tomaron muestras de piel a partir de distintas regiones corporales (dorso, flanco, vientre, dedo, plano nasal, pabellón auricular y, en los machos, escroto) de fetos y adultos caninos. Las muestras de fetos provinieron de histerectomías realizadas por médicos veterinarios de actividad privada y, las de animales adultos, de caninos ingresados al Servicio de Anatomía Patológica de la Facultad de Ciencias Veterinarias (Universidad Nacional de La Plata). Las muestras fueron procesadas para su inclusión en parafina y su posterior coloración con la técnica de hematoxilina y eosina (H-E). Luego de la observación de las secciones coloreadas con H-E, un total de 82 bloques de parafina conteniendo los tejidos de interés (bloques donantes) fueron seleccionados para la posterior construcción de la MMT. Cuatro bloques de parafina adicionales, conteniendo muestras correspondientes a otros órganos, fueron seleccionados para ser incluidos como controles en la matriz.

El método utilizado en la construcción de la MMT fue el descrito por Hewitt (2004), utilizando un *arrayer* de tejido semiautomático (TM Arrayer™, Pathology Devices, Inc.) y un diámetro de cilindro (núcleo) de 1 mm. Sobre cada una de las secciones coloreadas con H-E, correspondiente a cada bloque donante, se procedió a la marcación de las áreas de tejido de interés utilizando un marcador indeleble bajo observación microscópica. Luego, se ordenó cada bloque donante con su sección correspondiente para la posterior construcción de la matriz. Un bloque de parafina receptor fue construido utilizando un molde específico y parafina bajo punto de fusión. El bloque de parafina receptor se colocó entonces en el *arrayer* de tejido y se procedió a la construcción de la MMT. Sobre un soporte específico se ubicó el bloque donante y sobre éste la sección coloreada con H-E correspondiente. El conjunto formado por soporte-bloque donante-sección coloreada con H-E se alineó de forma tal que el área de interés marcada sobre el portaobjetos se ubicara debajo de la aguja de perforación. Se retiró el portaobjetos y se procedió a la obtención de una biopsia cilíndrica (núcleo) a partir del bloque de parafina donante. Se retiró el soporte que contenía el bloque donante y se procedió a reinsertar el núcleo contenido en la aguja de perforación en el bloque de parafina receptor. Este procedimiento se repitió con cada uno de los bloques donantes. Una vez finalizada la inserción de los núcleos de interés, se colocó la MMT en una estufa a 37 °C durante 10 min y se presionó su superficie. Este último procedimiento se repitió tres veces. Finalmente, se realizó el templado de la MMT en una estufa a 37 °C. Una vez concluida la MMT, se obtuvieron secciones que se colorearon

con H-E para realizar un análisis general de la matriz y evaluar su calidad.

### **Inmunohistoquímica**

Se utilizaron dos secciones de la MMT para la aplicación de la técnica de IHQ utilizando un anticuerpo específico anti  $\beta$ -catenina ( $\beta$ -Catenin D10A8XP™ Rabbitm Ab #8480; CellSignaling Technologies; dilución 1:100).

Los portaobjetos que contenían las secciones de la MMT se colocaron en una estufa a 65 °C durante 30 min para fundir la parafina, se sumergieron en Safeclear II (Fisher Scientific) para el desparafinado durante 5 min (tres veces) y se hidrataron mediante pasajes sucesivos en alcoholes de graduación decreciente. Para bloquear la peroxidasa endógena se incubaron en peróxido de hidrógeno al 3% en alcohol 70° durante 30 min y se lavaron con agua destilada durante 5 min, tres veces. Para la recuperación antigénica, los portaobjetos se colocaron en un recipiente que contenía ácido cítrico 10 mM en un horno de microondas durante 20 min (2 min a 100% de potencia y 18 min a 20% de potencia). Los portaobjetos se dejaron enfriar durante 15 min a temperatura ambiente, se lavaron una vez con agua destilada y luego tres veces con PBS. Las secciones se incubaron en solución de bloqueo (albúmina sérica bovina al 2,5% en PBS) durante 30 min a temperatura ambiente. El exceso de solución se descartó y las secciones se incubaron con el anticuerpo primario diluido en solución de bloqueo a 4 °C durante la noche. Después de lavar con PBS, los portaobjetos se incubaron secuencialmente con el anticuerpo secundario biotinilado (Biotinylated Goat Anti-Rabbit IgG Antibody; BA-1000; Vector Laboratories; 1: 400) durante 30 min y luego con el complejo avidina-biotina (VECTASTAIN® Elite® ABC Kit; PK-6100; Vector Laboratories) durante 30 min a temperatura ambiente. Los portaobjetos se lavaron y se revelaron con 3,3'-diaminobencidina (SIGMA-FAST™ 3,3'-Diaminobenzidine tablets; D4168-50SET; Sigma Chemical) bajo control microscópico. La reacción se detuvo con agua destilada y los tejidos se contrastaron con hematoxilina de Mayer, para luego continuar con el deshidratado y montado. El anticuerpo utilizado fue probado previamente en muestras de piel canina normal para confirmar su reactividad en la especie, así como también, para establecer las condiciones óptimas para su uso.

## **Resultados**

### **Diseño y construcción de la matriz**

Un total de 110 muestras de piel canina normal fueron obtenidas y procesadas. Luego de la observación de las secciones coloreadas con H-E, se selec-

cionaron 82 muestras para la posterior construcción de la MMT. La causa más común de exclusión fue la mala fijación del tejido.

Dado que las muestras eran en general pequeñas y morfológicamente homogéneas, fue sencillo marcar en las secciones coloreadas con H-E las zonas precisas de los bloques donantes desde donde la aguja de perforación podría obtener los tejidos. El tiempo empleado para llevar a cabo esta selección fue de aproximadamente 3 horas, mientras que el necesario para llevar a cabo el diseño y construcción de la MMT fue de aproximadamente 6 horas. Los casos fueron distribuidos en la matriz teniendo en cuenta su edad de desarrollo, dejando los controles en el margen inferior derecho. En la figura 1 (A) se muestra la MMT finalizada.

En las secciones obtenidas a partir de la MMT sobre las que se aplicó la técnica de H-E para realizar un análisis general de la matriz y evaluar su calidad, se confirmó la presencia de los tejidos de interés (epidermis, dermis y tejido subcutáneo) en todos los núcleos. Las sucesivas secciones de la matriz obtenidas a diferentes profundidades presentaron características tisulares similares entre sí, comparables a las que se obtendrían trabajando con los bloques de parafina convencionales. Asimismo, después de la aplicación de la técnica de H-E se observó una mínima pérdida de los núcleos con los tejidos de interés, siendo esta de 2 o 3 núcleos en cada sección. Los resultados de la aplicación de la técnica de H-E sobre una sección de la MMT se muestran en la figura 1 (B y C). Por último, se realizó la comparación de las secciones coloreadas con H-E obtenidas a partir de la matriz con las respectivas secciones completas provenientes de los bloques de parafina donantes, observándose una concordancia de tejido entre los núcleos de la matriz con las respectivas secciones completas en todos los casos (Figura 2).

### **Inmunohistoquímica**

En las secciones obtenidas a partir de la MMT sobre las que se realizó IHQ para evaluar la expresión de  $\beta$ -catenina se observó una intensa marcación en las células de la epidermis, así como también en el folículo piloso y en las células de las glándulas sebáceas y sudoríparas apocrinas. Esta expresión tuvo una distribución citoplasmática y de membrana. Por otra parte, se realizó la comparación de la expresión de  $\beta$ -catenina obtenida en las secciones de la matriz con algunas secciones completas provenientes de los bloques de parafina donantes, observándose una concordancia en la marcación entre los núcleos de la matriz con las respectivas secciones completas en los casos analizados. Asimismo, la calidad de los diferentes núcleos de tejido fue en general buena

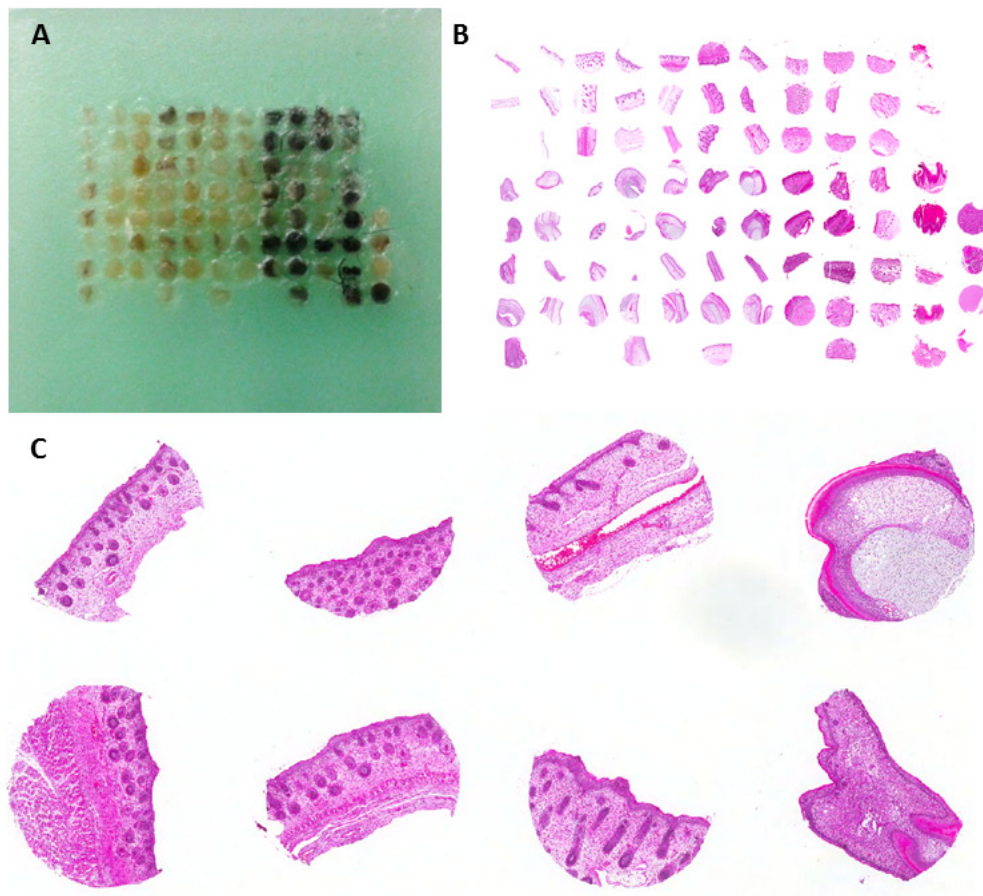


Figura 1. Micromatriz de tejidos construida a partir de muestras de piel canina normal. (A) Imagen de la micromatriz de tejido finalizada, conteniendo los núcleos de 1 mm de diámetro obtenidos a partir de muestras de piel canina normal prenatal y posnatal. (B) Sección de la MMT coloreada con H-E. (C) Imágenes correspondientes a algunos núcleos representativos de la matriz para mostrar la calidad de los mismos. Objetivo 2x.

tras la aplicación de IHQ, observándose una mínima pérdida de los mismos (2-3 núcleos). Ejemplos de los resultados de la aplicación de esta técnica se muestran en la figura 3.

## Discusión

El uso de la técnica de MMST brinda una serie de beneficios cuando se desea trabajar con grandes colecciones de tejido. La posibilidad de incluir en un único bloque de parafina decenas a cientos de muestras permite no solo ahorrar tiempo y materiales, sino también reducir la variabilidad de los experimentos que se realicen posteriormente (Hewitt 2004; Molinolo *et al.* 2007). El principal beneficio observado fue la reducción notable en el tiempo y la cantidad de materiales necesarios para el desarrollo de la técnica de IHQ. Esto se debe a que en una sola inmunotinción se pudo obtener información de las 82 muestras de piel que se encontraban sobre el portaobjetos en forma simultánea. Si esta técnica se hubiese aplicado

sobre las secciones completas, no sólo se hubiesen incrementado los costos y materiales necesarios para su desarrollo, dado que 82 secciones hubiesen sido necesarias, sino que además no hubiese sido posible la aplicación de la técnica de IHQ en forma simultánea para esta cantidad de muestras.

La técnica de MMST presenta algunas limitaciones cuando se utilizan tejidos neoplásicos para su construcción, dado que cada núcleo representa una pequeña fracción de la lesión (Kononen *et al.* 1998). Así, en las matrices construidas a partir de este tipo de tejidos, las secciones tomadas a diferentes profundidades muestran características ligeramente diferentes o, como sucede en algunos casos, la ausencia total de tejido tumoral en algunos núcleos cuando se alcanzan los límites no neoplásicos (Molinolo *et al.* 2007). En este estudio, observamos que las MMST construidas a partir de tejidos normales no presentan esta limitación. Las sucesivas secciones coloreadas con H-E obtenidas a diferentes profundidades de la matriz presentaron características tisulares similares entre

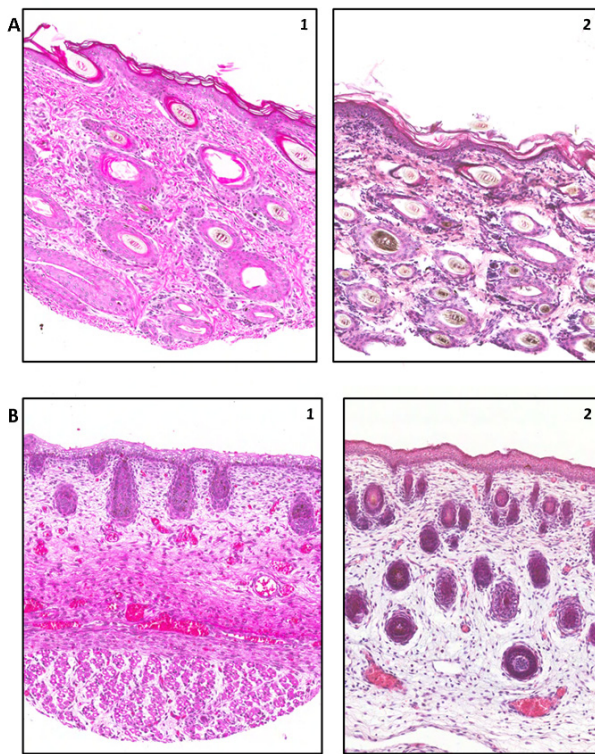


Figura 2. Imágenes representativas de secciones de la MMT coloreadas con H-E y su correlación con las imágenes correspondientes a las secciones completas. (A) Imágenes correspondientes a piel de la región del dorso de un canino neonato: (1) núcleo de la MMT y (2) sección convencional. Objetivo 10x. (B) Imágenes correspondientes a piel de la región del dorso de un canino de 50 días de gestación: (1) núcleo de la MMT y (2) sección convencional. Objetivo 10X.

sí, comparables a las que se obtendrían trabajando con los bloques de parafina convencional.

Para evaluar la viabilidad del uso de la técnica de MMST para estudiar las complejas redes de señalización involucradas en el desarrollo de la piel canina normal, se procedió a la utilización de técnicas de IHQ sobre secciones obtenidas a partir de la MMT. El anticuerpo seleccionado fue anti  $\beta$ -catenina debido a que ha sido establecida previamente como una molécula relevante en el desarrollo de la piel normal en los caninos (Bongiovanni *et al.* 2011). En las secciones obtenidas a partir de la MMT se observó una intensa expresión citoplasmática y de membrana de  $\beta$ -catenina en los distintos núcleos de tejido. Este patrón de marcación fue similar al encontrado utilizando la técnica de inmunohistoquímica sobre secciones completas, lo cual indica que la técnica de MMST resulta de utilidad para detectar el nivel de expresión de esta molécula sobre muestras múltiples.

Aunque la técnica de MMST ha sido ampliamente utilizada para la evaluación inmunohistoquímica de

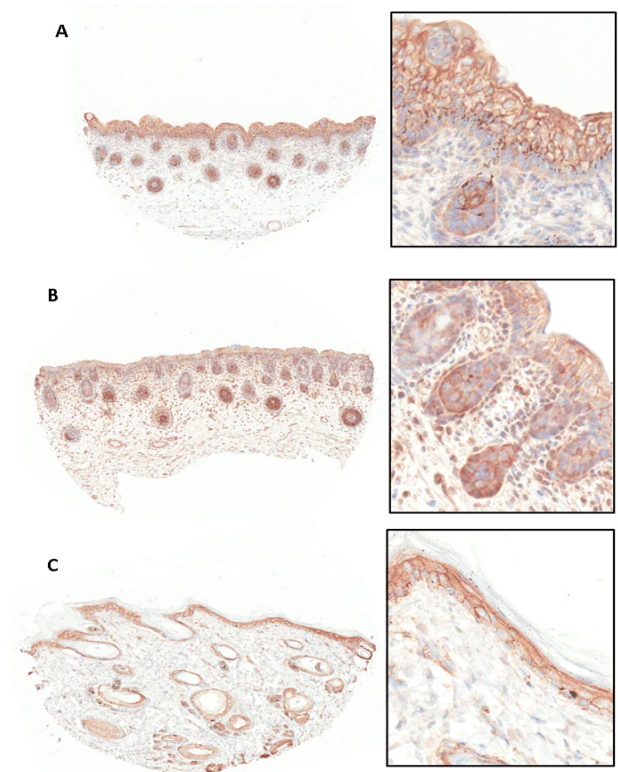


Figura 3. Imágenes representativas de la aplicación de IHQ para la marcación de  $\beta$ -catenina sobre secciones de la MMT. (A) Imágenes correspondientes a piel de la región del dorso de un canino de 45 días de gestación. (B) Imágenes correspondientes a piel de la región del dorso de un canino de 50 días de gestación. (C) Imágenes correspondientes a piel de la región del dorso de un canino neonato. En los recuadros se muestran imágenes de (A), (B) y (C), respectivamente, con objetivo 40X.

muestras de tejidos en medicina humana, y a pesar de que los tejidos animales son ampliamente utilizados para su construcción en investigación (Braunschweig *et al.* 2005), existen relativamente pocos informes sobre su uso en medicina veterinaria, estando estos restringidos al campo de la oncología (Buishand *et al.* 2014; Hammer *et al.* 2007; Higgins *et al.* 2010; Keller *et al.* 2007; Khanna *et al.* 2002; Muscatello *et al.* 2015; Wohlsein *et al.* 2012). El presente estudio es, según nuestro conocimiento, el primero en validar el uso de MMST en investigación en áreas básicas de medicina veterinaria, como son la embriología y la histología. Así, la técnica de MMST surge como una alternativa viable cuando se desea realizar un estudio ontogénico de un órgano como la piel canina, dado que es imprescindible disponer de decenas a cientos de muestras en las que aspectos morfológicos y funcionales puedan ser evaluados en forma simultánea.

Este trabajo podrá profundizarse mediante un análisis morfológico exhaustivo y la aplicación de técnicas de IHQ que permitan detectar moléculas implica-



das en las distintas vías de señalización involucradas en el desarrollo de la piel canina normal. Esto no solo resultará de utilidad para entender la naturaleza de los mecanismos del desarrollo normal, sino que también podrán ser relevantes en el área de patología, para comprender los mecanismos desregulados que subyacen al desarrollo de enfermedades originadas en este órgano en el adulto.

## Agradecimientos

Agradecemos especialmente al Dr. Alfredo Molinolo, al Dr. Stephen Hewitt y a su equipo de trabajo por su colaboración en el presente estudio.

## Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, relaciones financieras, personales o de otro tipo con personas u organizaciones que pudieran afectar al presente trabajo.

## Bibliografía

- Avninder S, Ylaya K, Hewitt SM. 2008. Tissue microarray: a simple technology that has revolutionized research in pathology. *Journal of postgraduate medicine*. 54(2):158-62.
- Bongiovanni L, Malatesta D, Brachelente C, D'Egidio S, Della Salda L. 2011.  $\beta$ -catenin in canine skin: immunohistochemical pattern of expression in normal skin and cutaneous epithelial tumours. *Journal of comparative pathology*. 145(2-3):138-47.
- Braunschweig T, Chung JY, Hewitt SM. 2005. Tissue microarrays: bridging the gap between research and the clinic. *Expert review of proteomics*. 2(3):325-36.
- Buishand FO, Visser J, Kik M, Gröne A, Keesler RI, Briaire-de Bruijn IH, Kirpensteijn. 2014. Evaluation of prognostic indicators using validated canine insulinoma tissue microarrays. *Veterinary Journal*. 201(1):57-63.
- Hammer AS, Williams B, Dietz HH, Hamilton-Dutoit SJ. 2007. High-throughput immunophenotyping of 43 ferret lymphomas using tissue microarray technology. *Veterinary Pathology*. 44(2):196-203.
- Hewitt SM. 2004. Design, construction, and use of tissue microarrays. *Methods Molecular Biology*. 264:61-72.
- Hewitt SM. 2009. Tissue microarrays as a tool in the discovery and validation of tumor markers. *Methods Molecular Biology*. 520(8):151-61.
- Hewitt SM. 2012. Tissue microarrays as a tool in the discovery and validation of predictive biomarkers. *Methods Molecular Biology*. 823:201-14.
- Higgins RJ, Dickinson PJ, LeCouteur RA, Bollen AW, Wang H, Wang H, Corely LJ, Moore LM, Zang W, Fuller GN. 2010. Spontaneous canine gliomas: overexpression of EGFR, PDGFR $\alpha$  and IGF2 demonstrated by tissue microarray immunophenotyping. *Journal of Neurooncology*. 98(1):49-55.
- Khanna C, Prehn J, Hayden D, Cassaday RD, Caylor J, Jacob S, Bose SM, Hong SH, Hewitt SM, Helman LJ. 2002. A randomized controlled trial of octreotide pamoate long-

acting release and carboplatin versus carboplatin alone in dogs with naturally occurring osteosarcoma: evaluation of insulin-like growth factor suppression and chemotherapy. *Clinical Cancer Research*. 8(7); 2406-12.

Keller SM, Keller BC, Grest P, Börger CT, Guscetti F. 2007. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical analyses of canine lymphomas. *Journal of veterinary diagnostic investigation*. 19(6):652-9.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. 1998. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature Medicine*. 4(7):844-7.

Molinolo AA, Hewitt SM, Amornphimoltham P, Keelawat S, Rangdaeng S, Meneses Garcia A, Raimondi AR, Jufe R, Itoiz M, Gao Y, Saranath D, Kaleebi GS, Yoo GH, Leak L, Myers EM, Shintani S, Wong D, Massey DH, Yeudall WA, Lonardo F, Ensley J, Gutkind JS. 2007. Dissecting the Akt/mammalian target of rapamycin signaling network: emerging results from the head and neck cancer tissue array initiative. *Clinical Cancer Research*. 13(17):4964-73.

Muscatello LV, Sarli G, Beha G, Asproni P, Millanta F, Poli A, De Tolla LJ, Benazzi C, Brunetti B. 2015. Validation of tissue microarray for molecular profiling of canine and feline mammary tumours. *Journal of Comparative Pathology*. 152(2-3):153-60.

Wohlsein P, Recker T, Rohn K, Baumgärtner W. 2012. Validation of usefulness of tissue microarray technology in primary tumours of the canine and feline central nervous system. *Journal of Comparative Pathology*. 146(4):320-6.

# Seroprevalencia de infección por el virus de leucosis bovina durante 2015 en rodeos de cría de la Zona Deprimida del Río Salado, provincia de Buenos Aires, Argentina

Seroprevalence of bovine leukosis virus infection during 2015 in breeding herds from *Zona Deprimida del Río Salado*, Province of Buenos Aires, Argentina

Panei CJ<sup>1,2\*</sup>, Tassara F<sup>3,4</sup>, Pérez Aguirreburualde MS<sup>5</sup>, Echeverría MG<sup>1,2</sup>, Galosi CM<sup>1,6</sup>, Torres A<sup>3</sup>, Silva HJE<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Cátedra de Virología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; <sup>2</sup>CONICET (Comisión Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas); <sup>3</sup>Ministerio de Agroindustria de la provincia de Buenos Aires; <sup>4</sup>Curso de Clínica y Sanidad en Rumiantes, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata; <sup>5</sup>Unidad de Epidemiología, Instituto de Patobiología, INTA, CICVyA, Castelar, Buenos Aires; <sup>6</sup>CIC (Comisión de Investigaciones Científicas de la provincia de Buenos Aires).

\*Correo electrónico del autor: [javierpanei@fcv.unlp.edu.ar](mailto:javierpanei@fcv.unlp.edu.ar)

**Resumen:** La leucosis enzoótica bovina (LEB) es una enfermedad crónica, linfoproliferativa y altamente contagiosa producida por el virus de la leucosis bovina (VLB). La sangre es una fuente importante de infección, principalmente en la práctica veterinaria, considerando que solo 5 microlitros son suficientes para infectar a un bovino en forma experimental. La Zona Deprimida del Río Salado (ZDRS) está formada por poco más de 6 millones de hectáreas con una cantidad de terneros que representa el 16,05 % de las existencias nacionales y el 34,03 % de las provinciales, convirtiéndose, de ese modo, en la principal zona criadora de terneros de Argentina. Los últimos estudios sobre seroprevalencia de infección por el VLB en rodeos de cría en la provincia de Buenos Aires se realizaron hace poco más de 20 años, obteniéndose valores inferiores al 2%. En este trabajo se analizaron un total de 1957 bovinos de cría provenientes de 90 establecimientos, representando poco más del 85 % de la superficie de la ZDRS, para determinar la presencia de anticuerpos contra el VLB mediante inmunodifusión en gel de agar, prueba utilizada en estudios epidemiológicos y en planes de erradicación de la enfermedad. La prevalencia en los establecimientos fue del 6,6 %, mientras que se obtuvo una seroprevalencia individual de 0,36 %. Debido a que la ZDRS es la de mayor productividad de terneros de cría en Argentina, es de sumo interés determinar la prevalencia de infección en esta región para establecer zonas libres de VLB.

**Palabras clave:** inmunodifusión en gel de agar, leucosis enzoótica bovina, Zona Deprimida del Río Salado

**Abstract:** Enzootic bovine leukemia (EBL) is a chronic, lymphoproliferative and highly contagious disease caused by the bovine leukemia virus (BLV). Blood is an important source of infection in veterinary practice; only 5 microliters are enough to infect a cow experimentally. The Zona Deprimida del Río Salado (ZDRS) is the main region of breeding calves in Argentina, covering more than 6 million hectares with 16 % and 34 % of the national and provincial calf stock, respectively. The latest reports of EBL prevalence in cow-calf farms in Buenos Aires province were performed more than 20 years ago with values lower than 2%. In this work, 1957 bovines from 90 cow-calf farms representing just over 85 % of the ZDRS were sampled to determine the presence of antibodies against BLV by agar gel immunodiffusion, a test used extensively in epidemiological studies, control and eradication of the disease. The prevalence in cow-calf farms was 6.6 % while the individual prevalence was 0.36 %. Since ZDRS is the main area of breeder calves production in Argentina, it is relevant to determine EBL prevalence in this region in order to detect EBL free zones.

**Key words:** agar gel immunodiffusion, enzootic bovine leukemia, Zona Deprimida del Río Salado

## Introducción

La leucosis enzoótica bovina (LEB) es una enfermedad crónica, linfoproliferativa y altamente contagiosa producida por el virus de la leucosis bovina (VLB). La LEB se puede presentar de tres formas diferentes: una forma asintomática aleucémica (AL), representada por un 65-70% de los animales positivos y caracterizada por una cantidad normal de linfocitos B en la circulación sanguínea, una forma de linfocitosis persistente (LP), representada por el 25-30% de los animales positivos y caracterizada por un aumento sostenido de la cantidad absoluta de linfocitos B en la sangre y una presentación linfoproliferativa tumoral en forma de linfosarcoma o linfoma maligno, representada por el 1-5% de los animales positivos, con la presencia de masas sólidas tumorales, infiltrando diferentes órganos y tejidos (Burny *et al.*, 1988).

La transmisión natural del virus se produce principalmente a través de las células infectadas con el provirus integrado (Mammerickx *et al.*, 1987), detectándose altas copias de estos provirus en diferentes subpoblaciones de linfocitos (Panei *et al.*, 2013). Por lo tanto, la sangre es una fuente importante de infección, principalmente en la práctica veterinaria (Hopkins & DiGiacomo 1997; Kohara, 2006; Mammerickx *et al.*, 1987), ya que solo cinco microlitros de sangre periférica inoculados por diferentes vías en forma experimental fueron suficientes para infectar a un bovino (González *et al.*, 2001). Asimismo, el uso de las mismas agujas y jeringas, instrumentos quirúrgicos y/o guantes de tacto en diferentes animales es una causa potencial de transmisión del VLB en los rodeos (Kohara *et al.*, 2006).

El control y la erradicación de la LEB se basan en la detección de animales seropositivos para VLB mediante diferentes pruebas inmunodiagnósticas. La prueba de inmunodifusión en gel de agar (IDGA) y la prueba de ELISA, son las oficiales y más utilizadas en los programas de control y erradicación de la enfermedad. La simplicidad en la realización, la fiabilidad y los bajos costos operativos para llevar a cabo la prueba de IDGA han sido determinantes en su elección en estudios epidemiológicos a nivel mundial. En nuestro país, mediante Resolución 337/94, el Servicio Nacional de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (SENASA) reglamentó el sistema de certificación de establecimientos libres de LEB. A partir de la aceptación voluntaria del productor, el mismo puede inscribir su rodeo en un esquema de certificación oficial que le otorgue y mantenga la condición libre de la enfermedad (de la Sota, 2005).

El área de influencia de la ZDRS abarca más de 6 millones de hectáreas. El stock de terneros representa el 16,05% de las existencias nacionales y el 34,03% de las provinciales, convirtiéndola en la

principal zona donde se crían terneros de Argentina.

Debido a que no se conocen datos oficiales sobre la situación epidemiológica de LEB en bovinos de cría en la ZDRS, el objetivo de este trabajo fue determinar la seroprevalencia de infección por VLB en esta región y compararla con las registradas en otras regiones del país.

## Materiales y métodos

Para el muestreo se utilizó la lista codificada de todos los establecimientos que integran la ZDRS. Se seleccionaron 90 establecimientos, cubriendo más del 85% de la región, con un total de 1957 bovinos. Las muestras fueron tomadas sobre la base de los resultados obtenidos con el programa estadístico ProMESA (*Programme for Statistical Sampling in Animal Population*) utilizando un nivel de confianza del 95% y un error relativo del 15%. Los animales fueron divididos en tres categorías: terneros entre 6 a 12 meses, vaquillonas entre 12 y 24 meses y adultos mayores de 24 meses.

De cada animal se extrajeron 10 ml de sangre sin anticoagulante de las venas yugular o coccígea media, utilizando agujas y jeringas individuales estériles. Una vez obtenido el suero, las muestras se transfirieron a tubos de 1,5 ml y se mantuvieron a -20°C.

Para la detección de anticuerpos contra el VLB se utilizaron equipos de IDGA producidos en el Laboratorio de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Este equipo cuenta con la aprobación de SENASA (Expte. SENASA 40285/87, Cert. 88494), prueba oficial para la certificación de animales libres del VLB.

## Resultados

Los resultados obtenidos de la lectura de las placas de IDGA demostraron que, de los 90 establecimientos, 6 presentaron al menos, un animal positivo a LEB, determinándose una prevalencia del 6,6%. Sin embargo, para un total de 1957 sueros, 7 animales pertenecientes todos a la categoría de bovinos mayores de 24 meses fueron positivos para LEB. Sobre la base de estos resultados se obtuvo una prevalencia poblacional del 0,36% (Tabla 1).

## Discusión

Diferentes estudios sobre seroprevalencia de infección por VLB se han llevado a cabo en varios países, sobre todo en aquellos que emplearon políticas de erradicación de la enfermedad. La prueba de IDGA, realizada en condiciones óptimas, es la técnica inmunológica más utilizada para el diagnóstico de LEB, debido a su bajo costo, fácil realización y elevada

Tabla 1. Seroprevalencia de infección por el virus de leucosis enzoótica bovina (LEB) en la Zona Deprimida del Río Salado (ZDRS)

Categoría de animales	Cantidad de animales por categoría	Animales positivos para VLB	Seroprevalencia de infección por el virus de LEB (%)
Terberos entre 6 y 12 meses	620	–	–
Vaquillonas entre 12 y 24 meses	410	–	–
Adultos mayores de 24 meses	927	7	0,75%
Total	1957	7	<b>0,36%</b>

especificidad. Sin embargo, esta técnica posee una sensibilidad media que la hace no muy adecuada para utilizar en estrategias de control de enfermedades de baja prevalencia (Trabattoni & Moriondo, 2016) en las que se sugiere el uso de una técnica más sensible como el ELISA (Furtado *et al.*, 2013; Nava *et al.*, 2012).

Los últimos estudios de prevalencia en rodeos de cría de la provincia de Buenos Aires se realizaron hace más de 20 años. Además, estos estudios incluyeron diferentes provincias del centro y del norte de Argentina, como Córdoba, Entre Ríos, Formosa y La Pampa: se encontró una prevalencia del 1,8%, con un rango de variabilidad entre el 0% para la provincia de La Pampa y el 9,7% para la provincia de Formosa (Huici *et al.*, 1997). La prevalencia en rodeos de cría en la Patagonia Argentina fue comunicada por Huici *et al.* (1995) y por Layana *et al.* (1997) y en Tierra del Fuego por Disalvo *et al.* (2016). Estos estudios revelaron valores del 0% de prevalencia, demostrando la ausencia de circulación viral en estas regiones. Reportes realizados por Resoagli *et al.* (2001) sobre prevalencia de LEB en los años 1998-1999 en el noroeste de la provincia de Corrientes mostraron una prevalencia del 11,8%, de un total de 1093 muestras analizadas. En el año 2004, en la provincia de la Pampa se encontró una prevalencia poblacional del 0,17% y el 10% de los rebaños analizados con, al menos, un animal positivo (Álvarez Rubianes, 2004). En 2016 Trabattoni y Moriondo encontraron una prevalencia total de 11,97% en un rodeo de cría del norte de la provincia de Santa Fe, porcentaje que fue reducido a 3,91% luego de la eliminación de animales positivos. Si bien existen informes de diferencias en la prevalencia según el tamaño de los rodeos estudiados (Grau & Monti, 2010), en este trabajo se carece de ese dato. Los resultados encontrados en nuestro trabajo, que incluyó el 85% de la superficie de la ZDRS, revelan que la prevalencia de infección por VLB en rodeos de cría se mantiene en el rango encontrado por Huici *et al.* (1997) demostrando que, en 20 años, no hubo

cambios significativos en la misma y, hasta nuestro conocimiento, sin haber tomado medidas tendientes a su eliminación.

## Conclusiones

Debido que la ZDRS es la región de mayor productividad de terneros de cría en Argentina, es de sumo interés determinar seroprevalencia para establecer zonas libres de LEB. Los resultados obtenidos permiten inferir el bajo impacto de la enfermedad en los rodeos de cría en la zona analizada.

## Agradecimientos

Se agradece la colaboración de los entes sanitarios de los partidos participantes en el muestreo y la asistencia técnica-administrativa de la Sra. Adriana Conde y del Sr. Claudio Leguizamón de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata. Este estudio fue subsidiado a través de un convenio firmado por el INTA y el Ministerio de Agroindustria de la provincia de Buenos Aires y también por la Secretaria de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de La Plata (Proyecto 11-V221 parte I y II).

## Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u instituciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

## Bibliografía

- Álvarez Rubianes N. 2004. Leucosis enzoótica bovina: estudios seroepidemiológicos en rebaños de cría de la provincia de La Pampa-Argentina. *Ciencias Veterinarias*. 6(1):1-12.
- Burny A, Cleuter Y, Kettmann R, Mammerickx M, Marbaix G, Portetelle D, VandenBroeke A, Willems L, Thomas R. 1988. Bovine leukaemia: facts and hypotheses derived from the study of an infectious cancer. *Veterinary Microbiology*. 17(3):197-218.
- De la Sota MD. 2005. Manual de procedimientos de leucosis enzoótica bovina. Dirección Nacional de Sanidad Animal. Buenos Aires. Disponible en: [www.intranet.senasa.gov.ar](http://www.intranet.senasa.gov.ar) [consultado 10/05/2016].
- Disalvo VN, Escribano C, Trono K. 2016. Diagnóstico serológico de leucosis enzoótica bovina en rodeos de cría de la provincia de Tierra del Fuego. *Boletín INTA*. 1-5. Disponible en: [www.inta.gov.ar/documentos/diagnostico-serologico-de-leucosis-enzootica-bovina-en-rodeos-de-cria-de-la-provincia-de-tierra-del-fuego](http://www.inta.gov.ar/documentos/diagnostico-serologico-de-leucosis-enzootica-bovina-en-rodeos-de-cria-de-la-provincia-de-tierra-del-fuego) [Consultado 01/01/2016].
- Furtado A, Rosadilla D, Franco G, Piaggio J, Puentes R. 2013. Leucosis bovina enzoótica en cuencas lecheras de productores familiares de Uruguay. *Veterinaria Montevideo*. 49(191):29-37.

González ET, Oliva GA, Valera A, Bonzo E, Licursi M, Etcheverrigaray ME. 2001. Leucosis enzoótica bovina: evaluación de técnicas de diagnóstico (ID, ELISA-I, WB, PCR) en bovinos inoculados experimentalmente. *Analecta Veterinaria*. 21(2):12-20.

Grau MA, Monti G. 2010. Prevalencia serológica predial e intrapredial para el virus de la leucosis bovina (VLB) en lecherías de las regiones de los ríos y de los lagos de Chile. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 42:87-91.

Hopkins SG, Di Giacomo RF. 1997. Natural transmission of bovine leukemia virus in dairy and beef cattle. *The Veterinary Clinics of North America. Food Animal Practice*. 13(1):107-28.

Huici NC, Segade G, Ramirez V, Gonzalez Gentile A. 1995. Diagnóstico serológico de leucosis enzoótica bovina en la Patagonia. *Veterinaria Argentina*. XII(115):303-5.

Huici N, Segade G, Ramírez V. 1997. Diagnóstico de leucosis enzoótica bovina en un rodeo carnívero de exportación: 1989-1994. *Veterinaria Argentina*. 14(131):26-31.

Kohara J, Konnai S, Onuma M. 2006. Experimental transmission of bovine leukemia virus in cattle via rectal palpation. *Japanese Journal of Veterinary Research*. 54(1):25-30.

Layana J, González N, Moreira AS, Vaghi CF. 1997. Encuesta serológica sobre brucelosis, leucosis y paratuberculosis bovinas en el Noroeste de la provincia de Río Negro, Argentina. *Veterinaria Argentina*. 14:83-90.

Mammerickx M, Portetelle D, De Clercq K, Burny A. 1987. Experimental transmission of enzootic bovine leukosis to cattle, sheep and goats: infectious doses of blood and incubation period of the disease. *Leukemia Research*. 11(4):353-8.

Nava Z, Obando C, Bracamonte M, Sousa A, Hidalgo M. 2012. Evaluación de la eficacia de la prueba de inmunodifusión en gel de agar para la detección de anticuerpos contra el virus de la leucosis enzoótica bovina. *Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la UCV*. 53(1):21-7.

Panei CJ, Takeshima SN, Omori T, Nunoya T, Davis WC, Ishizaki H, Matoba K, Aida Y. 2013. Estimation of bovine leukemia virus (BLV) proviral load harbored by lymphocyte subpopulations in BLV-infected cattle at the subclinical stage of enzootic bovine leukosis using BLV-CoCoMo-qPCR. *BMC Veterinary Research*. 4(9):95-102.

Resoagli JP, Jacobo RA, Storani CA, Cipolini, MF, Stamatti, GM, Deco M, Alfonso D. 2001. Seroprevalencia de leucosis enzoótica bovina en rodeos de cría de la provincia de Corrientes. *Revista de Medicina Veterinaria*. 82(2):71-3.

Trabattoni EM, Moriondo A. 2016. Leucosis bovina enzoótica en un rodeo de cría. *Veterinaria Argentina*. XXXIII(337):1-6.

# INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

## Política editorial y generalidades

Las opiniones expresadas por los autores que contribuyen con ANALECTA VETERINARIA no reflejan, necesariamente, las opiniones de este medio. Analecta Veterinaria autoriza la reproducción de sus artículos con fines académicos, con la única condición de la mención de la fuente cuando corresponda. El uso de nombres comerciales destinados a la identificación de productos en el contexto de los artículos presentados no implica respaldo directo o indirecto ni promoción de dichos productos por parte de la revista.

El Comité Editorial de ANALECTA VETERINARIA tiene en consideración el tratamiento ético de los animales de experimentación y se reserva el derecho de no publicar trabajos que no cumplan esta premisa. Los autores deberán poder certificar la aprobación de su proyecto de investigación por parte del comité de ética de su unidad académica, o consignar según qué normas nacionales o internacionales realizaron sus trabajos.

Todos los autores ceden a Analecta Veterinaria los derechos de autor de manera no exclusiva, se hacen responsables de los datos y el contenido, dejan constancia de que han participado activamente en el proceso de la investigación y/o la confección del trabajo, declaran un eventual conflicto de intereses, mencionan los soportes financieros y explicitan la aprobación por los comités institucionales y autoridades regulatorias que correspondan a cada caso.

No se asume responsabilidad editorial por la exactitud de las referencias. Es responsabilidad exclusiva de los autores asegurarse el permiso para citar datos no publicados. Eventualmente, los editores podrán requerir a los autores información probatoria.

Idiomas. Analecta Veterinaria acepta artículos en español o en inglés para su publicación. Los resúmenes de los artículos se publicarán en español y en inglés.

## Originalidad

La información contenida en el trabajo no deberá ser enviada a más de una revista o medio de comunicación al mismo tiempo y debe ser original. El envío de un artículo publicado en otro sitio por otro autor (plagio) o por el mismo autor (publicación duplicada) se considera falta ética grave que invalida su publicación en ANALECTA VETERINARIA.

## Tipos de trabajos para publicación.

Se aceptan envíos de: trabajos de investigación, trabajos de investigación en educación, comunicaciones cortas, descripciones de casos, informes técnicos, trabajos de revisión y (solamente por parte de organizadores) resúmenes de presentaciones en reuniones científicas (ver definiciones y características de cada tipo de trabajo en las "Instrucciones para la preparación del trabajo").

Los editores decidirán la prioridad de publicación de cada trabajo y la proporción de cada tipo, privilegiando aquellos de investigación. Otro tipo de contenidos, como por ejemplo resúmenes de comunicaciones en reuniones científicas, serán editados como parte de un suplemento. Los organizadores de las mencionadas reuniones deberán ponerse en contacto con los editores escribiendo a: [analecta@fcv.unlp.edu.ar](mailto:analecta@fcv.unlp.edu.ar)

Con respecto a la definición de la autoría, las responsabilidades de los editores y las causas que obran como posible conflicto de intereses, Analecta Veterinaria adhiere a lo propuesto por el International Committee of Medical Journal Editors (<http://www.icmje.org>).

En relación con otros aspectos, como el formato y el estilo de preparación del original, Analecta Veterinaria establece un conjunto de normas que se detallan en "Instrucciones para la preparación del trabajo".

Todas las dudas que se susciten podrán ser consultadas por correo electrónico a

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

## Instrucciones para la preparación del trabajo

Definición. El original para publicación del trabajo comprende: 1- un documento principal, y 2- otros archivos.

1- Documento principal: se trata de un archivo que contiene la página de presentación, las secciones del trabajo (que varían según su tipo), los agradecimientos, la declaración de conflicto de intereses, las referencias bibliográficas y las leyendas para las figuras. Este documento podrá tener algunos de los siguientes formatos: doc, docx o rtf.

2- Otros archivos: tablas, figuras, material complementario.

## Características generales

El idioma del trabajo puede ser el español o el inglés. Los trabajos escritos en inglés deberán seguir la gramática propia del inglés británico. Se aceptan otras variantes del idioma inglés, siempre que se respeten de manera uniforme en todo el trabajo. Las unidades de medida se expresarán según el Sistema Internacional de Medidas (documento disponible para su descarga). Las abreviaturas deberán ser aclaradas la primera vez que el término se mencione, pero no será necesaria su utilización si el término se menciona menos de cinco veces. Si el trabajo requiere el uso de numerosas abreviaturas (más de diez) deberá generarse una lista que se incluirá luego de los resúmenes. Ciertas siglas, acrónimos y abreviaturas (ATP, ADN, ELISA, OMS, PBS, Dr., n°. , entre otras) no requieren aclaración.

Para la denominación de sustancias, agentes biológicos de enfermedad, términos anatómicos, etc., se seguirán las recomendaciones de las nóminas y consensos vigentes para la especialidad correspondiente. Los productos comerciales deberán ser identificados mediante el símbolo de marca registrada consignando, además, los nombres genéricos de los componentes principales. Si la mención se efectúa en el apartado Materiales y Métodos deberán consignarse, además, el nombre y la dirección del fabricante (ciudad, país). Los nombres científicos de categoría genérica o inferior se escribirán en cursivas.

1- Documento principal

1.1. Formato general del documento (común a todo tipo de trabajos)

El documento se configurará en papel A4, con márgenes de 3 cm como mínimo por lado y 1,5 de interlineado. El texto deberá alinearse en los márgenes izquierdo y derecho (texto justificado). Se utilizará el tipo de fuente Times New

Roman de 12 puntos. Las páginas deberán estar numeradas, utilizando números arábigos en su ángulo inferior derecho. Asimismo, las líneas deberán estar numeradas a lo largo de todo el documento de manera consecutiva, comenzando en la primera página o página de presentación. El uso de guiones automáticos de separación de palabras en sílabas estará permitido exclusivamente para los resúmenes de congresos (publicados por sus organizadores).

1.2. Otras características comunes a todo tipo de trabajos

1.2.1. Primera página o página de presentación: contendrá el título del trabajo en dos idiomas, los autores y su respectiva filiación/lugar de trabajo, la dirección electrónica de todos los autores, los datos completos del autor de contacto y el título abreviado. Los autores deberán consignar, en lo posible, direcciones de correo oficial (institucional).

De ser necesario, la página de presentación podrá sobrepasar una página de extensión.

1.2.2. Páginas segunda y tercera: contendrán los resúmenes y las palabras clave.

1.2.3. Páginas sucesivas: contendrán el texto (organizado en secciones, según tipo de trabajo), los agradecimientos, la declaración de conflicto de intereses, las referencias bibliográficas y las leyendas para las figuras.

1.2.1 Primera página: página de presentación

-Título del trabajo. Se escribirá con la inicial en mayúscula (tipo oración) y en negrita, centrado, con fuente Times New Roman y tamaño de fuente 14. Será conciso, pero suficientemente informativo. No contendrá abreviaturas. Se dejará un espacio de interlineado y luego se consignará el título en inglés (o en español, si el artículo estuviera escrito en inglés), con las mismas características tipográficas.

-Nombres de los autores. Se dejará un espacio después del título en el segundo idioma. Se escribirá primero el apellido y luego las iniciales de los nombres, sin puntos. Se continuará listando el resto de los autores, separándolos entre sí por comas. Se colocarán números con formato de superíndice para indicar la filiación institucional.

-Filiación institucional/Lugar de trabajo. Se consignará a renglón seguido de los apellidos de autores. En primer término, se deberá indicar la unidad de investigación (Cátedra, grupo de trabajo, Laboratorio, Instituto). Luego, la Facultad u otra institución de la que depende y la Universidad u organismo superior. En caso de tratarse de un profesional de actividad en el ámbito privado se consignará "Profesional independiente".

El autor de contacto será identificado con un asterisco.

-Título abreviado. Se escribirá en el mismo idioma que el trabajo, luego de la filiación institucional, dejando un espacio. Consistirá en un título corto, de 45 caracteres o menos, incluyendo espacios.

-Datos personales.

Por debajo del título abreviado se consignarán todos los datos correspondientes al autor de contacto: nombre completo, dirección postal laboral y electrónica y teléfono. Sólo la dirección de correo electrónico será visible a los lectores en la versión publicada.

Las direcciones de correo electrónico del resto de los autores deberán ser incluidas, aunque estas no serán publicadas en el artículo.

## Ejemplo de primera página

Título completo en el idioma del trabajo

Título en el segundo idioma (inglés/español)

Autor AA1, Autor BB1, 2, Autor CC3, Autor DD4\*.

1. Cátedra, Departamento, Facultad, Universidad; 2. Laboratorio, CONICET/CIC; 3. Profesional independiente; 4. Laboratorio, INTA. \*Correo electrónico del autor: dd@mail.com

Título abreviado

Datos del autor de contacto (\*)

Nombre completo

Dirección postal laboral

Dirección electrónica laboral

Teléfono

Correo electrónico de los autores

Autor AA: aa@mail.com

Autor BB: bb@mail.com

Autor CC: cc@mail.com

Autor DD: dd@mail.com

1.2.2. Páginas segunda y tercera

La segunda página contendrá el resumen del trabajo en el idioma en que fue redactado, bajo el subtítulo de Resumen y, por debajo, dejando un espacio, se deberán incluir las palabras clave en el mismo idioma, bajo el subtítulo Palabras clave. En la siguiente página (tercera), se redactará el resumen en el segundo idioma (en inglés se subtitulará como Abstract). Dejado un espacio, se consignarán las palabras clave con el subtítulo Key words.

-Características de los resúmenes. En ellos se incluirán los objetivos y principales resultados, desarrollados en 250 palabras o menos. Se sugiere evitar acrónimos, siglas y abreviaturas. No estarán divididos en secciones ni contendrán referencias.

-Palabras clave. Son palabras o expresiones adicionales que facilitan la recuperación del documento a partir de bases de datos bibliográficos. Para una mayor utilidad en la búsqueda dentro de los sistemas de indización, se sugiere la utilización de términos no incluidos ni en el título ni en el resumen. Se aceptarán entre 3 y 5.

1.2.3. Páginas sucesivas

a- Texto

Organizado en secciones, según el tipo de trabajo. Estas estarán encabezadas por subtítulos en mayúsculas/minúsculas (tipo oración), sin punto final. El texto contendrá las entradas para todas las tablas, figuras, referencias bibliográficas y material complementario. A continuación del texto se enunciarán los agradecimientos, la declaración de conflicto de intereses y la lista de referencias bibliográficas (bajo el subtítulo Bibliografía).

b- Agradecimientos

Los autores pueden agradecer a individuos que han realizado aportes significativos diferentes a los de los coautores. En este apartado deberá consignarse, además, la fuente de financiamiento del trabajo.

#### c- Declaración de conflicto de intereses

Existe un conflicto entre intereses cuando el juicio profesional con respecto a un interés primario (el bienestar del paciente, la validez de la investigación) puede ser influenciado por un interés secundario (como el beneficio económico).

Bajo este título se podrá: a-consignar las relaciones financieras o personales con organizaciones o personas que pueden influenciar o sesgar los resultados del trabajo o,

#### b-declarar que no existe conflicto de intereses

##### Ejemplo:

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo entre estos últimos las relaciones financieras, personales o de otro tipo con otras personas u organizaciones que pudieran influir de manera inapropiada en el trabajo.

#### d- Bibliografía

Esta revista utiliza el formato de referencias basado en el estilo Harvard, del tipo "autor-año" en el texto y por orden alfabético en la lista de referencias.

Cantidad y disponibilidad. Se establece un máximo de 30 referencias para los trabajos de investigación, incluidos los de investigación en educación, y 15 para las comunicaciones cortas, descripciones de casos e informes técnicos. Para las revisiones se establece un mínimo de 40 referencias.

Todos los artículos u otras fuentes utilizadas como referencias deberán ser accesibles en línea o mediante buscadores bibliográficos. En caso contrario, podrá ser requerido el envío del documento a pedido de los evaluadores o del Consejo Editorial. Las fuentes basadas en comunicaciones presentadas en reuniones científicas, comunicaciones personales y tesis deberán reducirse al mínimo y solamente se justificará su incorporación en caso de que no se registre una fuente publicada en otro medio.

Formato de las citas en el texto. Se consignará, entre paréntesis, en color de fuente azul (incluidos los paréntesis): el apellido del primer autor (seguido de la expresión et al., si se trata de más de dos autores) y el año de publicación, separado por una coma, según el ejemplo. Si el artículo tiene solamente dos autores, se consignarán ambos, separados por el signo &. Si la construcción así lo requiriese podrá ubicarse la cita a mitad de la oración.

... puede persistir el infiltrado de linfocitos (Deeget al., 2002).

... similares a los músculos maseteros del ciervo axis (Mateo & Sánchez, 2016).

Los autores también podrían haber elegido expresar: "Según Deeget al., (2002), puede persistir el infiltrado de linfocitos.

Si la misma afirmación se sustenta en más de una cita bibliográfica, estas deberán estar separadas por medio de un punto y coma. La incorporación de las citas entre paréntesis será alfabética. Si se incluyeran dos o más referencias del mismo primer autor, las fechas de publicación deberán estar separadas por comas, en orden cronológico ascendente.

... en las células apoptóticas se produce la externalización de la fosfatidilserina de la membrana (Fadoket al., 1992; Savill, 1993,1997; Willie, 1997).

Si se incluyeran dos o más referencias del mismo primer autor y del mismo año, se identificarán con letras:

... inducido por las células macrofágicas (Jones et al., 2009a, 2009b).

Las referencias a comunicaciones personales se indicarán entre paréntesis del siguiente modo:(comunicación personal, autor, año), pudiendo omitirse el autor si está consignado en el texto.

Formato de las citas en la Bibliografía (lista de referencias, luego de los agradecimientos y de la declaración de conflicto de intereses).

El orden será alfabético y cada cita deberá incluir a todos los autores.

Artículos en publicaciones periódicas. Se citará la nómina completa de autores y sus iniciales, separados por comas. Luego se consignará el año entre puntos. A continuación, el título del trabajo con mayúsculas y minúsculas (tipo oración), sin comillas ni negritas. A continuación, el título completo de la revista seguido de un punto. Luego, el volumen, número de la revista (entre paréntesis) y páginas, en ese orden, sin espacios luego de los signos de puntuación, según el formato que se muestra a continuación:

Deeg CA, Ehrenhofer M, Thurau SR, Reese S, Wildner G, Kaspers B. 2002. Immunopathology of recurrent uveitis in spontaneously diseased horses. *Experimental Eye Research*. 75(2):127-33.

Mateo AG, Sánchez HL. 2016. Descripción anatómica de los músculos masticadores de un ciervo axis (*Axix axis*). *Analecta Veterinaria*. 36(1):25-9.

Si se trata de una publicación anticipada disponible en línea, esta situación deberá consignarse (corresponde a las publicaciones que figuran como Epubahead of print).

En el caso de estar disponible, se incorporará al final de la referencia el *Digital Object Identifier* (DOI) como se muestra a continuación:

Rensetti D, Marin M, Quintana S, Morán P, Verna A, Odeón A, Pérez S. 2016. Involvement of toll-like receptors 3 and 7/8 in the neuropathogenesis of bovine herpesvirus types 1 and 5. *Research in Veterinary Science*. 107:1-7. doi: 10.1016/j.rvsc.2016.04.009.

Libros. Se citará el o los autores, el año de publicación, el título y la edición (si no es la primera). Luego, la ciudad de la publicación y el nombre de la editorial, separados por coma.

Gilbert SF. 2006. *Biología del desarrollo*. 7° Ed. reimp. Buenos Aires, Médica Panamericana.



Capítulos de libro. La cita constará de: autor/es del capítulo y título del capítulo. En: autor/es del libro. Año de publicación. Título del libro, edición (si no es la primera). Ciudad de publicación, nombre de la editorial y páginas inicial y final del capítulo.

García V, Ochoa L, Quiroga MF, Pasquinelli V. Aspectos celulares y moleculares de la respuesta inmune frente a las micobacterias. En: Rabinovich GA. 2004. Inmunopatología molecular: nuevas fronteras de la medicina. Un nexo entre la investigación biomédica y la práctica clínica. Buenos Aires, MédicaPanamericana, pp. 217-27.

Lewin B. Chapter 4: Clusters and repeats. En: Lewin B. 2003. Genes VIII. Upper Saddle River, Pearson Education Inc., pp. 85-133.

Resúmenes en reuniones científicas: se utilizará un formato similar al de los artículos en revistas, consignando, luego del título del trabajo, el nombre de la reunión. Luego, ciudad, país y página.

Pardini L, Bacigalupe D, Moré G, Rambeaud M, Basso W, Perfumo CJ, Hermann DC, Schares G, Venturini MC. 2011. Isolation and molecular characterization of *Toxoplasma gondii* strains in slaughtered pigs from Argentina. The 23rd International Conference of the World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology. Buenos Aires, Argentina, p. 336.

Tesis de maestría o doctorado y trabajos finales de especialización: Se indicará el autor y el año. Luego, el título de la tesis/trabajo. A continuación, el indicador "Tesis de" o "Trabajo de" seguido de la carrera e institución que otorga el título:

Huber B. 2012. Estudio farmacocinético de tilosina en abejas melíferas. Variables con impacto en el nivel de residuos en miel. Tesis de Maestría en Tecnología e Higiene de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Muriel M. 2016. Determinación de la cinética del daño en el ADN de leucocitos de sangre periférica en equinos sometidos a esfuerzo físico de alta intensidad. Tesis de Doctorado en Ciencias Veterinarias, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

Libros electrónicos de acceso libre en internet: Autor/es. Año de publicación. Título como figura en el buscador correspondiente [libro electrónico/e-book]. DOI (si estuviera disponible). Lugar de publicación (si se conoce), editor. Disponible en: (URL) [fecha de acceso].

Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. 2012. Rang y Dale Farmacología. Séptima Edición [libro electrónico]. Amsterdam, Elsevier. Disponible en:

<https://goo.gl/NFleWT> [Consultado 01/06/2017]

Frank SA. 2002. Immunology and Evolution of Infectious Disease [e-book]. Princeton, Princeton University Press. Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK2394/> [Consultado 01/06/2017]

Página web / Website: Autor/es. Año de publicación. Título de la página. [ONLINE] Disponible en: (URL). [Consultado (fecha de acceso)]

Herman B, Centonze Frohlich VE, Lakowicz JR, Murphy DB, Spring KR, Davidson MW. 2012. Olympus Microscopy Resource Center | Introduction to fluorescence microscopy. [ONLINE] Disponible en: <http://www.olympus-micro.com/primer/techniques/fluorescence/fluorointrohome.html> [Consultado 30/05/2017]

SENASA. 2015. Bovinos EEB Encefalopatía Espongiforme Bovina. [ONLINE] Disponible en: <http://www.senasa.gob.ar/tags/bovinos-eeb-encefalopatia-espongiforme-bovina>. [Consultado 30/05/2017]

En caso de dudas acerca de cómo citar otro tipo de material (estándares internacionales, leyes, publicaciones parciales en libros electrónicos de reuniones científicas, patentes, informes de organizaciones, etc.), comunicarse con la revista.

1.2.4. Formando parte del documento principal, pero en hoja aparte (página siguiente a los puntos c y d) se consignarán las leyendas para las figuras bajo el título: Leyendas para las figuras. Las tablas se enviarán en hoja aparte en un archivo con el título y las referencias correspondientes, que deberán seguir los mismos criterios tipográficos.

### 1.3 Tipos de trabajos

En ANALECTA VETERINARIA se publican trabajos en 8 secciones, que corresponden a:

-Editoriales: son notas de presentación del número o del volumen que publica el Director en ocasiones particulares

-Trabajos de investigación: son informes completos de investigaciones originales o de meta-análisis. Constan de las siguientes secciones: Introducción, Materiales y Métodos, Resultados y Discusión y Conclusiones.

-Trabajos de investigación en enseñanza: se trata de trabajos que resulten en un aporte para la enseñanza de las Ciencias Veterinarias (trabajos de investigación propiamente dicha, intervenciones, etc.), que sean superadores de la mera presentación de resultados cuantitativos e incluyan el correspondiente análisis. Constan de los siguientes apartados: Introducción (en el que deberán consignarse el motivo de interés, el estado actual de la cuestión, los fundamentos teóricos en que se enmarca y los objetivos y podrán incluirse hipótesis de trabajo), Métodos, Resultados (presentación y análisis), Discusión y conclusiones y Proyección de la investigación.

-Comunicaciones cortas: se trata de informes originales que se caracterizan por ser acotados en extensión o envergadura o que, en razón de su novedad, requieren comunicación inmediata como anticipo de otra más exhaustiva. Constan de las mismas secciones que los trabajos de investigación. No podrán superar las 4 páginas de texto ni las 3 figuras.

-Trabajos de revisión: son revisiones narrativas dirigidas a la actualización de un tema relevante y que incluyen la discusión crítica del estado del conocimiento. Constan de

una breve Introducción (en la que se explica el interés del tema o el motivo de la revisión), Subtítulos (los que resulten apropiados al tema en cuestión) y Discusión y Conclusiones.

-Descripción de casos: se trata de casos con aspectos inusuales que provean información significativa y original. Este concepto incluye la presentación o progreso poco habitual de una enfermedad, efectos colaterales o adversos no informados durante tratamientos o planes de vacunación, entre otros. Constan de Introducción, Presentación del Caso (con los subtítulos que requiera el tipo de caso) y Discusión y Conclusiones. Deberá incluir hallazgos relevantes, tanto positivos como negativos, que surjan de los exámenes realizados, la interpretación de los resultados y su discusión con referencias a los artículos citados. Si se trata de un solo caso la historia clínica será completa, si son varios sólo se consignarán los datos más relevantes de cada uno.

-Informes técnicos: descripción y análisis de técnicas novedosas en los ámbitos de la investigación, el diagnóstico o el tratamiento quirúrgico. Constan de Introducción, Descripción Metodológica y Discusión y Conclusiones. En este y otros tipos de trabajo que así lo requieran, la descripción metodológica puede enriquecerse mediante videos de alta calidad de información.

-Resúmenes de presentaciones en reuniones científicas: el envío estará a cargo de los organizadores de reuniones científicas ocurridas en el ámbito de la Universidad Nacional de La Plata, previo acuerdo con el Consejo Editorial de la revista. Dichos resúmenes se publicarán en un Suplemento.

Formato de resúmenes de presentaciones en reuniones científicas: se invita a los organizadores de tales reuniones a ponerse en contacto por correo electrónico (analecta@fcv.unlp.edu.ar) para conocer los aspectos formales requeridos.

## 2. Otros archivos

**Figuras.** Se consideran figuras que ilustran el trabajo tanto a las fotografías como a los dibujos lineales y esquemas. Deberán ser numeradas correlativamente con números arábigos y citadas en el texto en el orden que corresponda. En caso de tratarse de fotografías, estas no podrán incluir rostros de personas que no sean autores, o animales con marcas específicas que permitan reconocerlos, excepto que se posea consentimiento por escrito de los propietarios involucrados. Es responsabilidad de los autores obtener permiso de los poseedores de la propiedad intelectual para reproducir figuras o tablas que han sido publicadas en otro sitio. Las ilustraciones deben tener un contraste adecuado. Deberán ser enviadas en formato TIFF. Las figuras correspondientes a imágenes microscópicas capturadas a partir de cámaras de video o fotográficas montadas sobre el microscopio y aquellas escaneadas a partir de fotografías, deberán tener una resolución final de 300 dpi. Las figuras correspondientes a dibujos lineales y esquemas deberán tener una resolución final de 600 a 1200 dpi. El tamaño de letras y números incluidos en las figuras deberá ser el adecuado para que conserve la legibilidad, aún luego de la reducción de tamaño. Las leyendas para las figuras deberán constituir una descripción precisa del contenido de las figuras y mencionar las técnicas cuyos resultados allí se muestran. Todos los textos que contengan las figuras (incluidas las leyendas) deberán resultar accesibles para la corrección.

**Tablas.** Las tablas se diseñarán usando la función correspondiente del procesador de texto o de las planillas de cálculo. Deben ser de estructura sencilla, sin sombreados y sin divisiones entre las filas o las columnas. Todo el texto que contengan las tablas (incluidos los títulos) debe ser accesible para la corrección.

## Material complementario

Podrán remitirse otro tipo de archivos, como videos o hipervínculos, cuya pertinencia y calidad será evaluada por el Consejo Editorial. Este material no será considerado si no se envía según el formato que aquí se detalla: peso máximo de 20 MB cada uno, formato reproducible mediante herramientas y programas gratuitos (PDF, SWF, MP4, MOV, XLS, XLSX). Los datos del material complementario (nombre del archivo, formato y extensión, título de los datos presentados y descripción de los datos) constarán en el apartado Leyendas para las figuras.

## Envío del trabajo, proceso de revisión y comunicación con los autores

ANALECTA VETERINARIA recibe trabajos para su publicación durante todo el año.

El autor de contacto debe remitir el trabajo con el conocimiento de que todos los autores han leído y aprobado el trabajo y están de acuerdo con el envío a Analecta Veterinaria y es responsable por esa situación.

El envío se realizará en línea y se acompañará por una breve nota de presentación en la caja "Comentarios para el/la editor/a". Es un requisito que los autores provean, en los casilleros correspondientes, direcciones de correo electrónico institucional. Los autores en ejercicio independiente o privado de la profesión consignarán una dirección activa de correo electrónico. En la nota de presentación es bienvenida la inclusión de nombres de evaluadores potenciales, que en ningún caso podrán haber sido coautores de ningún autor, al menos en los últimos cinco años, ni miembros actuales de la misma institución que ellos. Estos datos son recibidos en calidad de sugerencia y no generan ningún compromiso para el Consejo Editorial.

Todos los autores recibirán un mensaje de confirmación de la recepción correcta de todos los archivos en el que constará un número de referencia para futuras consultas.

**Revisión.** El Consejo Editorial evaluará primero la pertinencia de la recepción del trabajo, según se adecue o no a las áreas del conocimiento que alcanza la revista. En caso de corresponder, el consejo verificará que se cumplan las siguientes premisas:

- calidad de contenido para ser remitido a los evaluadores,
- corrección gramatical del idioma del trabajo y
- adecuación a las normas editoriales (incluida la bibliografía).

Los trabajos que no cumplan con las normas editoriales serán devueltos a los autores para ser reordenados de acuerdo con ellas y su fecha de recepción será la del nuevo envío.

Se encuentra disponible para su descarga una lista de comprobación que podrá ser utilizada por los autores para

revisar el cumplimiento de algunas cuestiones formales del trabajo antes de su envío.

Todos los artículos serán sometidos a una revisión por pares con modalidad doble ciego: tanto los nombres de los autores como los de los evaluadores se conservarán en el anonimato. El Consejo Editorial seleccionará para esa función a, por lo menos, dos evaluadores externos con conocimiento de la especialidad e informará a los autores acerca de los resultados de la evaluación y los pasos a seguir en consecuencia.

Los autores deberán responder los comentarios y sugerencias de los revisores, punto por punto, en un documento aparte, titulado: "Respuestas al Consejo Editorial", que pueda leerse e interpretarse de manera independiente de la nueva versión del trabajo. Los trabajos que sean reenviados más de una vez, o después de cuatro meses desde la decisión inicial, serán considerados como un nuevo envío.

El Consejo Editorial, teniendo en consideración lo informado por los evaluadores, decidirá e informará si el trabajo ha sido: aceptado sin modificaciones, aceptado con modificaciones menores, aceptado con modificaciones mayores o rechazado.

Los autores de trabajos aceptados recibirán una última prueba en formato [.pdf], o prueba de galera y dispondrán de 4 (cuatro) días hábiles para enviar modificaciones. En caso de no enviarlas en el plazo establecido, la prueba se considerará aprobada por todos los autores.

La obra de los autores se pondrá a disposición del público para que haga de ella un uso justo y respetuoso de los derechos de autor, cumpliendo las condiciones de la licencia de uso *Creative Commons* CC BY-NC-ND. Este tipo de licencia permite a otros descargar la obra y compartirla, siempre y cuando se de crédito a los autores, pero no permite cambiarlas de forma alguna ni usarlas comercialmente.

Correo postal:

Sr. Director

Revista ANALECTA VETERINARIA

CC 296 (B1900AVW) La Plata

ARGENTINA