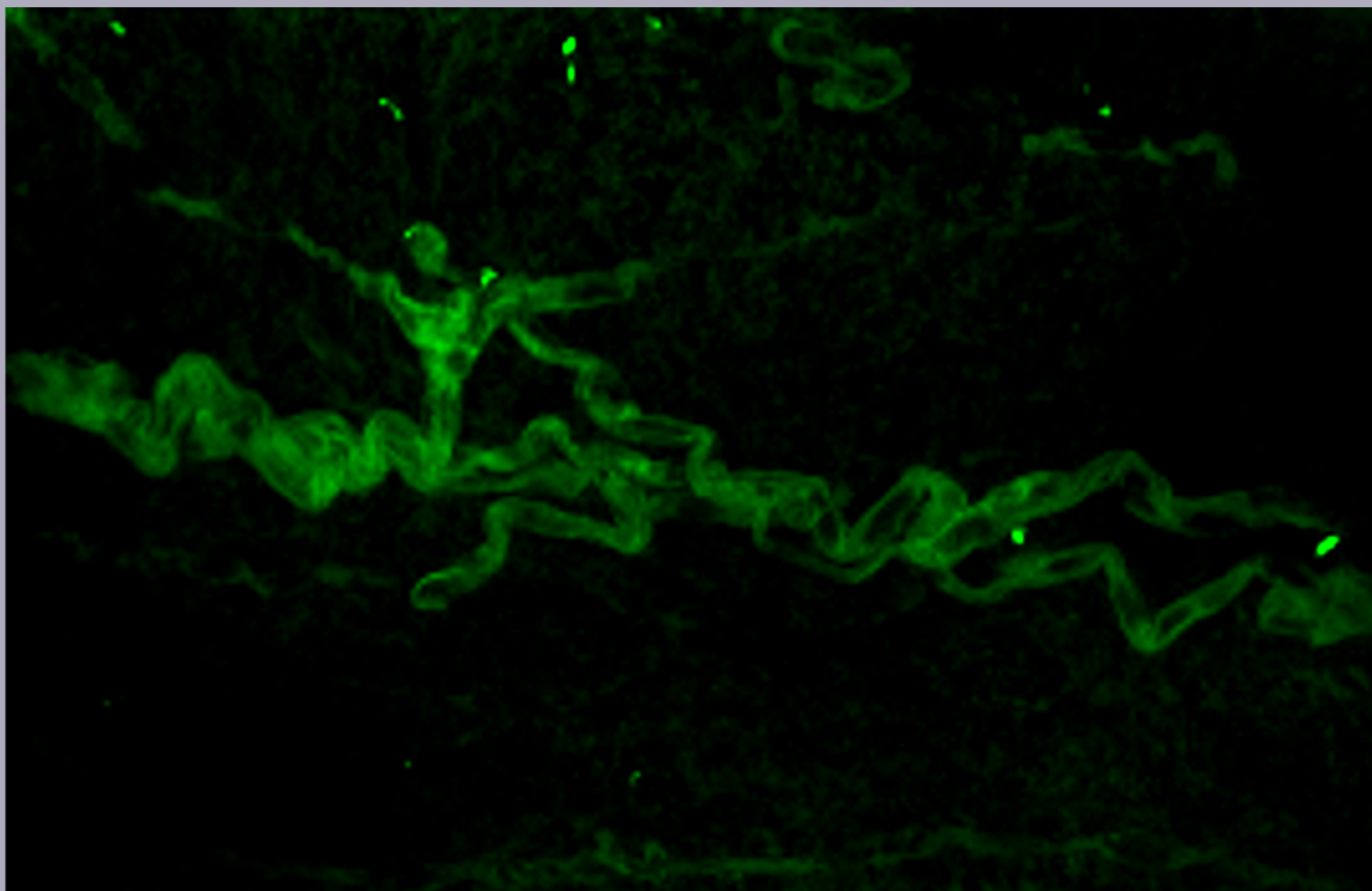


# ANALECTA VETERINARIA



ISSN 0365514-8 Versión impresa  
ISSN 1514-2590 Versión electrónica  
ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

Publicación de la  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS



UNIVERSIDAD  
NACIONAL  
DE LA PLATA



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS  
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

# ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA vol. 38 N° 1, 2018

Publicación de la

Facultad de Ciencias Veterinarias  
Universidad Nacional de La Plata

## **Autoridades** **Facultad de Ciencias Veterinarias** **Universidad Nacional de La Plata**

### **Decano**

Dr. Marcelo I. Pecoraro

### **Vicedecana**

Dra. Sara I. Williams

### **Secretaria de Asuntos Académicos**

Dra. Vanina L. Cambiaggi

### **Secretario de Posgrado**

Dr. Rodolfo L. de la Sota

### **Secretaria de Ciencia y Técnica**

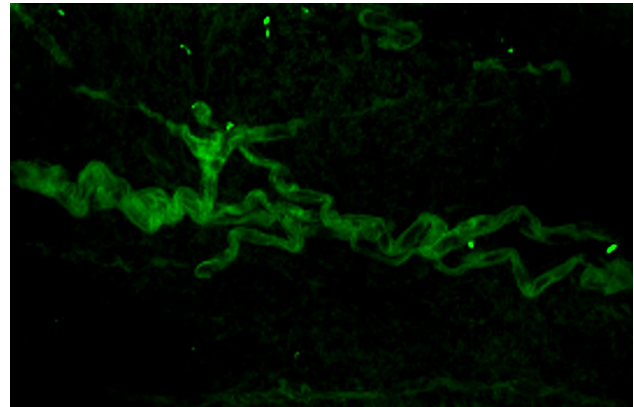
Dra. María C. Venturini

### **Secretaria de Extensión**

Dra. Alicia Antonini

### **Secretaria de Asuntos Estudiantiles**

Med. Vet. Ana Belén Scuffi



**Foto de tapa:** Reconstrucción tridimensional (renderización) de vasos sanguíneos en el espesor del segmento C5 de la médula espinal de rata, con sus correspondientes ramificaciones. Sisti MS *et al.*

---

## **ANALECTA VETERINARIA**

### **Director**

Dr. Enrique L. Portiansky  
Universidad Nacional de La Plata

### **Consejo Editorial**

#### **Editor Responsable**

Dr. Marcelo I. Pecoraro  
Universidad Nacional de La Plata

#### **Editora Asociada**

Dra. María C. Venturini  
Universidad Nacional de La Plata

#### **Coordinación Editorial**

Dr. Julio R. Idiart  
Universidad Nacional de La Plata

Dra. Mónica E. Diessler  
Universidad Nacional de La Plata

#### **Secretaría de Redacción**

Dr. Gastón Moré  
Universidad Nacional de La Plata

Dra. Carla García Mitacek  
Universidad Nacional de La Plata

### **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.

### **About ANALECTA VETERINARIA**

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 other institutions. All works are subjected to double-blind review.

ISSN 1514-2590 Versión en línea

<https://revistas.unlp.edu.ar/analecta/index>  
<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**

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

### **Ph.D. Alberto A. Guglielmone**

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. 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

### **Dr. Nestor O. Stanchi**

Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de La Plata (UNLP), 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  
Maquetación: Dr. Enrique L. Portiansky

## ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l-'ek-t&»

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

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.

*Opinions expressed by authors do not necessarily reflect those of this journal, nor those of their sponsoring entities or the institutions to which the authors belong.*

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.

ANALECTA VETERINARIA ha sido editada, desde 1905, por la Facultad de Ciencias Veterinarias, inicialmente con el nombre de Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de La Plata, pasando a denominarse Revista de la Facultad de Medicina Veterinaria, desde 1922, y luego, a partir de 1959, como Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias. Finalmente, desde 1969, la revista adquirió su actual denominación. De esta manera, nuestra revista ha cumplido más de 100 años de ininterrumpida edición. Actualmente se publica sólo en su versión *en línea* (ISSN 1514-2590).

## 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 dé crédito a los autores, pero no permite cambiarlas de forma alguna ni usarlas comercialmente.

*ANALECTA VETERINARIA meets the international conditions of the Creative Commons CC-BY-NC-ND license. This type of license allows others to download the work and share it, as long as credit is given to the authors, but it does not allow to change them in any way or use them commercially.*

## Citación de la versión en línea

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

Durante E, Marcos A, Ayerbe M, Chiricosta A, Segato L, Donato ME, Capellino F, D'Alessio F, Piskorz A, Carballo Longo M. 2017. Prevalencia de anticuerpos contra virus de influenza equina en equinos deportivos de la República Argentina durante 2015 y 2016. *Analecta Veterinaria*. 37(2):25-32. doi: 10.24215/15142590e013

## ANALECTA VETERINARIA está indizada en:

Índice y catálogo Latinoamericano de Revistas Científicas LATINDEX  
<http://www.latindex.unam.mx>

Directory of Open Access Journals  
<http://doaj.org>

SEDICI  
<http://sedici.unlp.edu.ar>

BINPAR. CAICYT. CONICET  
<http://binpar.caicyt.gov.ar>

Ulrich's International Periodicals Directory  
<http://www.ulrichsweb.com>

REDIB (Red Iberoamericana de Innovación y Conocimiento Científico)  
<https://www.redib.org>

ROAD (Directory of Open Acces Scholarly Resources)  
<http://road.issn.org>

Plataforma Open Access de Revistas Científicas Electrónicas Españolas y Latinoamericanas del CSIC  
<http://bibliotecas.csic.es>

Princeton University Library  
<https://catalog.princeton.edu>

Google Académico  
<https://scholar.google.com.ar>

MIAR (Matriz de Información para el Análisis de Revistas)  
<http://miar.ub.edu>

Citefactor  
<http://www.citefactor.org>

JournalTOCs  
<http://www.journaltoCs.ac.uk>

## Acceso en línea a ANALECTA VETERINARIA

ANALECTA VETERINARIA puede ser recuperada gratuitamente en internet en el repositorio institucional SeDiCi UNLP:

<http://sedici.unlp.edu.ar>



A partir del volumen 36(2), 2016, también se puede acceder desde el Portal de Revistas de la UNLP:

<http://revistas.unlp.edu.ar/analecta>

Si desea consultar los volúmenes previos (1969 en adelante) debe dirigirse a la siguiente dirección electrónica:

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

A partir del Volumen 18, los números de la revista se encuentran a disposición 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 esta posea un resolución mínima de 600 x 600 dpi.

*ANALECTA VETERINARIA can be downloaded in PDF file format and can be printed on any printer that allows to differentiate grayscale or colors.*

#### **Evaluadores de trabajos de ANALECTA VETERINARIA**

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

Se invita a todos los potenciales evaluadores a registrarse en el Portal de Revistas de la UNLP, en la siguiente dirección electrónica:

<https://revistas.unlp.edu.ar//user/register>

Todos los trabajos publicados en ANALECTA VETERINARIA son sometidos a revisores externos. El Consejo Editorial se reserva el derecho de editar los artículos para clarificarlos y de modificarles el formato para adecuarlos al estilo de ANALECTA VETERINARIA.

*All articles published in ANALECTA VETERINARIA are submitted to external scientific reviewers. The Editorial Staff reserves the right to edit articles for clarity and to modify the format to fit the publication style of ANALECTA VETERINARIA.*

#### **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)

*For any official communication, please contact the Director of ANALECTA VETERINARIA at: [analecta@fcv.unlp.edu.ar](mailto:analecta@fcv.unlp.edu.ar)*

**Comentario editorial/ Editorial note**

- Renovación de autoridades en ANALECTA VETERINARIA**  
doi.org/10.24215/15142590e018 1

**Trabajos de investigación / Research works**

- Detección mediante pirosecuenciación de la mutación nt230 [del4] del gen ABCB1 canino y determinación de su prevalencia en razas de perros pastores en la provincia de Buenos Aires**  
*Detection by pyrosequencing and prevalence of canine ABCB1 gene mutation nt230 [del4] in sheep dog breeds of Buenos Aires province*  
CRESPI JA, BARRIENTOS LS, ARIZMENDI A, PERAL GARCÍA P, GIOVAMBATTISTA G  
doi.org/10.24215/15142590e019 2

- Efecto de la adición de agua electroactivada a la bebida de bovinos de engorde a corral (feedlot), en un establecimiento de la provincia de Buenos Aires**  
*Effect of electrochemically activated water addition in the drinking water of feedlot cattle of Buenos Aires province*  
PELLICER KE, BRUSA V, DE LA TORRE JH, REAL D, SILVESTRINI MP<sup>3</sup>, BAINOTTI CA, OSELLA OE, COPES J  
doi.org/10.24215/15142590e020 9

**Comunicaciones cortas / Short communications**

- Uso de la técnica CLARITY para la identificación de marcadores fluorescentes en cortes gruesos de la médula espinal**  
*Use of the CLARITY technique for identifying fluorescent markers on thick slices of spinal cord*  
SISTI MS, NISHIDA F, ZANUZZI CN, PORTIANSKY EL  
doi.org/10.24215/15142590e021 16

**Trabajos de revisión / Reviews**

- Estudio del comportamiento porcino: una mirada etológica sobre la producción porcina**  
*Porcine behavior study: an ethological view on swine production*  
ARROYO P, FERRARI HR, ANTONINI AG  
doi.org/10.24215/15142590e022 23

**Coccidioidomicosis en caninos y felinos: hallazgos clínicos, diagnóstico y tratamiento**

*Canine and feline coccidioidomycosis: clinical findings, diagnosis and treatment*

MARTÍNEZ CEPEDA GE, REVELO RUALES AP

doi.org/10.24215/15142590e023

33

**Informes técnicos / Technical reports**

**Determinación de la concentración de solutos en orinas de pacientes caninos: comparación de osmometría versus densidad urinaria (refractometría y tiras reactivas)**

*Determination of the urine solutes concentration in dogs: osmometry versus urine density (refractometry and reactive strips) compared*

RODRÍGUEZ JV, COLLA C, GINES MB, SCHRÖDER G

doi.org/10.24215/15142590e024

45

**Medio de cultivo líquido para el diagnóstico de paratuberculosis bovina. Aplicación y análisis comparativo con el medio de Herrold: resultados preliminares**

*Liquid culture medium for diagnosis of bovine paratuberculosis. Usefulness and comparative analysis to Herrold medium: preliminary results*

ROMERO M, ALVARADO PINEDO M, MOYANO R, PERALTA L, SOSA P, SANTANGELO M, TRAVERÍA G

doi.org/10.24215/15142590e025

50

**Instrucciones para los autores**

56

## Renovación de autoridades en ANALECTA VETERINARIA

La Plata, 15 de diciembre de 2017

Sr. Decano de la  
Facultad de Ciencias Veterinarias  
de la Universidad Nacional de La Plata  
Prof. Dr. Claudio Barbeito

Me dirijo a Ud. a los efectos de presentar mi renuncia al cargo de Director de la Revista ANALECTA VETERINARIA, en el que me desempeñé en carácter ad honórem.

Tuve el honor de ser designado como tal en el año 1998. Han pasado 20 años de una tarea que tuvo la misión de posicionar a la revista en altos estándares de reconocimiento. En este período ANALECTA VETERINARIA fue la primera revista científica veterinaria en estar colocada en la Web en nuestro país y que fuera calificada por el Caicyt-Conicet como “Nivel 1 superior de excelencia”. Fue una tarea en parte solitaria pero, a partir de su gestión como Decano, se logró conformar un grupo de trabajo de excelencia, no solo desde lo científico sino desde las cualidades personales de sus integrantes, lo que permitió mantenerse estable durante cuatro años.

Esto me permite ponerle un fin a mi actividad, un cambio de ciclo, que es coherente con mi pensamiento de renovación de cargos y funciones, quedando un grupo de trabajo consolidado para la continuidad de ANALECTA VETERINARIA.

No me queda más que agradecer a los sucesivos decanos por la confianza puesta en mí en estos 20 años, a los integrantes de las distintas comisiones y especialmente los actuales y, finalmente, a su gestión por afianzar el interés en la Revista.

Sin más, me despido con un atento saludo,

Prof. Dr. Néstor Oscar Stanchi

Estimados lectores de ANALECTA VETERINARIA:

Los párrafos que anteceden corresponden a la dimisión presentada oportunamente por el que fuera, hasta el año pasado, director de la revista de los últimos 20 años. No nos quedan más que palabras de agradecimiento para el Dr. Stanchi, por haber continuado el camino iniciado en el año 1905 por los editores de la entonces denominada Revista de la Facultad de Agronomía y Veterinaria.

El alejamiento del Dr. Stanchi se hace coincidente con el recambio de autoridades de nuestra Facultad. Por esta razón, y contando con el apoyo de las nuevas autoridades, decidimos reestructurar el rol desempeñado por algunos de sus integrantes, incorporar nuevos colaboradores y realizar algunos cambios en la presentación de este nuevo volumen de la Revista que hoy está viendo la luz.

Es nuestro deseo que todos aquellos autores que nos han acompañado hasta el presente lo sigan haciendo y que nuevos autores se sumen para engrandecer ANALECTA VETERINARIA, una revista de todos y para todos.

Consejo Editorial  
ANALECTA VETERINARIA



# Detección mediante pirosecuenciación de la mutación nt230 [del4] del gen *ABCB1* canino y determinación de su prevalencia en razas de perros pastores en la provincia de Buenos Aires

## *Detection by pyrosequencing and prevalence of canine *ABCB1* gene mutation nt230 [del4] in sheep dog breeds of Buenos Aires province*

CRESPI JA<sup>1§\*</sup>, BARRIENTOS LS<sup>1§</sup>, ARIZMENDI A<sup>1,2</sup>, PERAL GARCÍA P<sup>1</sup>, GIOVAMBATTISTA G<sup>1</sup>

§ Ambos autores contribuyeron de igual manera

1. Instituto de Genética Veterinaria Ing. Fernando N. Dulout (IGEvet, UNLP-CONICET LA PLATA). 2. Servicio de Cardiología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

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

### Resumen

El gen *ABCB1* codifica para la glicoproteína-P (Pgp), una proteína de membrana que transporta múltiples fármacos fuera de la célula. Este gen se expresa principalmente en la barrera hematoencefálica, cumpliendo también importantes funciones en otros órganos. En caninos, se ha informado una delección de 4 pb en el exón 4, que genera una terminación prematura y una proteína no funcional. Los animales homocigotos para la mutación presentan neurotoxicidad al administrarles drogas como las avermectinas. Esta mutación ha sido comunicada principalmente en collie, border collie y otras razas de perros pastores. El objetivo del trabajo consistió en desarrollar un método de diagnóstico rápido de la mutación nt230 [del4] del gen *ABCB1* basado en pirosecuenciación y validarla en una población local. Se analizaron 72 perros mediante pirosecuenciación y secuenciación directa. Los resultados obtenidos con ambas técnicas evidenciaron 100 % de concordancia. El cálculo de la frecuencia génica del alelo nt230 [del4] (q) mostró diferencias entre las razas tipificadas: collie (n=30 y q=0,32), border collie (n=17 y q=0,06), pastor de Shetland (n=12 y q=0) y otras (n=16 y q=0). El valor promedio obtenido de frecuencia génica del alelo nt230 [del4] resultó menor al reportado en otros países. En conclusión, el método desarrollado podría ser utilizado para la detección temprana de la mutación nt230 [del4] causal de la deficiencia de Pgp, siendo una herramienta muy útil para la reproducción controlada y la prevención de la neurotoxicidad en los pacientes frente a tratamientos con avermectinas y otras drogas sustrato de la Pgp.

### Palabras clave

Perros, glicoproteína P, neurotoxicidad, pirosecuenciación, prevalencia

### Abstract

*ABCB1* gene codes for P-glycoprotein (Pgp), a membrane protein that transports multiple drugs out of the cell. It is mainly expressed in the blood-brain barrier, although it also plays a role in other organs. In dogs, a 4 bp deletion in exon 4 of *ABCB1* gene has been reported. This mutation results in a premature stop codon and a nonfunctional protein. Homozygous animals for the deletion present neurotoxicity when administered drugs such as avermectins. This mutation is found mainly in collie, border collie and other related dog breeds. The aim of the present work was to develop a pyrosequencing method for rapid diagnosis of the *ABCB1* gene nt230 [del4] mutation and validate it by direct sequencing in a local population. A total of 72 dogs were analyzed, obtaining a 100 % agreement between both methods. The genetic variation of the mutated allele (q) showed differences between the evaluated breeds: collie (n = 30; q = 0.32), border collie (n = 17; q = 0.06), Shetland sheep dog (n=12; q= 0), others (n=13; q = 0). On average, the q value was lower than reported in other countries. Pyrosequencing could be used for early diagnosis of Pgp deficiency, being a very useful tool for controlled reproduction in kennels and for the prevention of neurotoxicity in patients treated with avermectins and other Pgp substrate drugs.

### Key words

Dogs, P-glycoprotein, neurotoxicity, pyrosequencing, prevalence

Fecha de recepción: 07/12/2017

ANALECTA VET 2018; 38(1): 2-8

Fecha de aprobación: 24/04/2018

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

doi.org/10.24215/15142590e019

## Introducción

La glicoproteína-P 1 (glicoproteína de permeabilidad, Pgp), también conocida como *multidrug resistance protein 1 (Mdr1)*, protege a los tejidos de la acumulación de xenobióticos y tiene un gran impacto en la distribución de varios fármacos. El amplio espectro de los sustratos de la Pgp incluye antiparasitarios, antibióticos, quimioterápicos, analgésicos, glucocorticoides y antiepilépticos (Fromm, 2003; Löscher & Potschka, 2005).

La influencia de la Pgp en la disposición de ciertos fármacos se ha demostrado en perros de raza collie y en otras razas de perros pastores (Mealey *et al.*, 2001; Nelson *et al.*, 2003; Roulet *et al.*, 2003). Se ha observado intoxicación grave en respuesta al tratamiento con el fármaco antiparasitario ivermectina y otras avermectinas en una subpoblación de estas razas, lo que demuestra la predisposición genética a una mayor permeabilidad de la barrera hematoencefálica a ciertos fármacos (Schinkel, 1999). Esto permite que la ivermectina ingrese en las neuronas y ejerza efectos sobre los canales de cloruro regulados por ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA). Además, otras drogas de uso frecuente en medicina veterinaria, como la doxorrubicina y la vincristina, son sustrato de la Pgp (Stiedl *et al.*, 2017). Mealey *et al.* (2001), identificaron en una subpoblación de perros de raza collie una delección de 4 pares de bases (pb) en el exón 4 en el gen *ABCB1 (ATP-binding cassette, sub-family B -Mdr/Tap-, member 1)* que se ubica en el cromosoma 14 y que codifica para la proteína Pgp. Posteriormente, esta mutación, denominada nt230 [del4], también fue detectada en perros de la raza pastor australiano sensibles a ivermectina (Nelson *et al.*, 2003). La delección provoca un cambio de marco de lectura y un codón de detención prematuro con la consecuente Pgp truncada (Mealey *et al.*, 2001). Neff *et al.* (2004), detectaron el alelo mutante en otras seis razas, incluyendo el pastor inglés, el whippet de pelo largo, el pastor de McNab, el pastor de Shetland y el silken windhound. En estas razas, los veterinarios deben ser cautelosos con el uso de medicamentos sustratos de Pgp. Sin embargo, el tratamiento con dichos fármacos puede ser preferido o incluso necesario en algunos casos clínicos, razón por la cual el análisis genético es de valor para revelar el genotipo *ABCB1 (mdr1)* del paciente y adaptar la elección del fármaco a cada paciente. Los sustratos de Pgp podrían utilizarse en perros con alelos del gen *ABCB1* de tipo normal y evitarse en perros portadores de la delección nt230 [del4].

Hasta el momento, se han utilizado varios métodos para la detección de esta mutación, como AS-PCR (reacción en cadena de la polimerasa, alelo-específica) (Baars *et al.* 2007), electroforesis en geles de poliacrilamida de alta resolución (Greyer *et al.*, 2005; Kawabata *et al.*, 2005) y secuenciación directa (Gagliardi *et al.*, 2015).

El objetivo del presente trabajo consistió en desarrollar un método de detección de la mutación nt230 [del4] del gen *ABCB1* mediante pirosecuenciación para identificar el genotipo de riesgo de manera más rápida, sencilla y eficiente. De esta manera se pudo determinar su frecuencia en la población de perros pastores de algunas razas en la provincia de Buenos Aires.

## Materiales y métodos

El presente estudio fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Los propietarios de los perros firmaron un consentimiento informado previo al muestreo.

Se colectaron 72 muestras de sangre entera con anticoagulante EDTA al 6 %, por venopunción cefálica o safena. Los animales muestreados fueron perros de diferentes razas provenientes de distintas zonas de la provincia de Buenos Aires: 59 perros pastores (Grupo 1 – Sección 1, Federación Cinológica Internacional) de los cuales 30 eran de la raza collie, 17 de la raza border collie, 12 de la raza pastor de Shetland; también se incluyeron en el estudio 13 perros seleccionados al azar de razas no incluidas en la categoría de perros pastores y que no presentaban hasta el momento, según la bibliografía, informes de esta mutación (2 Airedale terrier, 1 bulldog francés, 2 caniche toy, 2 dóberman, 2 dogo argentino, 1 fox terrier wire, 2 golden retriever y 1 podenco faraónico). Todos los animales utilizados en este trabajo se encuentran registrados dentro del circuito oficial cinológico y cumplen con la condición de no estar emparentados entre sí.

El ADN genómico se extrajo a partir de las muestras de sangre utilizando el kit de purificación Wizard Genomic DNA purification (Promega Madison, WI) de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Los animales se genotipificaron mediante los métodos de secuenciación directa y pirosecuenciación.

El amplificado por PCR de la secuencia de interés se llevó a cabo mediante cebadores (F-mdr1, R-mdr1-M13 e INT-mdr1) diseñados utilizando el programa Annhyb (<http://bioinformatics.org/annhyb/>) y la secuencia de ADN reportada en GenBank NM\_001003215.2 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Tabla 1, Figura1).

Los componentes de cada reacción fueron: 20 ng de ADN molde, buffer de reacción 1X (50 mM KCl, 11 mM Tris, pH = 8,30), MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM, potenciador 0,08X, dNTP 100  $\mu$ M de cada uno, cebadores 0,2  $\mu$ M cada uno y Taq polimerasa 0,75 U (T-Holmes DNA polymerase, INBIO Highway, Tandil, Argentina).

Para la genotipificación por secuenciación directa se utilizaron los cebadores específicos

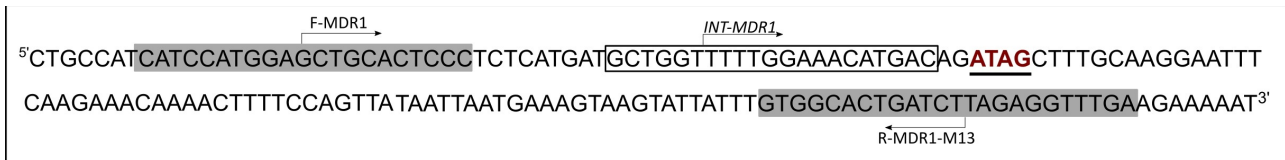


Figura 1. Cebadores utilizados en este estudio. Subrayado: polimorfismo InDel (inserción-delección), F-*mdr1* (cebador directo), R-*mdr1*-M13 (cebador reverso con la secuencia de M13 en su extremo 5') e INT-*mdr1* (cebador interno utilizado en pirosecuenciación).

F-*mdr1* y R-*mdr1*-M13 y el ciclado tuvo una temperatura de hibridación de 58 °C. Los productos de PCR fueron purificados con polietilenglicol (PEG) 8000 y secuenciados en un secuenciador automático Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems®) utilizando el kit comercial (BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit – Applied Biosystem-Thermo Fisher Scientific). Las secuencias obtenidas se alinearon y analizaron utilizando los programas para análisis de secuencias DNAMAN 4.15, Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Quebec, Canadá y Chromas 2.4, Technelysium, South Brisbane, Australia.

Cebadores	Secuencia 5'-3'	Temperatura de hibridación	Tamaño del fragmento (pb)
F- <i>mdr1</i>	CATCCATGGAGCTGCACTCCC	58 °C	150
R- <i>mdr1</i> -M13	M13-TCAAACCTCTAAGATCAGTGCCACA	58 °C	
INT- <i>mdr1</i>	GCTGGTTTTGGAAACATGAC	52 °C	
M13-Biot	Biot-AGCGCATAACAATTTACACAGGT	52 °C	

Tabla 1. Secuencia de los cebadores utilizados en este estudio.

La genotipificación por pirosecuenciación se llevó a cabo utilizando los cebadores F-*mdr1*, R-*mdr1*-M13 y M13-Biot. En cuanto a las condiciones de ciclado, la elongación se dividió en dos etapas: la primera, de 15 ciclos, con una hibridación a 58 °C, en la que se amplifica el fragmento utilizando los cebadores específicos F-*mdr1*, R-*mdr1*-M13 y, la segunda, en la que se incorpora el cebador biotinilado M13-Biot con 30 ciclos e hibridación a 52 °C. Los productos de PCR fueron purificados captando los fragmentos biotinilados con perlas de sefrosa cubiertas con estreptavidina (Streptavidin Sepharose™ High Performance, GE Healthcare). Los fragmentos biotinilados se inmovilizaron y utilizaron como molde para realizar la reacción de pirosecuenciación, incorporando el cebador interno INT-*mdr1* (0,5 µM) usando el kit comercial (Pyro Gold Reagent Kit, Biotage, Uppsala, Suecia) y PyroMark Prep Workstation (QIAGEN, Hilden, Alemania). Las muestras se tipificaron en un pirosecuenciador PSQTM96 System Instrument (QIAGEN) y los resultados se analizaron con el programa PSQ HS96A (QIAGEN).

Los cálculos de las frecuencias génicas y genotípicas, el equilibrio de Hardy-Weinberg

(HWE), la heterocigosidad observada (ho) y esperada (he) y la diferenciación génica entre pares de grupos se realizaron utilizando el software Genepop (<http://genepop.curtin.edu.au/>) con un valor de significancia igual a 0,05.

## Resultados

En este estudio, la totalidad de los animales se genotificaron mediante los métodos de secuenciación directa y de pirosecuenciación, obteniéndose un 100 % de concordancia entre los resultados obtenidos con ambos métodos (Figura 2). Las frecuencias génicas y genotípicas para el alelo nt230 [del4] del gen ABCB1 canino se calcularon en el total de la muestra y en cada grupo por separado (Tabla 2). La muestra analizada presentó una he de 0,25 y una ho de 0,15. La estimación de HWE en la población total y dentro de cada uno de los cuatro grupos raciales evidenció que solo en el total de la muestra se observó un desvío significativo con respecto a las proporciones teóricas esperadas para el equilibrio (p=0,004) (Tabla 2).

	n	(+)	(-)	(+/+)	(+/-)	(-/-)	HWE (valor de p)	He	Ho
Población total	72	0,85	0,15	56 (0,78)	5 (0,07)	11 (0,15)	0,004	0,25	0,15
collie	30	0,68	0,32	16 (0,53)	5 (0,17)	9 (0,30)	0,099	0,43	0,30
border collie	17	0,94	0,06	15 (0,88)	0	2 (0,12)	1,000	0,11	0,12
pastor de Shetland	12	1	0	12 (1)	0	0	-	-	-
otras	13	1	0	13 (1)	0	0	-	-	-

Tabla 2. Frecuencias génicas y genotípicas de la mutación nt230 [del4] del gen ABCB1 canino en la provincia de Buenos Aires. HWE: Equilibrio de Hardy-Weinberg; (+): alelo normal; (-): alelo mutado; (+/+): genotipo homocigota normal, (+/-): genotipo heterocigota; (-/-): genotipo homocigota mutado; (He) heterocigosidad esperada; (Ho): heterocigosidad observada.

La prueba de diferenciación génica entre pares de grupos evidenció diferencias con valores significativos entre la raza collie y los otros tres grupos (Tabla 3). La mayor diferencia se detectó entre la raza collie y el grupo de otras razas (p=0,00044), seguida por la detectada entre perros de raza collie y el grupo de pastores de Shetland (p= 0,00091) y, por último, con el grupo de la raza border collie (p=0,00286).

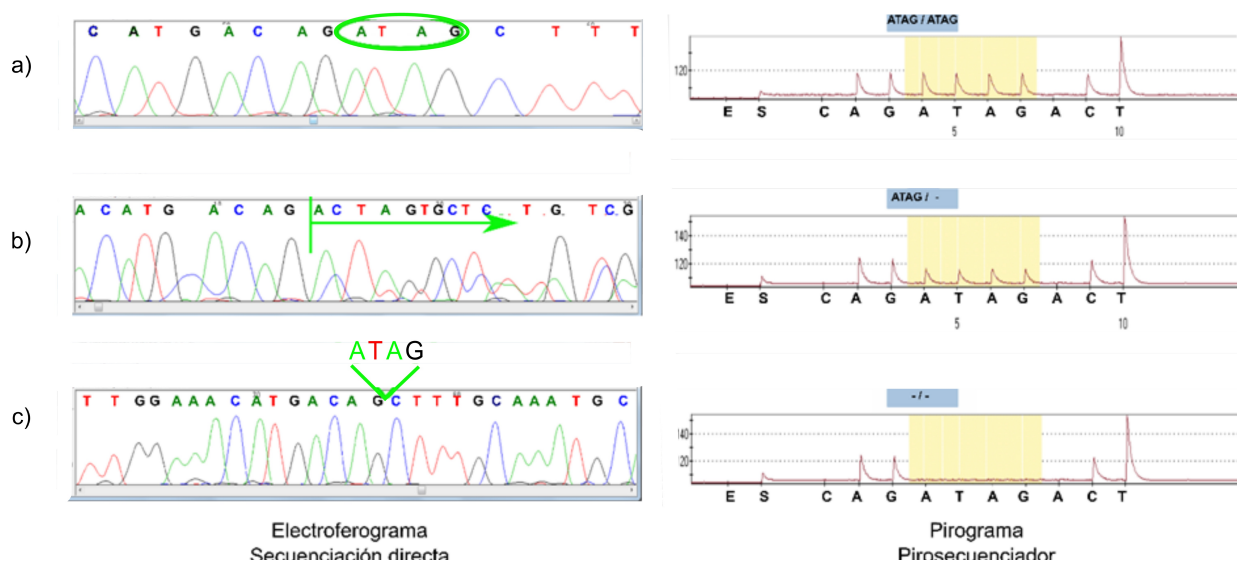


Figura 2. Correlación entre ambos métodos de secuenciación para validar la técnica desarrollada. a) Genotipo homocigota normal (+/+), b) Genotipo heterocigota (+/-), c) Genotipo homocigota mutado (-/-).

Pares de grupos	Valor de p	$\chi^2$
border collie/collie	0,00286*	11,71
otras/collie	0,00044*	15,46
otras/border collie	0,50021	1,38
pastor de Shetland/ collie	0,00091*	14,00
pastor de Shetland/border collie	0,50585	1,36
pastor de Shetland/otras	-	-

Tabla 3. Diferenciación genética para la mutación nt230 [del4] del gen *ABCB1* entre los diferentes grupos de razas utilizados en este estudio (Método de Fisher, valor de significancia  $\alpha = 0,05$ ). (\*) Valores significativos.

## Discusión

El método desarrollado de detección de esta mutación resultó ser una alternativa igualmente eficaz con respecto a la secuenciación directa y, a su vez, más eficiente, proporcionando los mismos resultados con un menor costo y un volumen de procesamiento mayor.

Los resultados obtenidos mostraron que la frecuencia del alelo mutado (-) en la población de la raza collie analizada en la región estudiada fue menor (0,32) que la informada en otros países (Tabla 4). En el caso de la raza border collie, la prevalencia del alelo nt230 [del4] en la muestra local fue seis veces mayor que la comunicada por Gramer (2011) ( $q = 0,01$ ) y diez veces mayor que la informada por Greyer *et al.* (2005) ( $q = 0,006$ ), Huebner *et al.* (2007) y Fridova *et al.* (2016) ( $q = 0$ ). En cuanto a la población local de la raza Pastor de Shetland, en este estudio no se encontraron animales portadores del alelo nt230 [del4],

mientras que en otros países la frecuencia del alelo mutado se encuentra entre el 0,2 (Stiedl *et al.*, 2017) y el 0,3 (Huebner *et al.*, 2007; Gramer *et al.*, 2011; Fridova *et al.*, 2016). Estas diferencias pueden ser la consecuencia del efecto del grupo de perros fundador de las poblaciones de cada país o de la deriva génica producto del reducido tamaño efectivo poblacional. Sin embargo, no puede descartarse que parte de las diferencias observadas sean consecuentes a un efecto de muestreo.

País/Región	n	q	(+/+)	(+/-)	(-/-)	Referencia
Alemania	578	0,55	0,24	0,43	0,33	Geyer <i>et al.</i> , 2005
EE.UU.	161	0,51	0,26	0,46	0,28	Neff <i>et al.</i> , 2004
Reino Unido	94	0,60	0,15	0,51	0,34	
Australia	33	0,56	0,12	0,64	0,24	Mealey <i>et al.</i> , 2005
Francia	25	0,64	0,20	0,32	0,48	Hugnet <i>et al.</i> , 2004
Japón	12	0,58	0,25	0,33	0,42	Kawabata <i>et al.</i> , 2005
Europa	1310	0,48	0,28	0,47	0,25	Fridova <i>et al.</i> , 2016
Argentina	30	0,32	0,53	0,30	0,17	Este trabajo

Tabla 4. Cuadro comparativo de la frecuencia de la mutación (q) nt230 [del4] del gen *ABCB1* canino entre las frecuencias genotípicas informadas en otros países y las encontradas en este estudio para la raza collie. (+): alelo normal; (-): alelo mutado; (n): número de animales; (+/+): genotipo homocigota normal; (+/-): genotipo heterocigota; (-/-): genotipo homocigota mutado.

En la estructura poblacional de los animales utilizados en este trabajo, se puede observar a una población en desequilibrio y marcadas diferencias genéticas entre la raza collie y los otros grupos analizados. Este fenómeno es común en la especie canina teniendo en cuenta los métodos utilizados en la formación de las distintas razas (Calboli *et al.*, 2008).



## Conclusiones

Un método rápido y específico para determinar el genotipo de los perros con la delección nt230 [del4] del gen *ABCB1* es de gran utilidad. Estos pacientes muestran intolerancia a drogas utilizadas de forma rutinaria en medicina veterinaria como la ivermectina, la vincristina y la doxorubicina, provocando la acumulación de la droga en el cerebro y, en consecuencia, neurotoxicidad severa.

La detección por pirosecuenciación de esta mutación servirá tanto para guiar los tratamientos que utilizan drogas sustrato de la Pgp, como para eliminar esta delección en los criaderos de las razas de pastores y sus cruza.

Además, este trabajo aporta una primera aproximación a la prevalencia de la mutación en la provincia de Buenos Aires.

## Agradecimientos

Este estudio fue financiado por el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Los autores agradecen a la Méd. Vet. Lorena Petetta por su colaboración con el muestreo y a la Trad. L. Adriana Di Maggio por la corrección y edición del manuscrito.

## Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existe conflicto de intereses, incluyendo las relaciones financieras, personales o de otro tipo que pudieran influir en el trabajo.

## Bibliografía

Baars C, Leeb T, von Klopmann T, Tipold A, Potschka H. 2008. Allele-specific polymerase chain reaction diagnostic test for the functional MDR1 polymorphism in dog. *The Veterinary Journal*. 177:394-7.  
doi: [10.1016/j.tvjl.2007.05.020](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2007.05.020)

Calboli FC, Sampson J, Fretwell N, Balding DJ. 2008. Population structure and inbreeding from pedigree analysis of purebred dogs. *Genetics*. 179(1):593-601.  
doi: [10.1534/genetics.107.084954](https://doi.org/10.1534/genetics.107.084954)

Fromm MF. 2003. Importance of P-glycoprotein for drug disposition in humans. *European Journal of Clinical Investigation*. 33(2):6-9.

Gramer I, Leidolf R, Döring B, Klintzsch S, Krämer EM, Yalcin E, Petzinger E, Geyer J. 2011. Breed distribution of the nt230(del4) MDR1 mutation in

dogs. *The Veterinary Journal*. 189(1):67-71.  
doi: [10.1016/j.tvjl.2010.06.012](https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.06.012)

Geyer J, Döring B, Godoy JR, Leidolf R, Moritz A, Petzinger E. 2005. Frequency of the nt230 (del4) MDR1 mutation in Collies and related dog breeds in Germany. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 28:545-51.  
doi: [10.1111/j.1365-2885.2005.00692.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2005.00692.x)

Huebner J, Kühnlein P, Langbein-Detsch I, Müller E. 2007. LABOKLIN. Canine MDR1 mutation breed disposition and prevalence in dogs in Germany. [ONLINE] Disponible en: <http://v17.laboklin.com/>. Consultado 10/10/2017.

Hugnet C, Bentjen SA, Mealey KL. 2004. Frequency of the mutant MDR1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of collies from France. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*. 27:227-9.  
doi: [10.1111/j.1365-2885.2004.00585.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2004.00585.x)

Firdova Z, Turnova E, Bielikova M, Turna J, Dudas A. 2016. The prevalence of ABCB1:C.227\_230delATAG mutation in affected dog breeds from European countries. *Research in Veterinary Science*. 106:89-92.  
doi: [10.1016/j.rvsc.2016.03.016](https://doi.org/10.1016/j.rvsc.2016.03.016)

Kawabata A, Momoi Y, Inoue-Murayama M, Iwasaki T. 2005. Canine mdr1 gene mutation in Japan. *Journal of Veterinary Medical Science*. 67:1103-07.  
doi: [10.1292/jvms.67.1103](https://doi.org/10.1292/jvms.67.1103)

Löscher W, Potschka H. 2005. Role of drug efflux transporters in the brain for drug disposition and treatment of brain diseases. *Progress in Neurobiology*. 76:22-76.  
doi: [10.1016/j.pneurobio.2005.04.006](https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.04.006)

Mealey KL, Bentjen SA, Gay JM, Cantor GH. 2001. Ivermectin sensitivity in Collies is associated with a deletion mutation of the mdr1 gene. *Pharmacogenetics*. 11:727-33.  
doi: [10.1097/00008571-200111000-00012](https://doi.org/10.1097/00008571-200111000-00012)

Mealey KL, Munyard KA, Bentjen SA. 2005. Frequency of the mutant mdr1 allele associated with multidrug sensitivity in a sample of herding breed dogs living in Australia. *Veterinary Parasitology*. 131:193-6.  
doi: [10.1016/j.vetpar.2005.05.004](https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2005.05.004)

Neff MW, Robertson KR, Wong AK, Safra N, Broman KW, Slatkin M, Mealey KL, Pedersen NC. 2004. Breed distribution and history of canine mdr1-1, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America*. 101(32):11725-30.  
doi: [10.1073/pnas.0402374101](https://doi.org/10.1073/pnas.0402374101)

Nelson OL, Carsten E, Bentjen SA, Mealey KL. 2003. Ivermectin toxicity in an Australian Shepherd dog with the MDR1 mutation associated with ivermectin sensitivity in Collies. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 17:354-6.  
[doi:10.1111/j.1939-1676.2003.tb02461.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-1676.2003.tb02461.x)

Roulet A, Puel O, Gesta S, Lepage JF, Drag M, Soll M, Alvinerie M, Pineau T. 2003. MDR1-deficient genotype in Collie dogs hypersensitive to the P-glycoprotein substrate ivermectin. *European Journal of Pharmacology*. 460:85-91.  
[doi: 10.1016/S0014-2999\(02\)02955-2](https://doi.org/10.1016/S0014-2999(02)02955-2)

Schinkel AH. 1999. P-glycoprotein, a gatekeeper in the blood-brain barrier. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 36:179-94.  
[doi: 10.1016/S0169-409X\(98\)00085-4](https://doi.org/10.1016/S0169-409X(98)00085-4)

Stiedl C, Weber K. 2017. Fast and simple detection methods for the 4-base pair deletion of canine MDR1/ABCB1 gene by PCR and isothermal amplification. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 29(2):176-80.  
[doi: 10.1177/1040638716683213](https://doi.org/10.1177/1040638716683213)

## Material complementario

### Genotipificación por secuenciación directa

Los cebadores para la PCR fueron diseñados utilizando el programa Annhyb (<http://bioinformatics.org/annhyb/>) y la secuencia de ADN reportada en GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) (Tabla 1).

#### Reacción de PCR

- 20 ng de ADN
- *Buffer* de reacción 1X (50 mM KCl, 11 mM Tris, pH = 8,30)
- MgCl<sub>2</sub> 0,5 mM
- Potenciador (*enhancer*) 0,08X
- dNTP 100 μM de cada uno
- Cebadores 0,2 μM cada uno
- polimerasa Taq 0,75 U (Kit T-Holmes ADN polimerasa, INBIO Highway, Tandil, Argentina).

#### Condiciones de ciclado

- Desnaturalización inicial de 5 min a 94 °C
- 35 ciclos de
  - 30 s a 94 °C
  - 45 s a 58 °C
  - 45 s a 72 °C
- Elongación final de 10 min a 72 °C

Los productos de PCR fueron purificados con polietilenglicol (PEG) 8000 y secuenciados en un secuenciador automático Genetic Analyzer 3500 (Applied Biosystems®) utilizando el *kit* comercial (BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit – Applied Biosystem by Thermo Fisher Scientific).

Las secuencias fueron alineadas y analizadas utilizando los programas para análisis de secuencias DNAMAN 4.15, Lynnon BioSoft, Vaudreuil, Quebec, Canadá y Chromas 2.4, Technelysium, South Brisbane, Australia.

### Genotipificación por pirosecuenciación

Se llevó a cabo en dos etapas.

1) Condiciones de ciclado utilizando los cebadores específicos (F-*mdr1* y R-*mdr1*-M13):

- Desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C
- 15 ciclos de
  - 30 s a 94 °C
  - 45 s a 58 °C
  - 45 s a 72 °C

2) Incorporación de un cebador biotinilado M13-Biot con temperatura de hibridación de 52 °C.

#### Condiciones del ciclado

- 30 ciclos de
  - 30 s a 94 °C
  - 45 s a 52 °C
  - 45 s a 72 °C
- Elongación final de 72 °C 10 min.

Los productos de PCR fueron purificados captando los fragmentos biotinilados con perlas de sefarosa cubiertas con estreptavidina (Streptavidin Sepharose™ High Performance, GE Healthcare). Los fragmentos biotinilados se inmovilizaron y utilizaron como molde para realizar la reacción de pirosecuenciación, incorporando el cebador interno INT-*mdr1* (0,5 μM) usando el *kit* comercial (Pyro Gold Reagent Kit, Biotage, Uppsala, Suecia) y PyroMark Prep Workstation (QIAGEN, Hilden, Alemania). Las muestras se tipificaron en un pirosecuenciador PSQTM96 System instrument (QIAGEN) y los resultados se analizaron con el programa PSQ HS96A (QIAGEN).

# Efecto de la adición de agua electroactivada a la bebida de bovinos de engorde a corral (*feedlot*), en un establecimiento de la provincia de Buenos Aires

## *Effect of electrochemically activated water addition to the drinking water of feedlot cattle of Buenos Aires province*

PELLICER KE<sup>1\*</sup>, BRUSA V<sup>1</sup>, DE LA TORRE JH<sup>1</sup>, REAL D<sup>1</sup>, SILVESTRINI MP<sup>2,3</sup>, BAINOTTI CA<sup>2</sup>, OSELLA OE<sup>4</sup>, COPES J<sup>1</sup>

1. Laboratorio de Microbiología de Alimentos, Cátedra de Tecnología y Sanidad de los Alimentos; 2. Cátedra de Epidemiología Aplicada. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 3. Instituto de Investigación en Ciencias de la Salud, Escuela Superior en Ciencias de la Salud. Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires. 4. Actividad privada.

\* Correo electrónico de la autora de contacto: [pellicerk@fcv.unlp.edu.ar](mailto:pellicerk@fcv.unlp.edu.ar)

### Resumen

El objetivo general del trabajo fue evaluar el efecto del consumo de agua electroactivada (AE) en bovinos de engorde a corral (*feedlot*); los objetivos particulares fueron: 1. determinar la presencia de *E. coli* O157 y de *Salmonella* spp. en materia fecal y 2. determinar su eficiencia como promotora de crecimiento. Se utilizaron 150 bovinos divididos en 4 lotes (L). El L1 fue tratado con 0,3 %, 1,5 % y 3,0 % de AE; el L2 con 0,3 % y 1,5 %; el L3 con 0,3 % y el L4 no fue tratado. En cada visita se pesaron los animales y se obtuvieron muestras de materia fecal, y en la última también de sangre. En materia fecal se determinó la presencia de *E. coli* O157 y de *Salmonella* spp. En sangre se determinaron: pH, bicarbonato, sodio, potasio, cloro y hemoglobina total. Para el procesamiento de datos estadísticos se utilizó el programa Infostat. Con respecto a la ganancia de peso, la tendencia a favor del L2 y L3 a los 60 días de tratamiento, podría deberse al efecto promotor de crecimiento por el consumo de AE. Las muestras de materia fecal resultaron positivas para *E. coli* O157 en 3,3 % para el L2 a los 60 días, y para *Salmonella* spp. en 3,3 % y 1,6 % para los L3 y L4 a los 90 días de tratamiento, respectivamente. No se evidenciaron alteraciones en los valores de referencia de los parámetros sanguíneos evaluados. La adición de AE en el agua de bebida de bovinos de *feedlot* podría ser utilizada como promotora de crecimiento.

### Palabras clave

agua electroactivada, *feedlot*, bovinos, *E. coli*, *Salmonella* spp., promotor de crecimiento

### Abstract

The general objective of the work was to evaluate the consumption of electroactivated water (AE) in feedlot cattle; the particular objectives were: 1. to determine the presence of *E. coli* O157 and *Salmonella* spp. in feces and 2. determine its efficiency as a promoter of growth. One hundred and fifty animals were grouped into 4 lots (L). The L1 was treated with 0.3 %, 1.5 % and 3.0 % of EAW; L2 with 0.3 % and 1.5 %; L3 with 0.3 % and L4 was not treated. In each of the 4 visits to the feedlot the animals were weighed and fecal samples were taken. Also, in the 4th visit, blood samples were taken. Fecal samples were analyzed to determine the presence of *E. coli* O157 and *Salmonella* spp. In the blood samples, pH, bicarbonate, sodium, potassium, chlorine, and total hemoglobin were determined. Data were analyzed using Infostat software. With respect to weight gain, tendency in favor of L2 and L3 after 60 days of treatment could be due to the growth promoter effect of EAW consumption. Fecal samples were positive for *E. coli* O157 in 3.3% for L2 at 60 days, and for *Salmonella* spp. in 3.3% and 1.6% for L3 and L4 after 90 days of treatment, respectively. No alterations were observed in the reference values of the evaluated blood parameters. The addition of EAW to the drinking water of feedlot cattle could be used as a growth promoter.

### Key words

electroactivated water, feedlot, cattle, *E. coli*, *Salmonella* spp., growth promoter

Fecha de recepción: 06/03/2018

ANALECTA VET 2018; 38(1): 9-15

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

Fecha de aprobación: 24/05/2018

doi.org/10.24215/15142590e020



## Introducción

El agua electroactivada (AE) es un producto obtenido por medio del pasaje de una solución saturada de cloruro sódico diluida en agua de red, a través de una celda de electrólisis diafragmática. Las soluciones producidas se llaman fracción anódica y catódica, por el signo de carga del electrodo en el que se sintetizan. De esta forma se consigue una solución desinfectante (fracción anódica) a partir de agua corriente, sin aditivos químicos, por lo que no hay necesidad de manipular productos potencialmente peligrosos tales como el cloro. La fracción anódica (AE propiamente dicha) obtenida en este proceso es ácido hipocloroso, de pH neutro y con potencial Redox de +850 a +1000 mV.

Los promotores de crecimiento son frecuentemente utilizados en la producción animal para mejorar la ganancia diaria de peso. En general son productos antibióticos y/o bactericidas y traen aparejadas algunas desventajas como por ejemplo la resistencia antimicrobiana (Hughes & Heritage). El AE ha sido utilizada como promotora del crecimiento ofreciendo buenos resultados en pollos de engorde y también se utilizó para mejorar la calidad de la leche en vacas de tambo (Holcroft, 2003; Ferguson *et al.*, 2008). A diferencia de los promotores de crecimiento tradicionales, el AE es un producto antimicrobiano natural, innovador y eficaz obtenido con una tecnología simple y de bajo costo (Tabernerero de Paz *et al.*, 2013).

El AE se plantea también como una alternativa a ser utilizada como higienizante del agua de bebida y como agente de limpieza y desinfección de las instalaciones ganaderas (Bartolomé *et al.*, 2011; Envirolife, 2017). Diferentes trabajos han demostrado el efecto antimicrobiano del AE siendo eficaz, segura, fácil de manipular, relativamente barata y ecológica (Botta *et al.*, 2018; FSIS, 2017; Perry & Yousef, 2011). Estudios previos demostraron que el AE es altamente efectiva en la eliminación de *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* y *Listeria monocytogenes*, lo que indica su potencial aplicación para la descontaminación de los alimentos (Venkitanarayanan *et al.*, 1999). Su eficacia no es provocada por el desencadenamiento de reacciones químicas, sino que actúa como simple portador del agente activo (ácido hipocloroso) ya estabilizado.

Los objetivos del control microbiológico de los alimentos son asegurar la inocuidad alimentaria y estimar la vida útil y estabilidad del alimento. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la inocuidad alimentaria se define como “la garantía de que los alimentos no causarán daño al consumidor cuando se preparen y/o consuman de acuerdo con el uso a que se destinan”. *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC) y *Salmonella* spp. son bacterias patógenas que han sido asociadas con infecciones en humanos debido al consumo de productos alimenticios de origen

bovino (Caprioli *et al.*, 2005; Herikstad *et al.*, 2008). STEC O157 es un agente patógeno emergente asociado a enfermedades transmitidas por alimentos (ETA) (EFSA, 2009). STEC produce una amplia variedad de afecciones humanas: casos esporádicos de diarrea leve autolimitante o brotes de diarrea, colitis hemorrágica, púrpura trombótica trombocitopénica o síndrome urémico hemolítico (SUH) (Karmali *et al.*, 2010). Los rumiantes en general, y el ganado bovino en particular, han sido identificados como el mayor reservorio de STEC (Ferens & Hovde, 2011). La contaminación de las carcasas puede ocurrir durante el procesamiento en el frigorífico (O'Brien *et al.*, 2005). La mayoría de los animales a partir de los cuales se han aislado cepas de STEC son portadores asintomáticos de la bacteria. Sin embargo, hay excepciones como es el caso de los neonatos bovinos en los cuales cepas O157:H7 pueden producir enterocolitis (Dean-Nystrom *et al.*, 1997).

*Salmonella* spp. es una bacteria patógena responsable de ETA. Diferentes estudios han demostrado la presencia de *Salmonella* spp. en heces de bovinos (Ramoneda *et al.*, 2013; Agga *et al.*, 2016; Smith *et al.*, 2016). La salmonelosis es un importante problema de salud pública en todo el mundo. Esta enfermedad ha sido asociada con el consumo de alimentos contaminados, principalmente de origen animal (aves, bovinos y cerdos), como también por el contacto directo con animales infectados (Bou-chrif *et al.*, 2009; Fey *et al.*, 2000; Bartholomew *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2001). Los animales enfermos y los portadores asintomáticos pueden eliminar *Salmonella* spp. a través de las heces y esta bacteria puede sobrevivir durante largo tiempo en el ambiente (Wray & Wary, 2000).

El objetivo general del trabajo fue evaluar el efecto del consumo de agua electroactivada (AE) en bovinos de feedlot; los objetivos particulares fueron: 1. determinar la presencia de *E. coli* O157 y de *Salmonella* spp. en materia fecal y 2. determinar su eficiencia como promotora de crecimiento.

## Materiales y métodos

### Animales

El trabajo experimental se realizó en un *feedlot* ubicado en el partido de General Belgrano, provincia de Buenos Aires, entre los meses de septiembre y diciembre del año 2015. Se utilizaron 150 bovinos raza Aberdeen Angus, que arribaron al establecimiento en ayunas, 12 horas previas al comienzo del ensayo. Todos los animales provenían de un campo de recría, pertenecientes a la misma empresa y fueron agrupados al azar en 4 lotes. Los lotes (L) fueron homogéneos en cuanto a peso, estado general y conformación, tanto intra como inter lote al inicio del experimento (Día 0). El peso vivo promedio de los animales al comienzo del estudio fue de 260 kilos. Para determinar el

efecto promotor de crecimiento del AE, en cada visita al establecimiento se pesaron todos los animales de un mismo lote en una báscula en grupos de 5 para determinar la ganancia de peso mensual.

Los L1 (n=30), L2 (n=30) y L3 (n=30) se sometieron a diferentes concentraciones de AE adicionada al agua de bebida (Tabla 1) y el L4 (n=60) se utilizó como lote control sin tratamiento. El suministro de agua de los corrales que ocuparon los lotes fue a través de un tanque en el cual se dosificó el porcentaje de AE correspondiente para cada mes de tratamiento, con una cañería de alimentación de los bebederos con una llave exclusiva en cada caso. Los corrales contaron con otro bebedero secundario al cual se suministró agua sin tratar cuando no correspondiera el tratamiento.

**Tabla 1.** Esquema de tratamiento con diferentes concentraciones de agua electroactivada en el agua de bebida de bovinos en *feedlot*

Lote (n=)	Día 0	Día 30	Día 60
1 (30)	0,3 %	1,5 %	3,0 %
2 (30)	0,3 %	1,5 %	0,0 %
3 (30)	0,3 %	0,0 %	0,0 %
4 (60)	-	-	-

El AE que se utilizó para el presente estudio fue elaborada por un equipo de origen ruso provisto por la empresa Let Americana, que se encuentra en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP.

Se realizaron 4 visitas al establecimiento en el periodo de estudio. En cada visita se obtuvieron muestras individuales de materia fecal del recto de todos los bovinos y se colocaron en bolsas plásticas estériles, identificadas para cada animal. Las muestras fueron transportadas refrigeradas al Laboratorio de Microbiología de los Alimentos, Facultad de Ciencias Veterinarias, UNLP, donde fueron procesadas dentro de las 24 horas de recolectadas.

### Análisis microbiológicos y PCR

Para el aislamiento de *E. coli* O157 se realizó un primer paso de enriquecimiento selectivo. Diez gramos de muestra se colocaron en una bolsa de muestreo estéril y se le adicionaron 90 ml de caldo tripticasa soya modificado con novobiocina (8 mg L<sup>-1</sup>) (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EE. UU.). Las muestras fueron incubadas a 42 °C durante 24 horas. Luego de la incubación, a partir de 1 ml del caldo de enriquecimiento, se realizó la técnica de separación inmuno-

magnética y posterior siembra en estría por agotamiento en placas de agar MacConkey sorbitol suplementado con telurito de potasio y cefixime (SMAC-CT, Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EE.UU.) y agar SD-39 (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EE.UU.). Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C. Luego de la incubación, a partir de cada placa se seleccionó un máximo de 30 colonias típicas y se sembraron en una placa cuadrada de SMAC-CT. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C. Luego de la incubación se armaron 3 conjuntos de 10 colonias cada uno, a los que se les realizó la extracción de ADN mediante ebullición a 100 °C durante 15 minutos, en 150 µl de buffer Tritón X-100 al 1 % en buffer TE 1X [10 mM TrisHCl (pH 8,0); 1 mM EDTA (pH 8,0)]. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados a 10000 rpm durante 5 minutos para sedimentar los restos celulares. Los extractos de ADN de los conjuntos fueron analizados mediante PCR múltiple para la detección de los genes *stx1*, *stx2* y *rfb*<sub>O157</sub> (Leotta et al., 2005). Para identificar la colonia *stx/rfb*<sub>O157</sub>, se analizó cada colonia del conjunto positivo mediante PCR múltiple. Se utilizaron tres pares de oligonucleótidos cebados, un par para amplificar un fragmento del gen *stx1*, correspondiente a la subunidad B de la toxina Stx1, otro par para amplificar un fragmento del gen *stx2*, correspondiente a la subunidad A de Stx2 y el tercer par para amplificar un fragmento del gen *rfb*O157 correspondiente a una proteína involucrada en la síntesis del lipopolisacárido O157. Como control positivo se utilizó una cepa control *E. coli* EDL 933.

Para el aislamiento de *Salmonella* spp. se realizó un primer paso de pre-enriquecimiento. Diez gramos de muestra se colocaron en una bolsa de muestreo estéril y se le adicionaron 90 ml de agua peptonada tamponada estéril (APB) (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EE.UU.). Las muestras fueron incubadas a 37 °C durante 24 horas. Luego de la incubación se realizó el enriquecimiento selectivo colocando 1 ml del caldo de pre-enriquecimiento en tubos con 10 ml de caldo tetracionato (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EE.UU.) y 100 µl del caldo de pre-enriquecimiento en tubos con 10 ml de caldo Rappaport (Acumedia Manufactures Inc., Lansing, Michigan, EE.UU.).

### Muestras sanguíneas y análisis bioquímicos

En la última visita se recolectaron muestras de sangre mediante punción de la vena coccígea de 5 animales de cada uno de los lotes L1, L2 y L3, y de 10 animales del L4 (n= 25). En las muestras de sangre se determinaron 6 parámetros fisiológicos para verificar alteraciones en los valores de referencia por el consumo de agua con adición de AE. Los parámetros evaluados fueron:

pH, bicarbonato ( $\text{HCO}_3$ ), sodio (Na), potasio (K), cloro (Cl) y hemoglobina total (tHB). Para las determinaciones se utilizó el equipo OPTI® CCA-TS2 Blood Gas and Electrolyte Analyzer (IDEXX Laboratories, Inc., Atlanta, Georgia, EE.UU.).

### Análisis estadístico

Para el análisis estadístico, las variables categóricas se resumieron mediante porcentajes, mientras que las variables continuas normalmente distribuidas se presentaron como promedios  $\pm$  desviaciones estándar. Se analizaron con la prueba de Análisis de Varianza (diseño no balanceado) y la prueba para el contraste de hipótesis a posteriori en caso de presentar diferencias significativas. Para el procesamiento de datos se utilizó el programa Infostat (<http://www.infostat.com.ar/>).

### Resultados

Los resultados del control de peso de los animales pertenecientes a cada lote fueron presentados y analizados para observar el comportamiento a lo largo del período de estudio (Tabla 2 y Figura 1). Al día 30 de tratamiento, no se encontraron diferencias significativas de los 4 lotes ( $p > 0,05$ ) (Tabla 2), mientras que a los 60 días se observaron diferencias significativas entre el L1 y los tratamientos L2, L3 y L4 ( $p=0,0013$ ). Luego de 60 días se observó un descenso del peso vivo en los animales del grupo L3, mientras que el grupo testigo continuó en aumento, sin que se encontraran diferencias significativas entre los lotes a los 90 días ( $p > 0,1667$ ), aunque el L1 fue, de los grupos tratados, el que presentó un descenso más lento.

**Tabla 2.** Peso promedio en kilos de grupos de 5 bovinos de cada lote sometidos a 4 tratamientos con agua electroactivada en el agua de bebida.

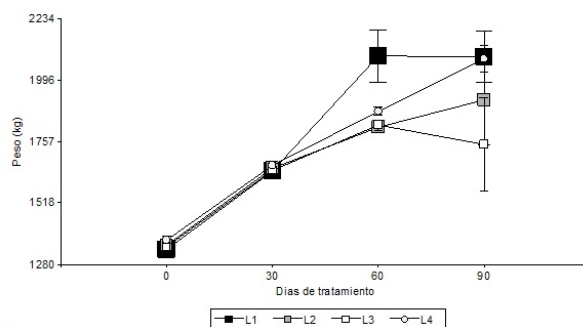
Lote (n=)	Día 0	Día 30	Día 60	Día 90
1 (30)	1337,3 $\pm$ 34,5 <sup>a</sup>	1643,7 $\pm$ 36,0 <sup>a</sup>	2088,3 $\pm$ 250,8 <sup>a</sup>	2086,0 $\pm$ 246,6 <sup>a</sup>
2 (30)	1354,0 $\pm$ 41,9 <sup>a</sup>	1655,0 $\pm$ 42,1 <sup>a</sup>	1814,0 $\pm$ 51,5 <sup>b</sup>	1918,7 $\pm$ 428,8 <sup>a</sup>
3 (30)	1349,0 $\pm$ 44,1 <sup>a</sup>	1644,0 $\pm$ 49,7 <sup>a</sup>	1821,0 $\pm$ 47,6 <sup>b</sup>	1746,7 $\pm$ 441,6 <sup>a</sup>
4 (60)	1374,2 $\pm$ 46,7 <sup>a</sup>	1666,2 $\pm$ 28,1 <sup>a</sup>	1875,2 $\pm$ 53,4 <sup>b</sup>	2078,0 $\pm$ 170,7 <sup>a</sup>

<sup>a</sup>Promedio  $\pm$  desvío estándar. Letras distintas por columna indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 3.** Estadística descriptiva de los parámetros bioquímicos en sangre de bovinos en feedlot sometidos a tratamiento con agua electroactivada.

Lotes	1	2	3	4	p
pH	7,35 $\pm$ 0,03	7,32 $\pm$ 0,09	7,32 $\pm$ 0,02	7,38 $\pm$ 0,03	0,06
$\text{HCO}_3$ (mEq/L)	26,18 $\pm$ 1,13	25,88 $\pm$ 2,06	23,9 $\pm$ 3,97	25,1 $\pm$ 3,39	0,64
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	144,20 $\pm$ 4,32	145,60 $\pm$ 1,67	145,00 $\pm$ 2,55	145,70 $\pm$ 1,77	0,74
K <sup>+</sup> (mmol/L)	4,46 $\pm$ 1,26	4,72 $\pm$ 0,80	5,58 $\pm$ 1,15	4,42 $\pm$ 0,61	0,15
Cl <sup>-</sup> (mEq/L)	109,00 $\pm$ 2,55	109,40 $\pm$ 1,67	109,80 $\pm$ 1,92	109,40 $\pm$ 1,35	0,92
tHB (g/dL)	13,52 $\pm$ 0,53	14,08 $\pm$ 0,77	12,30 $\pm$ 3,01	13,25 $\pm$ 2,44	0,61

Los parámetros evaluados fueron: pH, ( $\text{HCO}_3$ ), sodio (Na), potasio (K), cloro (Cl), hemoglobina total (tHB). Datos expresados en media  $\pm$  desvío estándar.



**Figura 1.** Gráfico de la progresión de los pesos por grupo de 5 animales de cada lote mes a mes (promedio  $\pm$  desvío estándar).

Las muestras de materia fecal resultaron positivas a *E. coli* O157 (*stx2*) en 3,3 % para el L2 a los 60 días y a *Salmonella* spp. en 3,3 % y 1,6 % para el L3 y el lote control a los 90 días, respectivamente.

Los resultados estadísticos descriptivos de los parámetros bioquímicos en sangre de los bovinos sometidos a tratamiento con AE se presentan en la Tabla 3.

### Discusión

Del análisis de los resultados de la administración de AE a bovinos de *feedlot* se desprenden varios puntos a considerar, entre ellos los referidos a la ganancia de peso. La tendencia a favor del L2 y L3 a los 60 días de tratamiento, podría deberse a un tipo de efecto promotor de crecimiento en los novillos por el consumo de AE, aunque es necesario realizar estudios adicionales para corroborarlo, ya que el L1 que presentó mayor peso promedio fue el que recibió el tratamiento más prolongado. Los resultados de Bartolomé *et al.* (2011) e Ichinohe *et al.* (2004), indican que el AE podría tener un efecto sobre la actividad y eficacia de la microflora ruminal, lo que podría explicar el efecto promotor. De acuerdo con esto, el descenso de peso del L3, luego de los 60 días de tratamiento, coincide con la interrupción del consumo del AE 30 días antes. A partir del día 60 de ensayo, el L4 mantuvo un aumento de peso lineal sostenido alcanzando el peso final equivalente al L1, aunque resulta importante destacar que ese aumento fue más lento durante todo el ensayo. Por lo tanto, el tratamiento ininterrumpido con AE permitiría acortar el tiempo de terminación del animal y por ende reducir costos. De acuerdo con Taberner de Paz *et al.* (2013), son escasos los trabajos que evalúen los efectos del AE sobre la productividad y rendimiento de los animales de abasto cuando se dosifica en el agua de bebida, siendo el presente trabajo de interés al respecto. Los resultados aquí presentados coinciden con estudios previos realizados en vacas lecheras, los cuales reportaron un aumento en la



ganancia diaria de peso cuando se les suministró AE en el agua de bebida (D'Amico, 2003; Bartolomé *et al.*, 2011).

De acuerdo con el Código Alimentario Argentino (CAA), cinco muestras de 65 y de 10 gramos de carne picada deben estar libres de *E. coli* O157 y *Salmonella* spp., respectivamente. Estas bacterias, que han sido reportadas en materia fecal de bovino en todo el mundo, pueden contaminar la carne durante la faena y procesamiento en frigorífico cuando el contenido intestinal contacta con la carcasa del animal portador. En el presente trabajo, se obtuvo 3,3 % de *E. coli* O157 para el L2 a los 60 días de tratamiento y el 3,3 % y 1,6 % de *Salmonella* spp. a los 90 días de tratamiento para los L3 y L4, respectivamente. La presencia de estas bacterias en la materia fecal de los novillos estudiados es inferior a la reportada por otros autores. Paiba *et al.* (2002) y Biruhtesfa *et al.* (2017) analizaron muestras de materia fecal de bovinos en frigoríficos de Gran Bretaña y Etiopía, obteniendo una prevalencia de *E. coli* O157 de 4,7 % a 5,2 %. En Estados Unidos y Venezuela se reportó una prevalencia de *Salmonella* en materia fecal de bovinos de 9,1 % y 13,7 % (Narváez-Bravo *et al.*, 2013; Dargatz *et al.*, 2016). Las variaciones en la prevalencia de estas bacterias patógenas pueden deberse a la categoría de animal, a la época del año durante la que se realiza la evaluación, al estrés del transporte asociado a un aumento de la eliminación, a factores dietarios o a la adición de AE en el agua de bebida (Ekong *et al.*, 2015; Schuehle Pfeiffer *et al.*, 2009; Dargatz *et al.*, 2016). *E. coli* O157 y *Salmonella* spp. han sido asociadas a ETA en todo el mundo, siendo la carne uno de los alimentos implicados. Si bien los resultados obtenidos en el presente trabajo difieren de estudios previos, es necesaria la aplicación de buenas prácticas de higiene durante el proceso de faena para evitar la contaminación de la carne.

Un estudio previo en vacas lecheras concluye que el AE afecta al equilibrio ácido-base sanguíneo (Bartolomé *et al.*, 2011). Sin embargo, en el presente trabajo no se evidenciaron alteraciones en los valores de referencia de los parámetros sanguíneos evaluados. Nuestros resultados coinciden con estudios realizados para evaluar los efectos del AE de diferentes pH, cuando se dosifica en el agua de bebida a concentraciones variables en animales de laboratorio, perros y pollos (Inagaki *et al.*, 2011; Morita *et al.*, 2011; Yanagihara *et al.*, 2005; Taberero de Paz *et al.*, 2013; Abol-Enein *et al.*, 2009; Surdu *et al.*, 2008).

## Conclusiones

Se concluye que la adición de AE en el agua de bebida de bovinos de *feedlot* no produce alteraciones en los valores de referencia de los parámetros sanguíneos evaluados. De la misma manera, tampoco se evidenciaron modificaciones en la portación fecal de *E. coli* O157 y *Salmonella*

spp. Se propone continuar esta investigación para comparar un tratamiento de 60 días al final del engorde para establecer si es la etapa más adecuada para su empleo como promotor de crecimiento, al mismo tiempo que podría compararse con un tratamiento equivalente a L1 a efectos de considerar cuál de ellos produce mayor beneficio en la disminución del tiempo necesario para terminar los animales. Por todo lo expuesto consideramos que, si bien es necesario profundizar las investigaciones en el uso del AE como promotora de crecimiento, los resultados obtenidos en el presente trabajo son alentadores y no deberían desestimarse.

## Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existen conflictos 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.

## Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de la Estancia La Verde de Blasfer S.A., partido de General Belgrano, Provincia de Buenos Aires, por su inestimable aporte para la realización del presente trabajo.

## Bibliografía

- Abol-Enein H, Gheith OA, Barakat N, Nour E, Sharaf AE. 2009. Ionized alkaline water: new strategy for management of metabolic acidosis in experimental animals. *Therapeutic Apheresis and Dialysis*. 13(3):220-4.  
doi: 10.1111/j.1744-9987.2009.00659.x
- Abu Aboud OA, Adaska JM, Williams DR, Rossitto PV, Champagne JD, Lehenbauer TW, Atwill R, Li X, Aly SS. 2016. Epidemiology of *Salmonella* sp. in California cull dairy cattle: prevalence of fecal shedding and diagnostic accuracy of pooled enriched broth culture of fecal samples. *PeerJ*. 30(4):e2386.  
doi: 10.7717/peerj.2386
- Agga GE, Arthur TM, Schmidt JW, Wang R, Brichta-Harhay DM. 2016. Diagnostic accuracy of rectoanal mucosal swab of feedlot cattle for detection and enumeration of *Salmonella enterica*. *Journal of Food Protection*. 79(4):531-7.  
doi: 10.4315/0362-028X.JFP-15-409
- Bartholomew ML, Heffernan RT, Wright JG, Klos RF, Monson T, Khan S, Trees E, Sabol A, Willems RA, Flynn R, Deasy MP, Jones B, Davis JP. 2004. Multistate outbreak of *Salmonella enterica*



serotype enteritidis infection associated with pet guinea pigs. *Vector-Borne and Zoonotic Diseases*. 14(6):414-21.

doi: [10.1089/vbz.2013.1506](https://doi.org/10.1089/vbz.2013.1506)

Bartolomé D, Posado R, Rodríguez L, Bueno F, Olmedo S, García JJ, Martín-Diana AB. 2011. Efecto higienizante del agua electrolizada sobre el agua de bebida y la calidad higiénico sanitaria de la leche. AIDA, XIV Jornadas sobre Producción Animal. Zaragoza. España. Tomo I:16-18.

Biruhtesfa A, Degmawi P, Mesele A, Genene T, Dereje H, Surafel K, Kebede A. 2017. Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle feces and contamination of carcass and various contact surfaces in abattoir and butcher shops of Hawassa, Ethiopia. *BioMed Central Microbiology*. 17:24.

doi: [10.1186/s12866-017-0938-1](https://doi.org/10.1186/s12866-017-0938-1)

Botta C, Ferrocino I, Cavallero MC, Riva S, Giordano M, Cocolin L. 2018. Potentially active spoilage bacteria community during the storage of vacuum packaged beefsteaks treated with aqueous ozone and electrolyzed water. *International Journal of Food Microbiology*. 266:337-45.

doi: [10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.012](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.012)

Bouchrif B, Le Hello S, Pardos M, Karraouan B, Perrier-Gros-Claude JD, Ennaji MM, Timinouni M, Weill FX. 2009. Ceftazidime-resistant *Salmonella enterica*, Morocco. *Emerging Infectious Diseases*. 15(10):1693-5.

doi: [10.3201/eid1510.090247](https://doi.org/10.3201/eid1510.090247)

Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary Research*. 36(3): 289-311.

doi: [10.1051/vetres:2005002](https://doi.org/10.1051/vetres:2005002)

Código alimentario argentino (Ley N° 18284/69), artículo 255. Capítulo VI. Alimentos cárneos y afines. CAA. Disponible en: [http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo\\_VI\\_2017.pdf](http://www.anmat.gov.ar/alimentos/codigoa/Capitulo_VI_2017.pdf). Fecha de acceso: 20-12-17

Dargatz DA, Koprak CA, Erdman MM, Fedorka-Cray PJ. 2016. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from cattle feces in United States feedlots in 2011. *Foodborne Pathogen and Disease*. 13(9):483-9.

doi: [10.1089/fpd.2016.2128](https://doi.org/10.1089/fpd.2016.2128)

Dean-Nystrom EA, Bosworth BT, Cray WC Jr, Moon HW. 1997. Pathogenicity of *Escherichia coli* O157:H7 in the intestines of neonatal calves. *Infection and Immunity*. 65(5):1842-8.

D'Amico, T. 2003. The drinking water facts. *Health BioNatural The Drinking Water FACT S.pdf*. Disponible en: <http://members.iinet.net.au/~sambrod/>. Fecha de acceso: 19/12/17.

Ekong PS, Sanderson MW, Cernicchiaro N. 2015. Prevalence and concentration of *Escherichia coli* O157 in different seasons and cattle types processed in North America: A systematic review and meta-analysis of published research. *Preventive Veterinary Medicine*. 121(1-2):74-85.

doi: [10.1016/j.prevetmed.2015.06.019](https://doi.org/10.1016/j.prevetmed.2015.06.019)

Envirolife. Instalación del primer equipo de Aguas Electroactivadas en Catamarca. Disponible en: <http://envirolife.com.ar/aguas-electroactivadas-equipo/>. Fecha de acceso: 19-12-17

European Food Safety Authority (EFSA). Scientific report of EFSA. 2009. Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food).

doi: [10.2903/j.efsa.2009.1366](https://doi.org/10.2903/j.efsa.2009.1366)

Ferens WA, Hovde CJ. 2011. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathogen and Disease*. 8(4): 465-87.

doi: [10.1089/fpd.2010.0673](https://doi.org/10.1089/fpd.2010.0673)

Ferguson JD, Remsberg D, Wu Z. 2008. Influence of electrolyzed alkaline water on milk production in dairy cows. *Journal of Animal Science*. 91:609.

Fey PD, Safranek TJ, Rupp ME, Dunne EF, Ribot E, Iwen PC, Bradford PA, Angulo FJ, Hinrichs SH. 2000. Ceftriaxone-resistant *Salmonella* infection acquired by a child from cattle. *The New England Journal of Medicine*. 342(17):1242-9.

doi: [10.1056/NEJM200004273421703](https://doi.org/10.1056/NEJM200004273421703)

FSIS. 2017. Directive 7120.1. Rev. 43. Safe and suitable ingredients used in the production of meat, poultry, and egg products.

Herikstad H, Motarjemi Y, Tauxe RV. 2002. *Salmonella* surveillance: a global survey of public health serotyping. *Epidemiology & Infection*. 129(1):1-8.

doi: [10.1017/S0950268802006842](https://doi.org/10.1017/S0950268802006842)

Holcroft JJMS. 2003. Effect of anolyte on broiler performance. Tesis de Maestría de Filosofía. Universidad de Stellenbosch. South Africa.

Hughes P, Heritage J. Antibiotic growth-promoters in food animals. Disponible en: [http://www.fao.org/docrep/ARTICLE/AGRIPPA/555\\_EN.HTM](http://www.fao.org/docrep/ARTICLE/AGRIPPA/555_EN.HTM). Fecha de acceso: 19-12-17.

Ichinohe T, Gotou M, Fujihara T. 2004. Influences of basic electrolyzed water on water absorption, ruminal environment, microbial yield and nitrogen balance in sheep. *Animal Science Journal*. 75: 67-76.

Inagaki H, Shibata Y, Obata T, Kawagoe M, Ikeda

- K, Sato M, Toida K. 2011. Effects of slightly acidic electrolysed drinking water on mice. *Laboratory Animals*, 45(4):283-5.  
doi: [10.1258/la.2011.010122](https://doi.org/10.1258/la.2011.010122)
- Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. 2010. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*. 140(3-4):360-70.  
doi: [10.1016/j.vetmic.2009.04.011](https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.04.011)
- Leotta GA, Chinen I, Epszteyn S, Miliwebsky E, Melamed IC, Motter M. 2005. Validation of a multiplex PCR for detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Revista Argentina de Microbiología*. 37(1):1-10.
- Morita C, Nishida T, Ito K. 2011. Biological toxicity of acid electrolyzed functional water: Effect of oral administration on mouse digestive tract and changes in body weight. *Archives Oral Biology*. 56(4):359-66.  
doi: [10.1016/j.archoralbio.2010.10.016](https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2010.10.016)
- Narváez-Bravo C, Miller MF, Jackson T, Jackson S, Rodas-Gonzalez A, Pond K, Echeverry A, Brashears MM. 2013. *Salmonella* and *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in cattle and on carcasses in a vertically integrated feedlot and harvest plant in Mexico. *Journal of Food Protection*. 76(5):786-95.  
doi: [10.4315/0362-028X.JFP-12-079](https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-079)
- O'Brien SB, Duffy G, Carney E, Sheridan JJ, McDowell DA, Blair IS. 2005. Prevalence and numbers of *Escherichia coli* O157 on bovine hides at a beef slaughter plant. *Journal of Food Protection*. 68(4):660-5.
- Paiba GA, Gibbens JC, Pascoe SJ, Wilesmith JW, Kidd SA, Byrne C, Ryan JB, Smith RP, McLaren M, Futter RJ, Kay AC, Jones YE, Chappell SA, Willshaw GA, Cheasty T. 2002. Faecal carriage of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in cattle and sheep at slaughter in Great Britain. *Veterinary Record*. 150(19): 593-8.
- Perry JJ, Yousef AE. 2011. Decontamination of raw foods using ozone-based sanitization techniques. *Annual Review of Food Science and Technology*. 2: 281-98.  
doi: [10.1146/annurev-food-022510-133637](https://doi.org/10.1146/annurev-food-022510-133637)
- Ramonedá M, Foncuberta M, Simón M, Sabaté S, Herrera S, Landa B, Musté N, Martí R, Trabado V, Carbonell O, Vila M, Espelt M, Ramírez B, Durán J. 2013. Prevalence of verotoxigenic *Escherichia coli* O157 (VTEC O157) and compliance with microbiological safety standards in bovine carcasses from an industrial beef slaughter plant. *Letter in Applied Microbiology*. 56(6):408-13.  
doi: [10.1111/lam.12062](https://doi.org/10.1111/lam.12062)
- Roy R, Higgins R, Fortin M, Tardif S. 2001. *Salmonella* give infection in 2 dairy herds. *Canadian Veterinary Journal*. 42(6):468-70.
- Smith AB, Renter DG, Cernicchiaro N, Shi X, Nagaraja TG. 2016. Prevalence and quinolone susceptibilities of *Salmonella* isolated from the feces of preharvest cattle within feedlots that used a fluoroquinolone to treat bovine respiratory disease. *Foodborne Pathogen and Disease*. 13(6): 303-8.  
doi: [10.1089/fpd.2015.2081](https://doi.org/10.1089/fpd.2015.2081)
- Surdu I, Vatuiu I, Jurcoane S, Ciocîrlan A. 2008. Modern methods ensuring sanitary veterinary protection for animal farms, based on using of electrolyzed water. 7th International Symposium of Animal Nutrition and Biology. Balotesti, Rumania. 25-26 September. Disponible en: <http://www.enviolytecanada.com/wp-content/uploads/2015/03/EnviroNize-Enviolyte-Poultry-Case-Study-Abstract-Modern-methods-sanitary-veterinary-protection-using-ELECTROLYZED-WATER-Romania-s.pdf>. Fecha de acceso: 19-12-17
- Tabernero de Paz MJ, Bodas R, Bartolomé D, Posado R, García JJ, Olmedo S. 2013. Agua electrolizada como higienizante en producción animal: efectos en sanidad y productividad. *Revista Archivos de Zootecnia*. 62(R):13-23.
- Venkitanarayanan KS, Ezeike GO, Hung YC, Doyle MP. 1999. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis*, and *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 65(9):4276-9.
- Wray C, Wary A. 2000. *Salmonella* in domestic animals. Wallingford, CABI Publishing.
- Yanagihara T, Arai K, Miyamae K, Sato B, Shudo T, Yamada M, Aoyama M. 2005. Electrolyzed hydrogen-saturated water for drinking use elicits an antioxidative effect: a feeding test with rats. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*. 69(10): 1985-7.  
doi: [10.1271/bbb.69.1985](https://doi.org/10.1271/bbb.69.1985)

# Uso de la técnica CLARITY para la identificación de marcadores fluorescentes en cortes gruesos de la médula espinal

## *Use of the CLARITY technique for identifying fluorescent markers on thick slices of spinal cord*

SISTI MS<sup>1,3\*</sup>, NISHIDA F<sup>1,3</sup>, ZANUZZI CN<sup>1,2,3</sup>, PORTIANSKY EL<sup>1,3</sup>

1. Laboratorio de Análisis de Imágenes. 2 Cátedra de Histología y Embriología. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. 3 Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Argentina.

\* Correo electrónico de la autora de contacto: [mssisti@fcv.unlp.edu.ar](mailto:mssisti@fcv.unlp.edu.ar)

---

### Resumen

El estudio de las interconexiones que establecen las neuronas entre sí o con las células de la glía es uno de los mayores desafíos de la neurociencia. Los anticuerpos fluorescentes permiten la identificación y localización de diferentes estructuras tisulares. Sin embargo, su uso eficiente requiere de la utilización de cortes delgados de muestras, que constituyen una limitación para el estudio de las interconexiones en el sistema nervioso. Asimismo, un mayor espesor de la muestra limita la penetración de la luz emitida por el microscopio, mientras que la opacidad propia del tejido nervioso debida a su alto contenido lipídico dificulta la adquisición de las imágenes al restringir la resolución de los objetos. La técnica CLARITY (del inglés, *Clear, Lipid-exchanged, Acrylamide-hybridized Rigid, Imaging/Immunostaining/In situ hybridization-compatible, Tissue hYdrogel*) permite subsanar estos inconvenientes. Esta técnica fue adaptada en nuestro laboratorio para el estudio de la médula espinal de rata. De acuerdo con el procedimiento realizado, pudimos obtener un órgano completamente translúcido, estructuralmente intacto y que permitió su procesamiento mediante técnicas de inmunofluorescencia y de lectinohistoquímica sin mayores dificultades. A partir de muestras de más de 1 mm de espesor se obtuvieron imágenes confocales de gran resolución y de mayor penetrabilidad que las que se obtienen utilizando las técnicas de procesamiento convencionales. La implementación de esta técnica en nuestro laboratorio permitirá optimizar la información obtenida a partir de muestras de interés.

### Palabras clave

Fluorescencia, microscopía confocal, procesamiento, análisis de imágenes

---

### Abstract

The study of the interconnections established between neurons themselves and with glial cells is one of the major challenges of neuroscience. Fluorescent antibodies allow identification and localization of different tissue structures. However, their efficient employment requires the use of thin sections of samples, which constitute a limitation for the study of nervous system interconnections. Likewise, increased thickness of samples limits penetration of the light emitted by the microscope, whereas the opacity of the nervous tissue due to its high lipid content limits the resolution of objects, making the acquisition of images difficult. The CLARITY (Clear, Lipid-exchanged, Acrylamide-hybridized Rigid, Imaging/Immunostaining/In situ hybridization-compatible, Tissue hYdrogel) technique makes possible to remedy these disadvantages. This technique was adapted in our laboratory for the study of the rat spinal cord. According to the described procedure we obtained a completely translucent and structurally intact organ that allowed processing through immunofluorescence and lectinohistochemistry techniques without major drawbacks. Confocal images of higher resolution and greater penetrability in comparison with those captured using conventional processing techniques were obtained from more than 1 mm thick samples. The implementation of this technique in our laboratory will improve the information obtained from our samples of interest.

### Key words

Fluorescence, confocal microscopy, processing, image analysis

---

Fecha de recepción: 27/12/2017

ANALECTA VET 2018; 38(1): 16-22

Fecha de aprobación: 27/03/2018

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

doi.org/10.24215/15142590e021

## Introducción

El estudio de las interconexiones que establecen las neuronas entre sí o con las células de la glía es uno de los mayores desafíos de la neurociencia. El análisis de estas interacciones permitiría comprender, entre otras, las respuestas funcionales que se ven alteradas ante la injuria (Chung & Deisseroth, 2013).

Para la exploración de las interconexiones se han ensayado, y se continúan ensayando, modelos a diferentes escalas (macro, meso y micro), con gran diversidad de enfoques (Kim *et al.*, 2013). Una aproximación de suma utilidad es la utilización de fluoróforos (moléculas con capacidad de absorber luz, en una determinada longitud de onda y emitirla como luz fluorescente) unidos a anticuerpos que, específicamente, permitan la identificación y localización de moléculas y de estructuras celulares. Para lograr este fin con precisión, es imperioso contar con segmentos delgados de muestra, ya que los fotones, los fluoróforos y los anticuerpos tienen una profundidad de penetración limitada (Chungy Deisseroth, 2013; Kuwajima *et al.*, 2013), convirtiéndose el espesor de la muestra en una gran limitación para las técnicas en las que se los emplean. Por otro lado, para el estudio de las interconexiones, es necesario que las muestras que se desean analizar cuenten con un determinado espesor, definido por la estructura y orientación de las prolongaciones celulares del tejido nervioso. En un corte delgado, serían pocos los detalles de interconexión celular que se podrían apreciar. Con el advenimiento de nuevas técnicas de tinción que permiten teñir cortes de hasta 40  $\mu\text{m}$  de espesor, tales como el free floating (Grabinski *et al.*, 2015), y con la existencia de sistemas de iluminación que penetran más profundamente en los tejidos, tales como los que se obtienen por sistemas de láser continuo o pulsado (Portiansky, 2013), se han mejorado los resultados de las investigaciones en el tejido nervioso y, en consecuencia, su interpretación.

El mayor desafío en el estudio de los sistemas biológicos, mediante técnicas de inmunofluorescencia, es el acceso limitado de los diferentes reactivos a estructuras moleculares presentes en el tejido intacto, debido a que deben atravesar las membranas celulares fosfolípídicas (plasmática y de organelas). Asimismo, la dispersión que se verifica en la interfase lípido/agua determina que el tejido intacto sea opaco, limitando la resolución de la imagen observable al microscopio (Chung *et al.*, 2013).

Teniendo en cuenta las dificultades de la compatibilización entre los efectos del espesor de la muestra, la penetrabilidad de los fluoróforos y de los sistemas de iluminación se han ensayado diversos métodos que permiten convertir diferentes tejidos en muestras transparentes y que, con diferentes ventajas y desventajas, fueron tendiendo a subsanar estos inconvenientes. Uno de los últimos métodos descritos es el de CLARITY

(*Clear Lipid-exchanged Acrylamide-hybridized Rigid Imaging/Immunostaining/In situ hybridization-compatible Tissue-hydrogel*) (Chung *et al.*, 2013). En este sentido, la técnica CLARITY ha emergido como una alternativa superadora dado que permite obtener muestras translúcidas del sistema nervioso, que incluso evitan el seccionamiento físico del tejido. Su fortaleza reside en poder convertir el tejido en un constructo que mantiene su estructura y sus biomoléculas intactas, pero que es ópticamente transparente y, por lo tanto, permite la penetración de los marcadores fluorescentes aún en más de un ciclo de tinción. Mientras que las biomoléculas nativas del tejido se mantienen inalteradas, los lípidos presentes son barridos durante el transcurso de la técnica para la obtención del órgano transparente (Chung *et al.*, 2013).

En el presente trabajo se describe la puesta a punto e implementación de la técnica de CLARITY realizada en nuestro laboratorio, para la determinación de diferentes estructuras nerviosas presentes en la médula espinal de rata.

## Materiales y métodos

### Animales

Se utilizaron 3 ratas macho de la cepa Sprague-Dawley, de entre 3 y 4 meses de edad y con un peso estimado de 150-250 gramos. Los animales fueron provistos por el bioterio del Instituto de Investigaciones Bioquímicas de La Plata (INIBIOLP, Universidad de La Plata-CONICET). Las ratas fueron alojadas en un cuarto destinado a este fin, con ciclos de luz-oscuridad de 12:12 h, temperatura controlada (22 °C) y disponibilidad de agua y alimento *ad libitum*.

Todos los procedimientos llevados a cabo con los animales fueron realizados de acuerdo con las recomendaciones de la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio del National Institute of Health (NIH). El protocolo fue aprobado por el CICUAL de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata (C: 45-1-14 T).

### Remoción de la médula espinal

Previo a la eutanasia, los animales se inyectaron con una dosis de ketamina (40 mg/Kg; IP), sumado a la administración de xilazina (8 mg/Kg; IM). A continuación, se perfundieron por vía intracardiaca 100 ml de solución salina tamponada de fosfato (PBS), pH 7,4 a 4 °C, seguida por la administración de una solución tamponada de 4% paraformaldehído, durante 20 min. La columna vertebral fue removida y fijada en formalina tamponada durante 24 h. Posteriormente, la médula espinal fue disecada, sumergida en una



solución tamponada de solución criopreservante (30% sacarosa; 1% polivinilpirrolidona; 30% etilenglicol en 1% PBS 1M y agua destilada para 100 ml) y almacenada a -20 °C hasta su utilización.

#### *Técnica de CLARITY para la clarificación de la médula espinal*

Para la implementación de la técnica se recurrió a una modificación de la técnica original formulada por Chung *et al.* (2013). En el presente trabajo se prescindió de la electroforesis estipulada originalmente, basados en los trabajos de Tomer *et al.* (2014) y Zheng y Rinaman (2015). Para realizar la técnica, la médula espinal fue incubada durante 3 días, a 4 °C en un tubo de 20 ml con una solución de 4 % paraformaldehído, 4 % acrilamida (C<sub>3</sub>H<sub>5</sub>NO), 0,05 % bis-acrilamida y 0,025 % del catalizador VAO44, todo ello en 10x-PBS (Tomer *et al.*, 2014). Pasado el tiempo, se le agregó aceite comestible de girasol, hasta colmar su capacidad. De esta manera, se expulsó todo el oxígeno contenido en el tubo, con el propósito de evitar la interferencia en la acción catalítica del VAO44. Seguidamente, se ubicó verticalmente el tubo en una grilla sumergida en un baño agitador (EYELA Thermopet NTT-220, Tokyo Rikakikai Co Ltd, Japón) con temperatura controlada de 37 °C, durante 4 h, hasta que se verificó la gelificación de la solución contenida en el tubo, con la médula espinal incluida en él. Una vez obtenido el gel, se extrajo el órgano del tubo y se lo separó del resto del gel con ayuda de una espátula. A continuación, fue colocado en otro tubo que contenía una solución de lavado, constituida por 20 % dodecilsulfato de sodio (C<sub>12</sub>H<sub>25</sub>NaO<sub>4</sub>S - SDS) en tampón de ácido bórico (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>) 1M, pH 8,5 (Tomer *et al.*, 2014). Se colocó nuevamente en el agitador a 37 °C, con agitación constante. Se realizaron dos lavados, de 24 h cada uno. Finalizados estos lavados, se continuó con el proceso de clarificación incubando la muestra en la solución de SDS y recambiando la solución de SDS cada 48 h hasta obtener el órgano translúcido (Fig. 1A). La duración aproximada total del proceso de clarificación fue de 6 semanas. Pasado este tiempo, el órgano se extrajo y se colocó en un nuevo tubo con solución PBST (PBS + 0,1 % Tween 20) para lavar el exceso de SDS, durante 48 h, cambiando la solución cada 24 h, con agitación y temperatura constante (37 °C).

Transcurridas las 48 h, se procedió al seccionamiento de la región de interés (segmento C5) a partir del órgano entero, con la ayuda de una hoja de bisturí. La muestra obtenida se conservó en solución PBST hasta su procesamiento.

#### *Técnica de inmunofluorescencia*

La sección de interés fue colocada en un tubo Eppendorf y lavada con solución PBST duran-

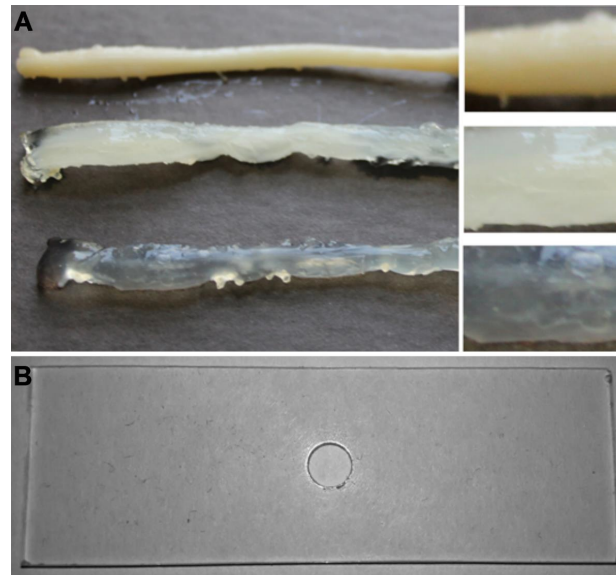
te 48 h, con recambio de la solución a las 24 h. Seguidamente, la sección se incubó con el anticuerpo monoclonal anti-neurofilamento (anti-NF, *ready to use*, Dako Cytomation, Carpintería, EE.UU.) durante 48 h, a 37 °C y con agitación constante. Este anticuerpo se utiliza para identificar neurofilamentos, los que se encuentran presentes en las proyecciones axonales de las neuronas. Posteriormente, se lavó con solución PBST durante 24 h a 37 °C y con agitación constante. Finalizado el lavado, la muestra fue incubada con el anticuerpo secundario (AlexaFluor® 488, Invitrogen, EE.UU.) durante 48 h, lavada con PBST durante 24 h y, finalmente, incubada con DAPI (4', 6-diamino-2-fenilindol) 1:1000 durante otras 48 h, para la identificación de núcleos. Por último, se lavó la muestra con PBST durante 24 h y se la incubó con glicerol como medio de montaje (87 %, Merck Química Argentina S.A.I.C, Buenos Aires, Argentina) durante otras 24 h.

#### *Técnica de lectinohistoquímica fluorescente*

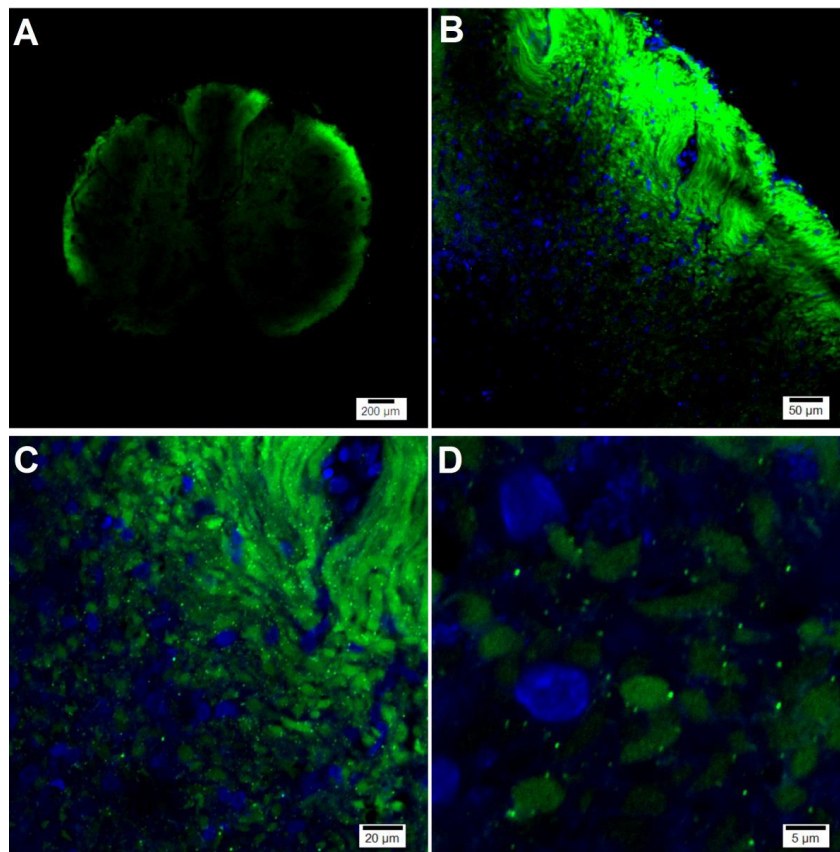
La sección de interés fue colocada en un tubo Eppendorf y lavada con solución PBST (PBS + 0,1 % Tween 20) durante 48 h, con recambio de la solución a las 24 h. Seguidamente, se la incubó con la lectina fluoresceínada *Pisum sativum* (PSA) (Fluorescein Pisum Sativum Agglutinin, Vector Laboratories Inc., Burlingame, EE.UU.) (dilución 30:1000), que se une específicamente a residuos de α-D-manosa y α-D-glucosa, a 4 °C, durante 48 h. Pasado ese tiempo, se lavó nuevamente durante 24 h con solución PBST, antes de incubarla con glicerol como medio de montaje, durante otras 24 h.

#### *Montaje de la muestra y captura de imágenes*

Las secciones sometidas a las técnicas de tinción descritas fueron colocadas en un portaobjetos especialmente diseñado en nuestro laboratorio (Fig. 1B). Este dispositivo, confeccionado con acrílico, tiene 1 mm de espesor y un orificio central para albergar la muestra. Una vez colocada la muestra, el orificio central fue rellenado con el medio de montaje. Ambas caras del portaobjetos fueron selladas con sendos cubreobjetos. La muestra fue conservada al abrigo de la luz y a 4 °C, hasta el momento de la captura de imágenes multidimensionales. La captura se llevó a cabo utilizando un microscopio confocal (Olympus FV1000, Japón). Las imágenes multidimensionales capturadas fueron procesadas para lograr imágenes bidimensionales, mediante el algoritmo "máxima intensidad" de un programa informático para el análisis digital de imágenes (cellSens Dimension, v1.7 - Olympus).

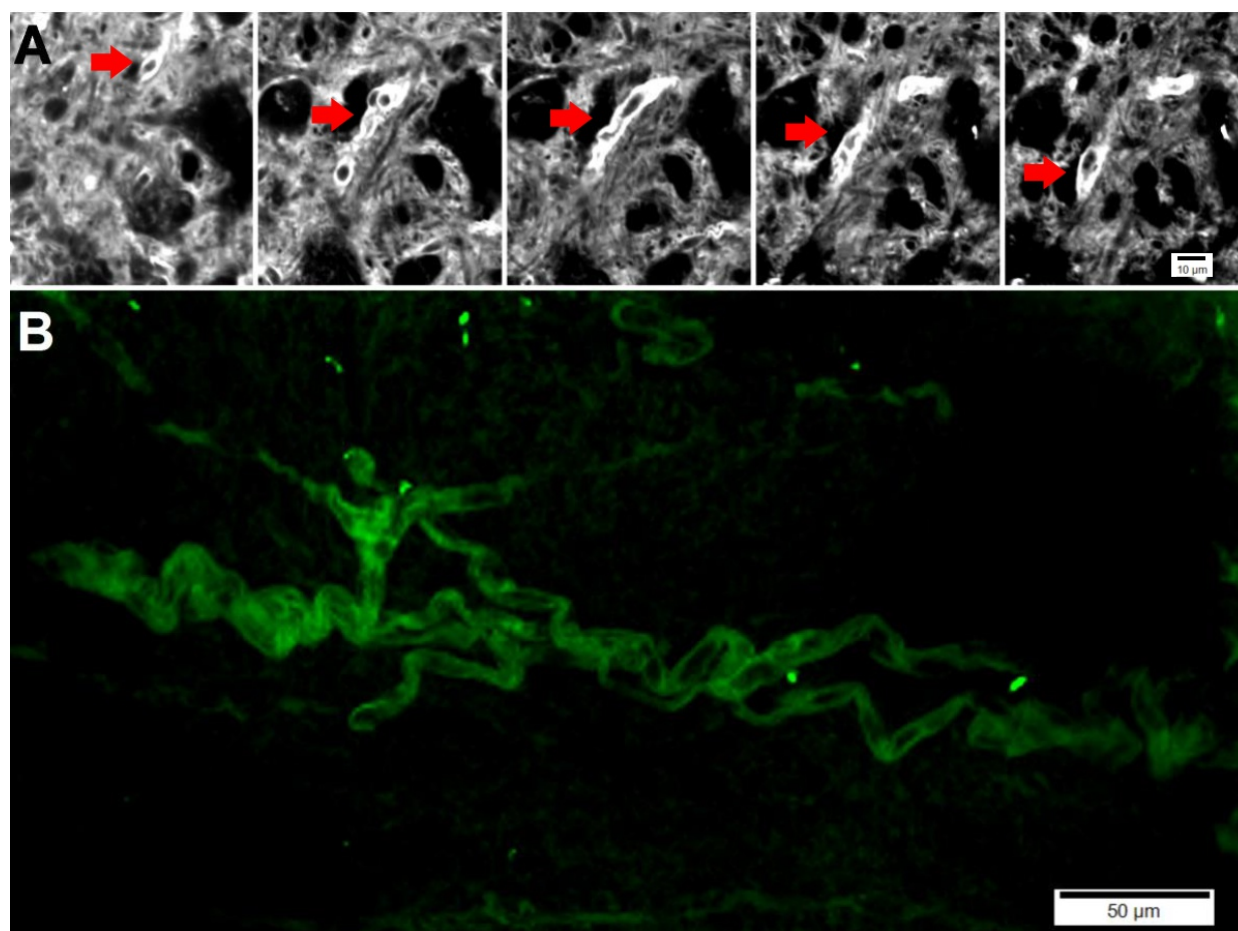


**Figura 1.** A- Se muestra la progresión del proceso de clarificación. De arriba hacia abajo: el órgano perfundido y extraído del animal, el mismo órgano luego de 4 semanas de proceso de clarificación y luego de 6 semanas. Recuadros: detalle de un sector de cada una de las 3 etapas. B- Imagen del portaobjetos diseñado en nuestro laboratorio para la contención/montaje de la muestra.



**Figura 2.** Inmunofluorescencia de una sección del segmento C5 de la médula espinal clarificada. A- Imagen bidimensional que muestra una vista panorámica del segmento C5, en donde se aprecia la tinción (verde) correspondiente a los neurofilamentos de los axones neuronales, tanto en la sustancia blanca como en la sustancia gris. B- Mayor aumento de la imagen, donde se observan los haces nerviosos penetrando en el asta dorsal de la médula. Para obtener la imagen multidimensional se capturaron 20 imágenes bidimensionales con un espaciado de 3  $\mu\text{m}$  entre ellas. Las estructuras que reflejan el azul corresponden a núcleos de neuronas o células de la glía. C- Detalle de la imagen observada en B. D- detalle, a mayor aumento, de cortes transversales de axones que contienen neurofilamentos.





**Figura 3.** Tinción lectinohistoquímica-fluorescente del segmento C5 de la médula espinal clarificada. A. Imágenes bidimensionales en las que se observan vasos sanguíneos en diferentes secciones ópticas en el espesor de la muestra (flechas). B. Reconstrucción tridimensional (renderización) de vasos sanguíneos en el espesor de la muestra, con sus correspondientes ramificaciones. Para la reconstrucción de la imagen 3D se utilizaron 40 imágenes bidimensionales apiladas (*stack* - imagen multidimensional), separadas 3 µm entre ellas.

## Resultados

### *Técnica de inmunofluorescencia*

La observación al microscopio confocal de la sección incubada con el anticuerpo anti-NF permitió identificar las proyecciones axonales, tanto en la periferia del órgano (ingreso y egreso de fibras nerviosas), como en el interior de la sustancia gris, con una distribución longitudinal. La tinción con DAPI permitió visualizar todos los núcleos presentes en el espesor de la sección de la médula espinal (Fig. 2).

### *Técnica de lectinohistoquímica*

Mediante el microscopio confocal, fue posible observar la fluorescencia emitida por la lectina fluoresceinada PSA asociada al recorrido de diferentes vasos sanguíneos (Fig. 3).

## Discusión y conclusiones

Aunque la utilización de marcadores fluorescentes es de gran utilidad para la obtención de información, no siempre es posible identificar las diversas moléculas en el tejido. Entre otras razones, cabe mencionar que las muestras fijadas en paraformaldehído limitan el acceso de los anticuerpos fluorescentes a los diversos epitopes (Ke *et al.*, 2013). Por otro lado, la opacidad de las muestras limita la profundidad de acceso de los fotones emitidos por la fuente de luz del microscopio, ya sea por difracción de la luz como por su absorción dentro de la muestra (Orlich & Kiefer, 2017). Esta opacidad reduce la resolución de los objetos presentes en la muestra. La opacidad del material se debe, principalmente, a la presencia de lípidos como parte constitutiva del tejido, los que pueden enmascarar la expresión de los anticuerpos fluorescentes, aún bajo apropiados sistemas de iluminación (Chung *et al.*, 2013).

Para tratar de eliminar el efecto opalescente que ejercen los lípidos se realizaron

múltiples ensayos. Entre otros, se mencionan aquellos que intentaron reducir las diferencias en los índices de refracción de las muestras. Para ello, las muestras fueron deshidratadas y posteriormente incubadas con solventes orgánicos, de modo que el índice de refracción resultante fuese similar al de las membranas lipídicas, intentando, de ese modo, reducir la dispersión de la luz. Sin embargo, a pesar de permitir la transparencia del órgano, estos métodos provocaron a una escasa supervivencia de los marcadores fluorescentes (Kim *et al.*, 2013). Esta limitación se contrarrestó parcialmente gracias al método 3DISCO, que logró extender la supervivencia de la señal fluorescente hasta 2 días, pero sólo para muestras de tamaño reducido (Ertürk y Bradke, 2013). Asimismo, otro método denominado Scale, permitió la obtención de muestras transparentes que conservaban la fluorescencia por un tiempo mayor. Pese a ello, el tejido nervioso se mantuvo opaco, aun cuando se incubaba durante semanas o meses, y experimentaba expansión de su volumen (Orlich & Kiefer, 2017). El método de Clear T, desarrollado posteriormente, logró la transparencia de un embrión de ratón sin expansión del tejido (Kuwajima *et al.*, 2013). Sin embargo, su aplicación en muestras de mayor tamaño aún no se ha establecido. Finalmente, el método SeeDB permitió la obtención de muestras transparentes y la conservación de la fluorescencia, aunque para el procesamiento de muestras de mayor tamaño se requería del uso de altas temperaturas, lo que conllevaba, inevitablemente, a una pérdida de la señal fluorescente (Ke *et al.*, 2013).

Si bien la técnica CLARITY demanda un mayor tiempo en comparación con otros métodos, es ampliamente superadora en cuanto a profundidad y calidad de las imágenes que pudieran obtenerse al emplearla. Mientras que la profundidad estimada de penetración de los fotones para la microscopía confocal ronda los 150 µm desde la superficie (Kim *et al.*, 2013), con el uso de CLARITY se logra un mayor alcance, obteniendo imágenes de excelente calidad. Si bien con los microscopios de láser pulsado se obtienen imágenes a partir de muestras de varios cientos de micrómetros de espesor (Tomer *et al.*, 2014), se requiere de anticuerpos específicos y muy costosos y una puesta a punto muy rigurosa de la técnica, más allá de la posibilidad de contar o acceder a ese tipo de microscopio.

Por lo general, para la observación microscópica se utilizan secciones pequeñas de tejido, que son procesadas para su inclusión y posterior corte. Mediante la implementación de esta técnica, pudimos procesar el órgano entero sin alterarlo macroscópicamente. Una vez obtenida la transparencia deseada, fue seccionado (segmento C5), procesado mediante las técnicas de inmunofluorescencia y lectinohistoquímica fluorescente, montado y observado al microscopio. Ninguno de los pasos mencionados generó algún tipo de inconveniente en la integridad estructural.

Además, al haber empleado una técnica que difiere de aquella formulada originalmente (Chung *et al.*, 2013) se obtuvo una muestra traslúcida y carente de la tonalidad amarillenta que adquieren los órganos como resultado de la aplicación del campo eléctrico (Lee *et al.*, 2014), lo cual redundó en una mayor transparencia, de acuerdo con lo que se menciona en la literatura. Cabe mencionar que este mismo estudio hubiese sido imposible de realizar en los mismos segmentos medulares que no hubiesen sido procesados mediante el método descrito. El único inconveniente del empleo de la técnica de CLARITY es la limitada preservación de la muestra, debido a los procesos de descomposición que se inician, aun a bajas temperaturas, a diferencia de lo que ocurre con muestras procesadas de manera rutinaria.

En el presente trabajo se describe un método vanguardista, simple y sin requerimiento de equipamiento excesivamente sofisticado. Se logró la observación de muestras con alta nitidez y poco fondo (*background*), lo que redundó en una mayor resolución de las estructuras marcadas. La incorporación de esta técnica a los métodos utilizados rutinariamente en nuestro laboratorio permitirá optimizar la información obtenida a partir de las muestras de interés.

## Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT), Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva de la Nación (MINCyT), PICT-2012-0574.

## Conflicto de intereses

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. conflicto de intereses que declarar.

## Bibliografía

Chung K, Wallace J, Kim S-Y, Kalyanasundaram S, Andalman AS, Davidson TJ, Mirzabekov JJ, Zalocusky KA, Mattis J, Denisin AK, Pak S, Bernstein H, Ramakrishnan C, Grosenick L, Gradinaru V, Deisseroth K. 2013. Structural and molecular interrogation of intact biological systems. *Nature*. 497(7449):332-7. doi: 10.1038/nature12107

Chung K y Deisseroth K. 2013. CLARITY for mapping the nervous system. *Nature Methods*.

2013 Jun;10(6):508-13.  
doi: [10.1038/nmeth.2481](https://doi.org/10.1038/nmeth.2481)

Ertürk A y Bradke F. 2013. High-resolution imaging of entire organs by 3-dimensional imaging of solvent cleared organs (3DISCO). *Experimental Neurology*. 242:57-64.  
doi: [10.1016/j.expneurol.2012.10.018](https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2012.10.018)

Grabinski TM, Kneynsberg A, Manfredsson FP, Kanaan NM. 2015. A method for combining RNAscope in situ hybridization with immunohistochemistry in thick free-floating brain sections and primary neuronal cultures. *PLoS One*. 10(3):e0120120.  
doi: [10.1371/journal.pone.0120120](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120120)

Ke M-T, Fujimoto S, Imai T. 2013. SeeDB: a simple and morphology-preserving optical clearing agent for neuronal circuit reconstruction. *Nature Neuroscience*. 6(8):1154-61.  
doi: [10.1038/nn.3447](https://doi.org/10.1038/nn.3447)

Kim S-Y, Chung K, Deisseroth K. 2013. Light microscopy mapping of connections in the intact brain. *Trends Cognitive Sciences*. 17(12):596-9.  
doi: [10.1016/j.tics.2013.10.005](https://doi.org/10.1016/j.tics.2013.10.005)

Kuwajima T, Sitko AA, Bhansali P, Jurgens C, Guido W, Mason C. 2013. ClearT: a detergent- and solvent-free clearing method for neuronal and non-neuronal tissue. *Development*. 140(6):1364-8.  
doi: [10.1242/dev.091844](https://doi.org/10.1242/dev.091844)

Lee H, Park J-H, Seo I, Park S-H, Kim S. 2014. Improved application of the electrophoretic tissue clearing technology, CLARITY, to intact solid organs including brain, pancreas, liver, kidney, lung, and intestine. *BMC Developmental Biology*. 21:14:48.  
doi: [10.1186/s12861-014-0048-3](https://doi.org/10.1186/s12861-014-0048-3)

Orlich M, Kiefer F. 2017. A qualitative comparison of ten tissue clearing techniques. *Histology & Histopathology*. 12:11903.  
doi: [10.14670/HH-11-903](https://doi.org/10.14670/HH-11-903)

Portiansky EL. 2013. Análisis multidimensional de imágenes digitales. La Plata, Argentina. Universidad Nacional de La Plata, <http://hdl.handle.net/10915/48218>.

Tomer R, Ye L, Hsueh B, Deisseroth K. 2014. Advanced CLARITY for rapid and high-resolution imaging of intact tissues. *Nature Protocols*. 9(7):1682-97.  
doi: [10.1038/nprot.2014.123](https://doi.org/10.1038/nprot.2014.123)

Zheng H y Rinaman L. 2015. Simplified CLARITY for visualizing immunofluorescence labelling in the developing rat brain. *Brain Structure & Function*. 221(4):2375-83.  
doi: [10.1007/s00429-015-1020-0](https://doi.org/10.1007/s00429-015-1020-0)

# Estudio del comportamiento porcino: una mirada etológica sobre la producción porcina

## *Porcine behavior study: an ethological view on swine production*

ARROYO P<sup>1\*</sup>, FERRARI HR<sup>2</sup>, ANTONINI AG<sup>1</sup>

1. Instituto de Genética Veterinaria, Facultad de Ciencias Veterinarias. 2. Cátedra de Etología, Facultad de Ciencias Naturales y Museo. Universidad Nacional de La Plata

\* Correo electrónico de la autora de contacto: [parroyo@fcv.unlp.edu.ar](mailto:parroyo@fcv.unlp.edu.ar)

---

### Resumen

El conocimiento del comportamiento permite mejorar el manejo de los animales utilizados en producción y optimizar su bienestar. La disciplina de las ciencias biológicas que aborda este tema es la etología. Basada en la teoría de la evolución, pone énfasis en cuatro tipos de explicaciones, conocidas como las “4 preguntas de Tinbergen”. ¿Son estos cuatro abordajes útiles para la etología aplicada a la producción de porcinos? ¿Las investigaciones en etología pueden aportar a la mejora en las condiciones de crianza? Y, fundamentalmente, ¿son relevantes para el bienestar animal? Algunas prácticas realizadas de manera “intuitiva” o “empírica” hoy pueden ser identificadas como “la ayuda silenciosa” que la etología ha aportado a cada etapa productiva desde el inicio de la utilización de la cría de animales domésticos, particularmente cuando esta comienza a realizarse de manera intensiva. Esta ayuda silenciosa generó un conjunto de saberes específicos que, paradójicamente, no se relacionan con esta disciplina. Proponemos aquí darle voz a esta ayuda, identificando los distintos desarrollos etológicos implicados en la producción porcina.

### Palabras clave

producción porcina, etología, bienestar animal

---

### Abstract

The comprehension of behavior allows to improve the animal handling used in production and optimize their welfare. The discipline of the biological sciences that addresses this issue is ethology. Based on the theory of evolution, it emphasizes four types of explanations, known as the “four questions of Tinbergen”. Are these four approaches useful for the applied ethology in swine production? Can research on ethology contribute to better breeding conditions? Fundamentally, are they relevant for animal’s welfare? Today, some practices performed in an “intuitive” or “empirical” way can be identified as “the silent help” in which ethology has contributed in each productive stage since the beginning of the use of the domestic animals breeding, particularly when it turns into an intensive manner. This silent help generated a combination of specific knowledge which paradoxically do not relate with this discipline. It is proposed here by giving the voice to this help, identifying the different ethologist developments in swine production.

### Key words

pig production, ethology, animal welfare



## Introducción

El conocimiento del comportamiento permite mejorar el manejo de los animales utilizados en producción y optimizar su bienestar. La disciplina de las ciencias biológicas que aborda este tema es la etología. Basada en la teoría de la evolución, hace énfasis en cuatro tipos de explicaciones, conocidas como las “cuatro preguntas de Tinbergen”, las que se refieren a la filogenia, la ontogenia, la fisiología y el efecto del comportamiento en la supervivencia y la reproducción. Originadas a mediados del siglo pasado (Tinbergen, 1963), si bien se han sometido a periódicos análisis y revisiones, (Alcock, 2001; Curio, 1994; Dewsbury, 1999; Duncan, 1995; Hogan, 2015; Stamps, 2003) se siguen empleando con su formulación inicial.

Por filogenia entendemos la historia evolutiva de las características comportamentales en estudio. Esto no es una mera relación histórica, sino que se refiere a los cambios que fueron llevando de una conducta a otra hasta llegar al rasgo actual; en términos de producción esto significa que lo que estamos viendo es el producto de una larga historia de interacciones entre una población y un ambiente ancestral de selección que ya no está presente. Muchas de las problemáticas de bienestar animal se deben a ese desajuste entre las características y el ambiente, las cuales son más fáciles de entender si conocemos esa historia evolutiva.

La ontogenia estudia los cambios de desarrollo en la vida de un individuo de ese mismo rasgo. En la etología clínica de los animales domésticos los periodos sensibles en el desarrollo son los momentos cruciales de la ontogenia que determinarán la futura relación individuo-entorno. Para la medicina veterinaria, los mecanismos fisiológicos de regulación del comportamiento están ampliamente estudiados y son utilizados en la práctica profesional.

La cuarta pregunta, que hace referencia a los efectos, pone énfasis en los cambios en la supervivencia y en la reproducción generados por un rasgo conductual. En el caso de los animales de producción, estos dos aspectos están regulados por los criadores en función de los objetivos productivos, pero las conductas de los animales siguen respondiendo a los efectos que tenían en el ambiente ancestral de selección.

¿Son estos cuatro abordajes útiles para la etología aplicada a la producción en porcinos? ¿Las investigaciones en etología pueden aportar a la mejora en las condiciones de crianza? Y, fundamentalmente ¿son relevantes para el bienestar animal?

Tomando la definición de Donald Broom (1991), que caracteriza el bienestar animal como el estado de un individuo en sus intentos por afrontar su ambiente, y entendiendo que la relación con el medio ambiente es mediante el

comportamiento, queda establecida la relevancia de la etología con respecto a la importancia de este problema.

Las cuatro preguntas de Tinbergen, en este contexto, son las explicaciones que el etólogo da a la forma en que un animal afronta su ambiente.

A mediados del siglo pasado comenzó el interés social por el bienestar de los animales, con el consecuente desarrollo de investigaciones que tenían esta inquietud como eje. Respondiendo inicialmente a un imperativo ético que emergía del público, al conocer estas las condiciones de producción, fue derivando en la formación de un campo transdisciplinar. En la actualidad incluye estudios de psicología comparada, antropología, sociología y medicina veterinaria y todos contextualizados en desarrollo de filosofía y, en algunos casos, de religión.

Si bien el bienestar animal debe ser abordado interdisciplinariamente, el Médico Veterinario tiene un rol fundamental en la implementación de estrategias y métodos de trabajo. Por esa razón es necesario que en el proceso de formación de los futuros profesionales se incluyan contenidos referidos al comportamiento, en particular de las principales especies de producción. Estos contenidos tomarán principalmente la forma de respuestas a las cuatro preguntas y estas respuestas empezarán por organizar, de manera diferente, el conocimiento actual, para luego proponer nuevas direcciones de investigación. Actualmente, los profesionales dedicados a la producción animal han comenzado a identificar la importancia de reconocer la etología como una herramienta útil en la definición de estrategias de manejo en los diferentes sistemas de producción, hasta el extremo de sugerir la inclusión de cursos de etología teórica o pura en las distintas carreras de veterinaria.

Algunas prácticas realizadas de manera “intuitiva” o “empírica” hoy pueden ser identificadas como “la ayuda silenciosa” que la etología ha aportado a cada etapa productiva desde el inicio de la utilización de la cría de animales domésticos, particularmente cuando ésta comienza a hacerse de manera intensiva. Esta ayuda silenciosa generó un conjunto de saberes específicos que, paradójicamente, no se relacionan con esta disciplina. Proponemos aquí darle voz a esta ayuda identificando los distintos desarrollos etológicos implicados en la producción porcina.

### Filogenia: implicancia en la producción porcina

Toda especie doméstica puede reconocerse como producto de tres procesos evolutivos. En un principio, los ancestros silvestres fueron moldeados mediante los procesos de selección natural y selección sexual, como resultado de lo cual las poblaciones desarrollaron y conservaron potencialidades genéticas orientadas a su supervivencia y

reproducción. En algunos casos, en algunas poblaciones ocurrió un proceso denominado “autodomesticación”: las condiciones ambientales favorecieron una baja en las conductas de agresión llevando a una mayor tolerancia entre los individuos; se cree que fue con individuos de estas poblaciones que se generaron los actuales animales domésticos.

La domesticación es entendida como el proceso de selección, por parte de los humanos, de los individuos mejor adaptados a las necesidades de los productores. Esto llevó a cambios genéticos en las poblaciones, expresados en cambios en las frecuencias de alelos y, consecuentemente, de los genotipos que ellos determinan. A diferencia de lo que ocurrió con la selección natural, en la domesticación los cambios se orientaron principalmente a beneficiar a las personas, poniendo a la supervivencia y a la reproducción de los animales a cargo del productor.

Mientras que para un animal silvestre el ser humano, por lo general, es o presa o predador, los cambios ocurridos durante la domesticación hacen que las poblaciones que lo sufren sean a veces totalmente dependientes de la conducta humana. Los animales domésticos son más gregarios, menos cautelosos, más juguetones, presentan precocidad sexual, son más receptivos y el ambiente de estos animales es más estable y predecible. La complejidad cognitiva no ha pasado por cambios especiales relacionados con la domesticación. En el cerdo este proceso comenzó hace aproximadamente 9.000 años en el sudoeste asiático. De allí se expandió hacia India, luego al este de Asia y finalmente a Europa.

Gracias al estudio de ADN mitocondrial, Larson *et al.*, en 2005, lograron identificar los principales centros de domesticación del ganado porcino, uno en Asia y dos en Europa (uno en la Península Ibérica, (sur de España y Portugal) y otro en la región del Mediterráneo (sur de Francia, Italia, Grecia, Malta, Austria, Hungría y Bulgaria).

Debido a una alta proximidad con las personas y a su consecuente selección, se evidencian diferencias en el comportamiento entre las diferentes razas, como por ejemplo que la raza Meishan china y la Large White europea difieren en su comportamiento al amamantar (Manier-Salaün *et al.*, 1991). Hohenshell *et al.*, (1996), concluyeron que la Meishan y las híbridas de 2 razas europeas, Large White y Landrace, difieren en las frecuencias de las pautas “arrodillada” y “sentada”.

Por su parte, los porcinos que llegaron a América fueron de origen europeo, principalmente de la Península Ibérica, pero también del tronco mediterráneo, y se aparearon de manera no controlada por el ser humano, hasta mediados del siglo XIX. Durante los siguientes 100 años se introdujeron otras razas para absorber al llamado ganado porcino criollo, resultado de los cruzamientos de las primeras razas que llegaron.

A la Argentina los cerdos ingresaron por 3

vías: por el Río de La Plata en 1557, desde Paraguay en 1573 y finalmente desde el alto Perú. Estos animales se criaron como ganado cimarrón, y se explotaron estas líneas hasta 1960, cuando se importaron reproductores Landrace desde Alemania e Inglaterra (Revidatti, 2009). Debido a sus diferentes orígenes y métodos de expansión de este ganado, podemos observar distintos tipos de temperamento en las razas puras, pero a su vez reconocemos la alta frecuencia de cruzamientos interraciales y similitudes en el comportamiento de las principales razas de explotación en nuestro país, gracias a que sus orígenes se han ido entrelazando a lo largo de la historia de domesticación y cría.

Todo lo anterior puede considerarse una versión resumida de la historia evolutiva de estos animales. Entonces, la conducta que debemos contemplar a la hora de producir ha sido originada por el pasado remoto como silvestres, el pasado próximo como domesticados y la situación actual como cruza entre las distintas razas. Las situaciones de bienestar animal con impacto en la producción son producidas por las diferencias entre el ambiente actual (plasmado en las instalaciones) y el ambiente ancestral de selección; las conductas de las razas responden más al segundo que al primero.

### Ontogenia: historias de vida y producción

Un estudio comparativo entre cerdos silvestres y domésticos concluyó que las diferencias en sus capacidades cognitivas se deben a la ontogenia (Albiach-Serrano *et al.*, 2012). Los cerdos frecuentemente se escapaban de los humanos volviéndose ferales y se mezclaban con las poblaciones locales. Esta falta de aislamiento genético completo puede haber mantenido la homogeneidad cognitiva en ambas poblaciones. Es posible considerar que la domesticación haya empobrecido su habilidad para acoplar con el ambiente físico y, por lo tanto, las diferencias observadas no pueden ser atribuibles a procesos de cambios evolutivos. Por lo tanto, estas diferencias no responden al pasado evolutivo de la especie, sino al desarrollo actual de los individuos. En casos como este, la manipulación del ambiente y de la relación humano-animal puede llevar a expresiones comportamentales que faciliten el proceso evolutivo, por ejemplo, el acostumbramiento de los animales al contacto con humanos.

### Aspectos causales del comportamiento

Entre la multiplicidad de factores que determinan una conducta existen efectos indirectos que suelen no ser tenidos en cuenta. Por ejemplo, la manera de percibir los colores o las formas determina, en parte, el comportamiento, es decir las variaciones filogenéticas tienen impacto en la manera de expresar un evento observable.



De esta manera decimos que los compartimientos típicos de cada especie han evolucionado. En el trabajo de Finlay *et al.*, (2011) se menciona la diferencia en el tamaño del cerebro entre las especies de mamíferos, en sus maneras de percibir formas y, como consecuencia, los distintos comportamientos. Estas percepciones responden a mecanismos y estructuras específicos de cada especie; hablamos entonces de mundo perceptivo o Umwelt.

Prestaremos aquí atención a un aspecto de esta regulación: la percepción. Los órganos de los sentidos no son ventanas, sino elementos sensibles a determinadas cualidades del entorno. Cada especie tiene los suyos propios, que le son específicos, y que han evolucionado en el ambiente ancestral de selección: son, en cierta forma, el producto de la historia ecológica de la especie, adaptados a maximizar la eficiencia para ese tipo de vida, en un ambiente determinado (Lorenz, 1995).

La percepción, a su vez, es producida por el cerebro (Lorenz, 1995). La dinámica neuronal es el resultado de la suma espaciotemporal de estímulos. Percibir es computar, y ese cómputo es específico de especie, porque el cerebro que procesa los estímulos, y los órganos de los sentidos que los generan, son específicos de especie. A esto lo denominamos Umwelt: mundo sensorial y perceptual propio, característico de una especie (Thorpe, 1982). Así, cada individuo percibe el mundo de una manera que le es propia, y como la conducta la dirige hacia lo que percibe, vive en un mundo propio. En el caso que nos ocupa, en los cerdos se distingue el olfato. Probablemente existan feromonas con mensajes muy específicos. Podría haber una relacionada con la sumisión. Si se colocan gotas opacas en los ojos de los animales no cambia la conducta social, pero se observan cambios cuando se produce anosmia (Jensen, 2004). Sin embargo, existen señales visuales específicas en jabalíes y cerdos domésticos, como por ejemplo posturas de las orejas, cola o cuerpo. Orejas hacia atrás sobre el cuerpo comunican temor, cola rígida y hacia arriba, peligro y cola caída, sumisión. También emplean posturas corporales: inclinar la cabeza a un lado es sumisión y arquear el lomo es amenaza.

La visión es también modulada por su anatomía, ya que detrás de la cabeza tienen una zona ciega, que abarca un ángulo de 15 grados a cada lado del eje del cuerpo y, por delante, una de visión binocular, de 25 grados a cada lado del eje del cuerpo (Grandin, 1980).

El oído cumple un papel en la estructura regulatoria. Tienen un repertorio de llamados vocales. Uno de alarma, cuando el individuo está en peligro, por ejemplo, al oír a un perro. Responden repitiendo la llamada, permaneciendo muy quietos o huyendo. Emiten gruñidos de contacto, chillidos de sumisión, llamadas a la madre y gemidos de lactación (Jensen, 2004). Entonces, el mundo del cerdo no es el nuestro ni el

de un perro: es el que sus sentidos pueden registrar y su cerebro procesar.

## Efectos en la supervivencia y la reproducción

En la fase de lactancia, o etapa de maternidad, la etología nos ha explicado muchas de las observaciones que podemos realizar, tanto sobre la hembra como sobre los lechones, o las interacciones entre estos.

En las primeras 24 horas postparto, luego de haber calostrado, se realiza una práctica denominada adopción cruzada, en la cual se equiparan en cantidad y peso los lechones de las camadas de las distintas hembras que parieron.

Debe ser en este periodo, debido al troquelado o impronta madre-cría, periodo ventana en el cual se realiza el reconocimiento de uno por parte del otro en ambos sentidos, el cual será permanente. Constituye el proceso por el cual ciertos estímulos se asocian para provocar determinadas conductas (Lorenz, 1937).

Durante esta etapa se observa la comunicación entre la madre y la cría (entendiendo a la comunicación como el proceso por el cual un actor influencia a un reactor, según Tinbergen -1939-, mediante señales). Dicho proceso se pone en evidencia mediante el cambio de frecuencia del sonido emitido por la hembra, obteniendo como resultado que la cría adopte el comportamiento de mamar (Jensen, 2004).

La competencia de los lechones por las tetas craneales para mamar puede recibir una lectura desde la etología. Básicamente, desde la así llamada cuarta pregunta de Tinbergen: ¿cuales son los efectos en la supervivencia y la reproducción de esta conducta? Básicamente, lo que se analiza es que cada lechón se “apega” a una teta, y se disputan las craneales, observándose lechones más grandes en las mamas torácicas, y algunos en 2 mamas (Hartsock & Graves, 1976). Esto se hace en el contexto de una así llamada “carrera armamentista”: nacen con 8 dientes agudos orientados hacia lateral ya en condición de infringir cortes durante las interacciones agonísticas con otras crías (Fraser *et al.*, 1995).

Existen diversos argumentos que intentan explicar estas observaciones. En primer lugar, desde el punto de vista nutricional, las tetas craneales proveerían más leche, en especial, más calostro. Esto resulta no ser así (Fraser-Rushen, 1992; Orihuela-Solano, 1995). En segundo lugar, las posibilidades de supervivencia, ya que, en las tetas caudales, las crías pueden ser aplastadas al sentarse a la madre (Fraser 1990; Fraser *et al.*, 1995). En tercer lugar, la defensa de las tetas de los “ladrones de leche”, ya que permite expulsar a los individuos de otra camada que tratan de mamar de una hembra que no es su madre (Fraser, 1991). Un estudio muestra que los desplazados no pierden peso y los desplazadores no lo ganan (Illman *et al.*, 2007). Esta es, entonces, un área pendiente de

investigación. En cuarto lugar, las hembras paren, en promedio, un 20 % más de crías de las que sobrevivirán, entendiéndose la competencia como una estrategia para disminuir la cantidad de lechones con el fin de no comprometer el ciclo reproductivo siguiente. Esto, en el contexto de la producción porcina actual, se ve compensado en la mayor cantidad de mamas que poseen las cerdas y en el manejo en el parto y periparto que aumenta la supervivencia de los lechones (Fraser, 1991). Por último, otra teoría respecto a la funcionalidad de la presencia de los dientes filosos en los neonatos es que estos sirven para romper la placenta, aspecto irrelevante si consideramos que otras especies no los poseen y son capaces de liberarse de las membranas placentarias (Fraser & Thompson, 1991).

Continuando con el acto de amamantamiento, se puede analizar el masaje de las mamas por parte de los lechones. Dostalkova *et al.*, (2002) desarrollaron un modelo matemático con el fin de entender la co-evolución o evolución conjunta del masaje de tetas y la provisión de leche. En este trabajo plantearon cómo el aumento en la performance relativa de un individuo tiene una relación inversa con la performance grupal, por lo que la selección basada en el grupo disminuye los comportamientos competitivos. De esta manera, y debido a los objetivos de los programas de selección, la evolución podría conducir a disminuir el comportamiento de “súplica” (masaje de mamas por parte de los lechones). Son dos aspectos de esta interacción, la madre y las crías. En el caso de la madre, la respuesta a la conducta de las crías tiene efectos en la reproducción y, en el caso de las crías, en la supervivencia; es decir, todos, madre e hijos tienen el mismo objetivo: que estos últimos sobrevivan. Más tarde, se observa el llamado “conflicto madre-cría”, en el que los requerimientos de los lechones comienzan a dejar de ser prioridad para los progenitores. Para ejemplificar esto mencionaremos el hecho que cuanto más cantidad de leche produce una hembra, más se compromete su futuro reproductivo, ya que se prolongará el intervalo destete-celo. Es por esto que el acto de amamantamiento es finalizado por la hembra en el 30-50 % de los casos en la primera semana (Spinka & Algiers, 1995).

### **Necesidades comportamentales y comportamiento innato. Un aporte de la etología al problema del bienestar animal**

Respecto del comportamiento, una herramienta de análisis pertinente y sumamente útil es el concepto de necesidad comportamental, ya mencionado por Thorpe en el informe Brambell (1965). Veamos, por ejemplo, el análisis de Jensen & Toates (1993).

Según estos autores, este concepto puede rastrearse hasta el escrito presentado por Thorpe al comité Brambell (1965). Él acuñó la idea de que

los animales tienen necesidades comportamentales, además de las más obvias necesidades fisiológicas a las que el comportamiento atiende. Este concepto se basa en las teorías de Lorenz (1974) que plantea que la energía específica de acción puede crecer dentro del animal si este es privado de los estímulos liberadores (llave) relevantes.

En el modelo psíquico de Lorenz, el cual explica el “comportamiento instintivo”, el autor menciona cómo ciertos mecanismos, llamados estímulos llave, actúan sobre los mecanismos desencadenantes innatos, los cuales dispararán las pautas fijas de acción, que son aquellas que se dan siempre de la misma manera. Mediante este proceso explica cómo, al transcurrir cierto tiempo sin que se desarrolle una pauta, aumenta la posibilidad para que esta pauta ocurra sin su estímulo llave. De esta manera, la energía específica para esta acción se va acumulando hasta “rebalsar”, es decir, se ejecutará la pauta aún en ausencia del estímulo y ocurrirán los llamados “disparos al vacío”. En otras palabras, se observará la pauta carente de contexto. Un ejemplo de esto puede observarse en la etapa de engorde de la producción porcina actual, durante la cual se observa la succión de las colas por parte de sus congéneres. En este fenómeno, la pauta de succión se “dispara” aún en ausencia del estímulo “pezón”. De tal manera, la separación de la madre constituye una situación estresante para los lechones, y la ausencia de las tetas maternas se establece como el estímulo principal que provoca el acrecentamiento de la probabilidad de ocurrencia de la succión, y uno de los factores más importantes en el origen de la caudofagia y la succión de parte de las instalaciones.

Si bien el modelo “psíquico” es simple e intuitivo, muchas de las interpretaciones realizadas con este método se pierden con mucha frecuencia en los modernos modelos motivacionales que solamente tienen en cuenta la necesidad fisiológica como única fuente del estímulo. Hughes & Duncan (1998) afirman, en forma explícita, que el concepto de “necesidad” etológica puede ser clarificado solamente si se lo puede integrar satisfactoriamente en el contexto de un modelo motivacional.

En el presente trabajo se identifica una necesidad como un estado que, si no es atendido, causa sufrimiento a un animal que se evidencia como disturbios comportamentales, con un incremento en el riesgo de enfermedades y/o un perfil hormonal compatible con estrés. El estado motivacional es un estado del sistema nervioso. Algo que tiende a perderse en los modelos es la incorporación expresa de retroalimentación positiva, lo que lleva a cierta persistencia en la liberación del comportamiento.

Si dejamos de lado los modelos basados en energía, se puede hacer una serie de sugerencias sobre las causas, basadas en ellos:

1. un comportamiento es liberado por una combinación de factores internos y externos,
2. cuando un comportamiento se realiza, después de un período inicial de retroalimentación positiva, la motivación se va debilitando progresivamente y el comportamiento se detiene, con independencia de sus consecuencias,
3. durante la no realización de un acto específico la motivación para ese acto se incrementa gradualmente.

Algunos autores han dividido las motivaciones en aquellas que contribuyen a la homeostasis, por ejemplo alimentarse, y aquellas que no, por ejemplo el apareamiento. Se ha argumentado que la primera clase está internamente motivada, mientras que la última lo está externamente; otros proponen que la teoría de la motivación por incentivos puede explicar una gran cantidad de resultados y permite que el sexo y la agresión sean discutidos en el mismo contexto que el comer y beber (Hughes & Duncan, 1998).

En las ramas aplicadas de la etología que se ocupan del bienestar animal, el modelo de Wiepkema (1987) ha ganado influencia. De acuerdo con éste, los animales monitorean continuamente el estado del mundo externo (Istwert) y lo comparan con el Sollwert (una representación interna del estado deseado). Cuando hay una discrepancia, se realiza una acción para disminuirla. Cuando la discrepancia disminuye, el animal experimenta un sentimiento de placer.

Como en el modelo de Lorenz, se pueden deducir algunas características de los modelos homeostáticos, incluyendo el de Wiepkema (1987):

1. el comportamiento es liberado cuando el valor de una variable de control se aparta de un punto fijo, un óptimo de equilibrio,
2. el comportamiento apaga su motivación reduciendo la discrepancia entre los valores comparados,
3. cuando no se aparta la variable medida de su valor de referencia, el comportamiento no se libera.

En las versiones posteriores, Lorenz cambió levemente su idea de la motivación como un estado interno. Generalmente se utiliza la expresión “necesidades comportamentales” para describir la necesidad de realizar un patrón de comportamiento específico, cualquiera sea el ambiente, incluso si la necesidad fisiológica a la que el comportamiento atiende está satisfecha.

Esto significa que la realización del comportamiento que constituye una necesidad es motivacionalmente diferente de otros comportamientos en el repertorio del animal. Se separan “necesidades” de “lujos”. Esto lleva a la “aproximación por el catálogo”, donde el objetivo de la investigación es producir una lista de expresiones comportamentales especie-específicas

que deben permitirse cuando el animal está en cautiverio.

Esta definición no aporta al conocimiento de las verdaderas motivaciones en el comportamiento y hace poco por el bienestar de los animales. Por un lado, empezando por Thorpe, están los que opinan que la aproximación de Lorenz es la manera más fructífera de contemplar la motivación. Por otro, hay autores que rechazan la existencia de un crecimiento interno de la motivación, apoyándose en modelos como el de Wiepkema (1987). Por ejemplo, Baxter (1983) propone el concepto de “necesidad psicológica” como una alternativa, significando que los animales tienen objetivos para sus actividades y, si estos pueden ser alcanzados sin que el animal actúe, el comportamiento nunca es liberado (disparos al vacío). Son dos posiciones extremas, en un continuo.

Hay ciertas actividades que son casi enteramente dependientes de fluctuaciones de estados internos para su desarrollo, como alimentarse, anidar y picotearse las plumas, mientras que otras dependen más exclusivamente de variaciones de estados externos, por ejemplo, comportamiento agonístico y respuestas antipredador. Hughes & Duncan (1998) expresan: “Cuando el comportamiento es normalmente incitado por la presencia de factores externos, entonces la cuestión de la necesidad comportamental, obviamente, no aparece; si un fenómeno tal como una necesidad existe, entonces debe aparecer bajo la forma de patrones de comportamiento motivados principalmente por actores internos”.

Entonces, una necesidad comportamental debe:

1. ser causada principalmente por actores internos,
2. su tendencia debe crecer gradualmente, en la medida que no es realizada,
3. la sola realización del comportamiento origina recompensa; el animal tratará de realizar el patrón motor con independencia del estado del ambiente y de las consecuencias funcionales de la actividad.

La necesidad de realizar el comportamiento debe también ser independiente del tipo de ambiente en el que el animal vive. Prohibir su realización se asociará con bienestar negativo. Sin embargo, prohibir otros comportamientos, que no cumplen estos criterios, puede ser seguro desde el punto de vista del bienestar.

Cuando comenzamos a mirar en detalle lo que parecen ser sistemas de comportamiento simples, encontramos que emerge una compleja imagen que sería errado categorizar en clases dependientes de, por ejemplo, una supuesta dicotomía entre factores internos y externos. Como se verá, esto lleva a los autores a la conclusión que no es posible clasificar algunos de

los comportamientos como necesidades por comparación con otros. Se examinarán los tres criterios vistos antes, para mostrar que son demasiado simplificados para aportar a una teoría general de las necesidades comportamentales.

Uno de los casos investigados tiene que ver con producción en porcinos: la construcción del nido en cerdas. En un intento por distinguir los efectos de los dos tipos de factores, Jensen (1986, 1993) estudió la realización de las actividades de construcción del nido en cerdas en corrales libres de estímulos relevantes (corrales de concreto), comparando con cerdas en corrales similares pero enriquecidos, con cama que les permite hocicar y con paja en una canasta, para usar como material de nido.

No hubo diferencia en la cantidad de la actividad de nidificación vista en ambos grupos. Sin embargo, las cerdas en ambientes con pocos estímulos desarrollaron sólo los comportamientos correspondientes a la primera parte de la actividad (husmear, hociquear, patear) y no hicieron ningún intento de realizar en vacío las conductas de colocar u ordenar el material.

Así, no habría un “impulso nidificador” unitario. Por supuesto, esto puede significar que la nidificación constituye un complejo de dos procesos motivacionales diferentes: unos internos y otros externos. Tal vez la primera parte del patrón pueda calificarse como necesidad (Hughes & Duncan, 1998).

Una interpretación probable es que el incremento en la prolactina dispara un estado motivacional en el que dominan las tendencias a nidificar. Este estado luego se asocia con una representación de logro y, al mismo tiempo, dispara la primera parte del programa motor. Si la cerda no alcanza algo que sea satisfactorio, que disminuya la diferencia Istvert-Sollwert, como dice Wiepkema, la siguiente parte del patrón no comienza.

El anidamiento en las cerdas claramente refleja una necesidad, pero sería un error considerar que eso constituye solamente realizar un cierto patrón motor en cualquier ambiente.

El hecho de que a las cerdas se les pueda impedir nidificar les provoca el desarrollo de comportamientos anormales, como estereotipias, lo que indicaría que el comportamiento está asociado a una necesidad.

Una conducta necesaria en el momento de la inseminación de hembras es su inmovilidad, que en su estado natural es simplemente un reflejo como respuesta a la monta del verraco. Reproducir esta conducta en ausencia del macho requiere establecer estrategias adecuadas, como por ejemplo la utilización de “mochilas” (dispositivo similar a un arnés con peso en los laterales, que se coloca sobre el dorso-lomo de la reproductora) que simulan el peso del macho sobre la hembra. También es necesaria la presencia de un macho “celador” que al segregarse feromonas y emitir sonidos contribuye a la expresión de la conducta deseada.

En el caso de los padrillos, para realizar las extracciones seminales, se hace uso de un caballete o súcubo, que actuará como estímulo desencadenante de la conducta de monta, y esta pauta es, a su vez, reforzada de manera positiva, es decir, se los “premia”. Skinner (1974) propone que “una conducta al obtener una consecuencia reforzante tiene más probabilidades de ocurrir nuevamente en circunstancias similares”.

### Una lectura etológica de las estereotipias y el enriquecimiento ambiental

Bajo ciertas circunstancias los animales confinados desarrollarán estereotipias, las cuales constituyen comportamientos repetitivos, constantes en la forma y sin propósito obvio en el contexto, como por ejemplo el mordido de barrotes y el masticar al vacío (en algunos casos denominados animales “tragadores de aire”). Dentro de las alteraciones más notorias del comportamiento se encuentra el mordido de las colas de los congéneres. Todo esto puede ser entendido como necesidades comportamentales que el ambiente canaliza transformándolas en conductas dañinas para los individuos y su entorno. El hecho de que sean motivaciones intrínsecas las hace particularmente difíciles de manejar, siendo una de las formas más utilizadas para tratarlas mediante el enriquecimiento ambiental.

El enriquecimiento ambiental consiste en el proceso por el cual se modifica el ambiente de los animales con el objetivo de que aparezcan conductas nuevas y poder de esta manera mejorar el bienestar animal; puede llevarse a cabo de distintas formas y, para eso, se lo clasifica en 5 tipos (Hoy *et al.*, 2010):

1. alimentario, en el cual se varía el alimento o este es presentado de una forma diferente. La presentación del alimento ad libitum y particularmente reduce al mínimo el tiempo destinado a su búsqueda, captura y procesamiento (haciendo referencia a las distintas etapas que constituyen el proceso de forrajeo), dejando tiempo libre para desarrollar las alteraciones antes mencionadas,
2. social, mediante el cual permitimos realizar interacciones con otro individuo de la misma especie, o incluso con los humanos (este tipo es difícil de aplicar a los reproductores en el actual tipo de alojamiento de los establecimientos intensivos confinados),
3. del hábitat. En este tipo de enriquecimiento se modifica parte de su recinto o alojamiento, por ejemplo, alojando a las hembras reproductoras en corrales grupales con el posterior traslado a los galpones de maternidad,
4. sensorial. Se les presentan a los animales nuevos olores, sonidos y/o texturas novedosas que estimulen sus sentidos, por ejemplo, cadenas,



objetos colgantes o juguetes, que sean masticables, deformables y destruibles, entre otros,

5. cognitivo. En este caso se le brinda al animal la posibilidad de resolver un problema. El cerdo posee una gran necesidad comportamental respecto a la conducta de exploración, por lo que este enriquecimiento es uno de los aplicados más frecuentemente, por ejemplo, mediante la utilización de camas de paja. La manera de arribar al éxito o al fracaso de esta medida es registrando, o no, pautas nuevas de conducta en los animales y, de esta manera, mejorar su bienestar animal.

En el contexto de las necesidades comportamentales el enriquecimiento es una intervención realizada teniendo en cuenta el mundo perceptivo de una especie para propiciar el reencauzamiento de las conductas que generan el problema.

## Conclusiones

Las cuatro preguntas de Tinbergen actúan a modo de paradigma, en el sentido que Lakatos (1983) da a ese término: el entramado conceptual que permite distinguir los objetos y métodos de una ciencia. Una vez definido un marco conceptual como este, desde él se generan las investigaciones y reflexiones que transforman la teoría.

Las prácticas médicas, en cambio, se orientan a transformar las condiciones de existencia: su finalidad no es generar teoría, sino aplicarla. Por supuesto, una misma persona puede a la vez generar teoría y aplicarla; ambos dominios cognoscitivos están conectados y son diferentes en estructura y procesos. En las disciplinas médicas aplicadas a la producción, el marco teórico de la etología cumple simultáneamente varias funciones. La más evidente es actuar como contramedida para el antropomorfismo: al situar las explicaciones en el contexto de la teoría de la evolución, dificulta o impide que transfiramos a ellas los mecanismos y motivaciones humanas.

Como corolario de lo anterior, los seres son vistos como el producto de tres procesos (su evolución, su desarrollo y su fisiología) lo que hace que sus características conductuales (o de otro tipo) respondan a tres dinámicas diferentes, que generan orden en el acoplamiento individuo-entorno, orden cuya comprensión lleva a una mejor intervención. Esta propuesta de un orden en tres escalas temporales, que se refleja en una consecuencia ecológica (los efectos en la supervivencia y la reproducción se manifiestan en el ambiente) nos lleva a la problemática del bienestar animal. Es en este contexto que el uso de las cuatro preguntas de Tinbergen se inserta en el ejercicio de la medicina veterinaria.

El hecho de redefinir al ser vivo como algo más que un mecanismo, y de explicarlo por su triple historia de cambios en su relación con el ambiente, permite prestar atención a los

desacoples que antes no era posible identificar: el ambiente de producción no es el ambiente ancestral de selección y, por lo tanto, produce un desajuste que redundará en un daño al animal. Esta (nueva) mirada desde las cuatro preguntas posibilita nuevas direcciones de investigación.

Entre esas direcciones, emerge una nueva medicina basada en la teoría de la evolución. Inicialmente en la medicina humana, ya comienzan a aparecer desarrollos que apuntan a una medicina veterinaria darwiniana (Capitelli *et al.*, 2010).

En esta publicación hemos mostrado la aplicación de este marco conceptual a la producción porcina; resulta impensable abordar esa actualidad sin tener en cuenta el comportamiento de los animales y una de las formas de hacerlo es empleando los conceptos y métodos de la etología. Junto a una etología clínica, una etología aplicada a la producción generará el escenario no sólo para una mayor eficiencia, sino para un nuevo compromiso ético. Al (re)definir a los animales en términos de su comportamiento, se ponen en evidencia la importancia de los temas referidos al bienestar animal y sus consecuencias.

## Conflicto de intereses

Todos los autores declaran que no existen conflictos 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

- Alcock J. Proximate and ultimate causes of behavior: how and why birds sing. En: 2001. *Animal behavior. An evolutionary approach.* (7a ed). Massachusetts. Sinauer Associates, Inc., pp. 23-49.
- Albiach-Serrano A, Bräuer J, Cacchione T, Zickert N, Amici F. 2012. The effect of domestication and ontogeny in swine cognition (*Sus scrofa scrofa* and *S. s. domestica*). *Applied Animal Behavior Science.* 141:25-35. doi: [10.1016/j.applanim.2012.07.005](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2012.07.005)
- Baxter MR. 1983. Ethology in environmental design for animal production. *Applied Animal Ethology.* 9:207-20. doi: [10.1016/0304-3762\(83\)90001-9](https://doi.org/10.1016/0304-3762(83)90001-9)
- Benson G, Rollin, B. Theoretical framework. En: 2004. *The well being of farm animal, challenges and solutions.* First edition. Blackwell Publishing. EE.UU, pp. 3-179.



- Broom DM. 1991. Animal welfare: Concept and measurement. *Journal of Animal Science*. 69:4167-75.
- Capitelli GM, Ferrari HR, López H. 2010. Introducción a la medicina veterinaria Darwiniana. Aplicaciones de la teoría de la evolución en la práctica veterinaria. *Vaccinología, zoonosis y bienestar animal como ejemplos de aplicación. Revista de Medicina Veterinaria (Buenos Aires)*. 91:(5/6)71-5.
- Curio E. 1994. Causal and functional questions: how are they linked? *Animal Behaviour*. 47:999-1021.  
doi: [10.1006/anbe.1994.1139](https://doi.org/10.1006/anbe.1994.1139)
- Dewsbury DA. 1999. The proximate and the ultimate: past, present, and future. *Behavioural Processes*. 46:189-99.
- Dostalkova W, Spinkaz M, Kindlmann P. 2002. Begging for milk: evolution of teat massaging in suckling pigs. *Journal of Theoretical Biology*. 215:321-32.  
doi: [10.1006/jtbi.2001.2511](https://doi.org/10.1006/jtbi.2001.2511)
- Duncan IJ. 1995. DGM Wood-Gush Memorial Lecture: An applied ethologist looks at the question "Why?". *Applied Animal Behaviour Science*. 44(2-4):205-17.  
doi: [10.1016/0168-1591\(95\)00614-X](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00614-X)
- Finlay B, Hinz F, Darlington R. 2011. Mapping behavioral evolution onto brain evolution: the strategic roles of conserved organization in individuals and species. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. 366:2111-23.  
doi: [10.1098/rstb.2010.0344](https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0344)
- Fraser D, Krames DL, Pajor EA, Weary DM. 1995. Conflict and cooperation: sociobiological principles and the behaviour of pigs. *Applied Animal Behavior Science*. 44:139-57.  
doi: [10.1016/0168-1591\(95\)00610-5](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00610-5)
- Fraser D, Rushen J. 1992. Colostrum intake by newborn pigs. *Canadian Journal of Animal Sciences*. 1-13.  
doi: [10.4141/cjas92-001](https://doi.org/10.4141/cjas92-001)
- Fraser D, Thompson BK. 1991. Armed sibling rivalry among suckling piglets. *Behavioral Ecology and Sociobiology*. 29:9-15.
- Grandin T. 1980. Livestock behavior as related to handling facility design. *International Journal for the Study of Animal Problems*. 1:33-52.
- Hartsock TG, Graves HB. 1976. Neonatal behavior and nutrition-related mortality in domestic swine. *Journal of Animal Science*. 42(1):235-41.
- Hogan JA. 2015. A framework for the study of behavior. *Behavioral Processes*. 117:105-13.  
doi: [10.1016/j.beproc.2014.05.003](https://doi.org/10.1016/j.beproc.2014.05.003)
- Hohenshell LM, Minick JA, Lay Jr DC, Ford SP. 1996. Maternal behavior potentially affecting offspring survivability: a comparison between Meishan and Yorkshire X Landrace (YL) sows. *Swine Research Report*. IOWA State University. Disponible en: <http://lib.dr.iastate.edu/swinereports> [Consultado 01/01/2017].
- Hoy JM, Murray PJ, Tribe A. 2010. Thirty years later: enrichment practices for captive mammals. *Zoo Biology* 29:303-16.  
doi: [10.1002/zoo.20254](https://doi.org/10.1002/zoo.20254)
- Hughes B, Duncan I. 1988. The notion of ethological 'need', models of motivation and animal welfare. *Animal Behavior*. 36:1696-707.  
doi: [10.1016/S0003-3472\(88\)80110-6](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(88)80110-6)
- Illman G, Pokorná Z, Spinka M. 2007. Allosuckling in domestic pigs: teat acquisition strategy and consequences. *Applied Animal Behavior Science*. 106:26-38.  
doi: [10.1016/j.applanim.2006.06.012](https://doi.org/10.1016/j.applanim.2006.06.012)
- Jensen P. 1986. Observation of maternal behaviour of free-ranging domestic pigs. *Applied Animal Behavior Science*. 16:131-42.  
doi: [10.1016/0168-1591\(86\)90105-X](https://doi.org/10.1016/0168-1591(86)90105-X)
- Jensen P. 1993. Nest building in domestic sows: the role of external stimuli. *Animal Behavior*. 45(2):351-8.
- Jensen, P. *Comportamiento del cerdo*. 2004. *Etología de los animales domésticos*. Zaragoza, España. Jensen (Editor), Editorial Acribia, pp. 168-84.
- Jensen P, Toates F. 1993. Who needs 'behavioural needs'? Motivational aspects of the needs of animals. *Applied Animal Behavior Science*. 37:161-81.  
doi: [10.1016/0168-1591\(93\)90108-2](https://doi.org/10.1016/0168-1591(93)90108-2)
- Lakatos I. 1983. "La metodología de los programas de investigación científica". Madrid. Alianza Editorial.
- Larson G. 2005. Worldwide phylogeography of wild boar reveals multiple centers of pig domestication. *Science*. 307:1618.  
doi: [10.1126/science.1106927](https://doi.org/10.1126/science.1106927)
- Lorenz K. 1937. The companion in the bird's world. *The Auk*. 54:245-73.
- Lorenz K. 1974. Etología comparada. El comportamiento instintivo en la filogenia. En: *Biología del comportamiento*. Ciudad de México; Siglo XXI Editores, pp. 7-18.

Lorenz, Konrad. 1995. *La otra cara del espejo*. Plaza & Janes.

Meunier-Salaün MC, Gort F, Prunier A, Schouten WPG. 1991. Behavioral patterns and progesterone, cortisol and prolactin levels around parturition in European (Large White) and Chinese (Meishan) sows. *Applied Animal Behavior Science*. 31:43-59. doi: [10.1016/0168-1591\(91\)90152-N](https://doi.org/10.1016/0168-1591(91)90152-N)

Orihuela A, Solano JJ. 1995. Managing "teat order" in suckling pigs (*Sus scrofa domestica*). *Applied Animal Behavior Science*. 46:125-30. doi: [10.1016/0168-1591\(95\)00639-7](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00639-7)

Redivatti M. 2009. Caracterización de cerdos criollos del nordeste argentino. Tesis doctoral, Universidad de Córdoba, España.

Skinner B. 1974. *Sobre el conductismo*. Título del original: *About behaviourism*. Publicado por Alfred A Knopf, New York. USA. Traducción Fernando Barrera. Ed Planeta-De Agostini Mexico DFD.

Spinka M, Algers B. 1995. Functional view on udder massage after milk let-down in pigs. *Applied Animal Behavior Science*. 43:197-212. doi: [10.1016/0168-1591\(95\)00560-F](https://doi.org/10.1016/0168-1591(95)00560-F)

Stamps J. 2003. Behavioral processes affecting development: Tinbergen's fourth question comes of age. *Animal Behavior*. 66(1):1-13. doi: [10.1006/anbe.2003.2180](https://doi.org/10.1006/anbe.2003.2180)

Tinbergen N. 1939. On the analysis of social organization among vertebrates, with special references to birds. *The American Naturalist*. 21:210-34.

Tinbergen N. 1963. "On aims and methods of ethology." *Zeitschrift für Tierpsychologie*. 20:410-33.

Tinbergen N. 1981. *El estudio del instinto*. 10ª edición. Ciudad de México; Siglo XXI editores.

Thorpe WH. 1965. The assessment of pain and distress in animals. En: *Report of the Technical Committee to enquire into the welfare of animals kept under intensive livestock systems* (F.W.R. Brambell). HMSO, London. UK.

Thorpe WH. 1982. *Breve historia de la etología*. Vol 902. Madrid, España; Alianza Editorial.

Wiepkema PR. Behavioral aspects of stress. En: 1987. Wiepkema PR; van Adrichem PWM (Editors). *Biology of stress in farm animals: an integrative approach*. Martinus Nijhoff, Dordrecht. 113-33.

# Coccidioidomicosis en caninos y felinos: hallazgos clínicos, diagnóstico y tratamiento

## *Canine and feline coccidioidomycosis: clinical findings, diagnosis and treatment*

MARTÍNEZ CEPEDA GE<sup>1\*</sup>, REVELO RUALES AP<sup>2</sup>

1. Docente de la Cátedra de Biología, Carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia, Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Técnica de Babahoyo. Gerente General de Centro de Diagnóstico Veterinario "Santo Domingo" (CEDIVET) 2. Profesional independiente.

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

---

### Resumen

La coccidioidomicosis es una enfermedad endémica de las zonas áridas de América. Se han identificado dos especies de este género, *Coccidioides immitis* y *Coccidioides posadasii*. La variedad de especies susceptibles, incluyendo a los humanos, hace que su diagnóstico tenga una gran relevancia. Esta enfermedad no presenta una sintomatología específica que facilite su identificación. Tanto en caninos como en felinos, se puede presentar como una enfermedad pulmonar leve o una enfermedad multisistémica diseminada que puede causar la muerte. El diagnóstico se basa en el hallazgo histopatológico de microabscesos (frescos) en muestras del tracto respiratorio u otros órganos con la respectiva identificación de esférulas que contengan endosporas. No obstante, a causa del desafío que representa su diagnóstico sobre todo en regiones donde no es endémica, es necesario recurrir a pruebas complementarias, como el cultivo y aislamiento, bajo las condiciones de bioseguridad adecuadas, y una posterior confirmación mediante pruebas moleculares.

### Palabras clave

*Coccidioides* spp., coccidioidomicosis, diagnóstico, tratamiento

---

### Abstract

Coccidioidomycosis is an endemic disease of the arid zones of America. Two species of this genus have been identified: *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. The variety of susceptible species, including humans, makes its diagnosis highly relevant. This disease does not have a specific symptomatology that allows its identification. Both in dogs and cats, it may present as a mild pulmonary disease or as a disseminated multisystemic disease that can cause death. The diagnosis is based on the histopathological findings of microabscesses (fresh) in respiratory or other organs with identification of spherules containing endospores. However, because of the challenge of its diagnosis, especially in regions where it is not endemic, it is necessary to proceed with complementary tests such as culture and isolation, under the appropriate biosecurity conditions, and subsequent confirmation by molecular tests.

### Key words

*Coccidioides* spp., coccidioidomycosis, diagnosis, treatment

---

## Introducción

La coccidioidomicosis, también llamada fiebre del valle, es una enfermedad producida por dos especies de hongos dimórficos: *Coccidioides immitis* (endémico del área de San Joaquín, California, EE.UU.) y *Coccidioides posadasii* (endémico en las restantes áreas del continente americano). La micosis es endémica en las zonas áridas del continente americano (Mehrkens *et al.*, 2016). Estos hongos son termodimórficos, su fase micelial desarrolla a 25 °C en el ambiente, donde producen artroconidios que son los que ingresan al hospedero susceptible y producen la infección. En el hombre y en los animales desarrolla la fase parasítica que se caracteriza por esférulas con endosporas.

Los casos clínicos son relativamente comunes en perros, llamas, primates y muchas especies no nativas mantenidas en zoológicos en las regiones endémicas. La enfermedad también fue documentada en gatos y en caballos. Los animales pueden actuar como centinelas de la enfermedad en humanos, debido a que comparten una ambiente común y a la estrecha relación existente, principalmente con los caninos domésticos (Mehrkens *et al.*, 2016). Si bien hay varias técnicas disponibles en la actualidad para el diagnóstico de enfermedades micóticas sistémicas, el estudio histopatológico es la prueba de elección cuando es posible disponer de tejidos (Ramírez-Romero *et al.*, 2016).

## Historia de la enfermedad

La enfermedad fue descrita por primera vez en Buenos Aires en 1892, aunque la naturaleza fúngica de la misma fue revelada en California (Negroni, 2011).

El Dr. Bengolea, médico dermatólogo del Hospital Rawson de Buenos Aires, solicitó al estudiante de medicina Alejandro Posadas revisar una biopsia cutánea procedente de una lesión de aspecto verrugoso con diagnóstico presuntivo de "micosis fungoide". El paciente era un soldado de caballería llamado Domingo Ezcurra, nacido en la Provincia de San Luis, en 1852. Se supuso que el paciente había contraído la infección cuando prestaba servicio militar en el año de 1888 en la frontera del Chaco. Un año más tarde aparecieron las primeras manifestaciones de la enfermedad, de evolución crónica y progresiva. El Dr. Posadas observó, en el examen clínico, pápulas pruriginosas, de aspecto verrugoso, localizadas en la cabeza, espalda, abdomen y en los miembros. También observó adenopatías, algunas con reblandecimiento y escrofuloderma, mientras que otras habían bloqueado la circulación linfática ocasionando linfedema (Negroni & Arechavala, 2006; Negroni, 2011).

Posadas y su maestro, el Dr. Wernicke, observaron el agente etiológico en los estudios histológicos, en los que observaron un proceso

crónico inflamatorio, con formación de granulomas epitelioides con células gigantes, similar al tuberculoso, pero que contenían formaciones quísticas muy parecidas a las producidas por los protozoarios del género *Coccidia*. Como observaron que no era idéntico al género mencionado, lo clasificaron dentro del género *Psorosperma*, por lo que la enfermedad se llamó inicialmente psorospermiasis infectante generalizada (Canteros *et al.*, 2009; Negroni, 2011).

Los médicos realizaron tratamientos e intervenciones quirúrgicas sin resultados favorables y la enfermedad progresó ocasionando la muerte del paciente en 1898. Se le practicó una autopsia, haciéndose evidentes lesiones en la piel, linfonódulos, pulmones, hígado y bazo. Los granulomas producidos por este agente eran similares al folículo de Koster de la tuberculosis, con necrosis caseosa en el centro, una zona media de células gigantes multinucleadas y células epitelioides y un manto de células mononucleares linfocitarias en la periferia. La única diferencia era la presencia de quistes de "psorospermias" ubicados en la zona caseosa y en el interior de las células gigantes.

Posadas inoculó macerados del material de biopsia por vía subcutánea, en la zona abdominal, en varias especies de animales. Las ranas y tortugas demostraron ser resistentes al hongo. En los monos, la infección experimental demostró ser muy grave y les causó la muerte 18 a 31 días posinoculación, mientras que en las ratas y perros la enfermedad fue más parecida a la desarrollada en el humano, crónica y ulcerativa (Negroni, 2011).

## Agente etiológico

*Coccidioides* spp. presenta diferentes formas en su fase saprófita y parasitaria y se distingue de otros patógenos fúngicos por las características morfológicas únicas de su crecimiento en el tejido del hospedero.

### Posición taxonómica

División: *Ascomycota*

Clase: *Euascmycetes*

Orden: *Onygenales*

Familia: *Onygenaceae*

Género: *Coccidioides*

Especies: *C. immitis* y *C. posadasii*

Hasta 2002 solo se reconocía una especie del género: *C. immitis*. Con la utilización de herramientas moleculares se propuso una nueva especie, *C. posadasii*, para los aislamientos de Arizona, Texas, México, Venezuela, Argentina y Brasil, reservando el nombre *C. immitis* para los aislamientos de California (Fisher *et al.*, 2002).

Las especies de *Coccidioides* se identifican sobre la base del polimorfismo de cinco proteínas conservadas, además de características fenotípicas como el crecimiento en medios con alta

concentración de sales (Castañón-Olivares *et al.*, 2007; Gómez & Guida, 2010; Welsh *et al.*, 2012).

Las especies de *Coccidioides* habitan en zonas geográficas semiáridas, donde la temperatura anual promedio es de 30 °C, con veranos extremadamente calurosos y terrenos alcalinos arenosos o arcillosos. El hongo crece desde la superficie y hasta una profundidad de 30 cm; los micelios permanecen latentes bajo la superficie del suelo. Tras periodos de lluvias, el agente se multiplica y libera gran número de artroconidios y su dispersión se asocia con eventos de remoción de tierra por causas naturales como el viento o por intervención humana en agricultura y construcciones. Los artroconidios son las formas infectantes que ingresan en humanos y animales por vía inhalatoria (Carrasco-Zuber *et al.*, 2016) y, en aproximadamente 48 horas, se redondean hasta formar esférulas en el hospedero. Las esférulas maduras miden entre 20 y 150 µm de diámetro y dentro de ellas se forman endosporas de 2 a 4 µm de diámetro. Las esférulas maduras se rompen y liberan las endosporas, las que originan nuevas esférulas propagando la infección (Castañón-Olivares *et al.*, 2007; Laniado-Laborin *et al.*, 2012).

### Factores de virulencia

Los artroconidios de *Coccidioides* spp. pueden evadir al sistema inmunológico del hospedero. La pared del conidio, derivada de la pared de la hifa original, es hidrofóbica y está adaptada para propagarse a través del aire. Esta pared constituye una capa de protección pasiva contra los mecanismos celulares de defensa, contribuyendo a la supervivencia del patógeno *in situ*. La elevada cantidad de endosporas liberadas por cada esférula es también un factor de virulencia. Las esférulas están recubiertas con una sustancia mucilaginosa, que actúa como agente protector contra el sistema fagocítico del hospedero. Otro factor de virulencia es la formación de granulomas, ya que el sistema inmunitario del hospedero no puede eliminar al agente causante de la enfermedad dentro del mismo (Castañón-Olivares *et al.*, 2007; Welsh *et al.*, 2012).

### Respuesta inmune

En la coccidioidomicosis, la inmunidad mediada por células es importante para establecer una respuesta eficaz a la infección. El curso clínico puede ser, en gran medida, influenciado por la posibilidad de que la respuesta inmune sea predominantemente dirigida hacia un patrón Th1 o hacia un patrón Th2. El IFN $\gamma$ , citoquina asociada a Th1, activa a los macrófagos, que son posteriormente capaces de inhibir o destruir los microorganismos. En contraste, las citoquinas asociadas a Th2 promueven la producción de anticuerpos y disminuyen la regulación de las funciones de Th1.

Los anticuerpos parecen no conferir protección contra los microorganismos (Martínez-Méndez & Semprún-Hernández, 2015). En infecciones autolimitadas, los pacientes suelen presentar un fuerte retraso en las respuestas de hipersensibilidad a antígenos coccidioidales y tienen títulos de anticuerpos bajos. Por el contrario, los pacientes con infección diseminada manifiestan típicamente un débil o nulo retraso en la respuesta de hipersensibilidad y tienen altos títulos de anticuerpos (Martínez-Méndez & Semprún-Hernández, 2015).

Tras la recuperación de las autoinfecciones limitadas, los pacientes suelen tener inmunidad de por vida. Además de los mecanismos mediados por células T de la inmunidad adquirida, las células natural killer (NK) pueden jugar un papel en la resistencia innata a los organismos (DiCaudo, 2006). Mediante técnicas de inmunohistoquímica se demostró el predominio de linfocitos T en el centro y la periferia de los granulomas, mientras que los linfocitos B se encontraban distribuidos en la periferia de los mismos, independientemente del tejido donde se desarrolló la lesión, de la cantidad de lesiones y de hongos y de la naturaleza y gravedad de la respuesta inflamatoria (Shubitz *et al.*, 2011).

### Aspectos clínicos

La principal forma de contagio de la enfermedad es por la inhalación de los artroconidios dispersos en el ambiente. Otra forma de contagio, menos frecuente, es la inoculación directa de esporas en el tejido del animal, lo que origina la formación de un granuloma localizado (Shubitz & Dial, 2005; Espinoza *et al.*, 2014).

### Signos clínicos

Las infecciones en los animales varían desde asintomáticas a graves y mortales. El hongo es capaz de invadir casi cualquier tejido del cuerpo. Los sitios más comunes de propagación varían con las especies, pero casi todos los tejidos y órganos pueden ser afectados. La afección del corazón o del pericardio puede ser más común en animales que en humanos. La propagación puede o no estar acompañada de signos de enfermedad sistémica (Shubitz & Dial, 2005; Shubitz, 2007).

La diseminación hematológica y linfática de endosporas origina la enfermedad diseminada. Uno de los órganos mayormente afectados son los ojos, causando uveítis granulomatosa unilateral o bilateral; también afecta frecuentemente el ángulo de filtración, cuerpo ciliar, retina y coroides. En algunos de los casos se puede presentar hipema y hemorragia vítrea (Schaer, 2006). Los órganos que se encuentran afectados principalmente son linfónodos, pulmón, hueso, corazón, mediastino y piel (Shubitz *et al.*, 2011; Ortiz *et al.*, 2015).



### *Formas clínicas*

La infección por *Coccidioides* spp. puede ser asintomática o sintomática. La primera se resuelve completamente, estableciéndose inmunidad ante una reinfección. La infección sintomática puede presentar un curso subagudo o crónico progresivo que, sin un tratamiento adecuado, puede llevar a la muerte (Shubitz & Dial, 2005).

#### Formas de presentación

##### Enfermedad pulmonar leve:

Cursa con manifestaciones clínicas leves a inaparentes después de una a cuatro semanas de exposición. Un hospedero con el sistema inmunológico competente podrá combatir la infección e inclusive resolverla.

##### Enfermedad multisistémica diseminada:

Se presenta después de meses o años de la exposición y es más frecuente en perros que en gatos. Los felinos son naturalmente más resistentes a este tipo de presentación. A partir de los pulmones se disemina hacia todos los órganos por medio de las circulaciones linfática y sanguínea.

### **Manifestaciones clínicas en caninos**

Los perros machos, jóvenes, de razas boxer, pointer, pastor australiano, beagle, scottish terrier, doberman pinscher y cocker spaniel que viven en los exteriores de las viviendas en áreas endémicas son afectados con más frecuencia (Morgan *et al.*, 2004). El hábito del perro de olfatear aumenta las probabilidades de contraer la enfermedad (Ettinger & Feldman, 2004; Morgan *et al.*, 2004). En los perros y en otras especies animales se comprobó que se necesitan 10 artroconidios para producir la enfermedad clínica (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2013). La presentación de signos respiratorios se debe a la respuesta inflamatoria originada en el hospedero a causa de las endosporas. Una enfermedad respiratoria leve o subclínica se debe a una buena respuesta inmunitaria, mientras que la enfermedad pulmonar grave y diseminada se da en animales con una pobre respuesta inmunológica (Morgan *et al.*, 2004).

En perros, el periodo de incubación puede variar entre 1 y 3 semanas. Esto se debe a la respuesta inmunitaria de cada animal, lo que también determina la severidad de la enfermedad clínica (Ettinger & Feldman, 2004). La mayoría de los perros infectados presenta fiebre, inapetencia y pérdida de peso progresiva. También es común observar complicaciones en el aparato respiratorio con síntomas leves o, en algunos casos, hasta inaparente. La tos es el síntoma predominante. Las lesiones cutáneas con drenaje, queratitis, uveítis, ceguera aguda, cojeras asociadas con dolor de huesos largos e inflamación del periostio son otras

manifestaciones que pueden observarse (Schaer, 2006; Shubitz, 2007).

Aproximadamente el 20 % de los perros presenta lesiones cutáneas: nódulos, abscesos, úlceras y trayectos fistulosos. Comúnmente, las lesiones de piel son consecuencia de las infecciones óseas subyacentes, mientras las infecciones primariamente cutáneas son consecuencia de la inoculación directa del agente en la piel (Ettinger & Feldman, 2004; Morgan *et al.*, 2004).

A diferencia de los humanos, en los que *Coccidioides* spp. puede producir meningitis, en perros se producen lesiones granulomatosas en el SNC con convulsiones. Si la enfermedad involucra el corazón y el pericardio puede causar disfunción cardíaca, arritmias, síncope o muerte súbita (Shubitz, 2007).

### **Manifestaciones clínicas en felinos**

La coccidioidomicosis no tiene predilección de sexo o raza en los gatos. Se diagnostica con mucha menos frecuencia que en los perros, por lo que la información existente es limitada (Lloret *et al.*, 2013). Las lesiones cutáneas parecen ser el signo presente más frecuente; en general, al momento del diagnóstico la enfermedad está diseminada y es de curso grave. Pueden observarse dermatitis con lesiones que no tienden a cicatrizar, úlceras o abscesos crónicos que no responden a los antibióticos. De estas lesiones pueden obtenerse biopsias, aspirados o materiales para cultivo (Morgan *et al.*, 2004; Shubitz, 2007). Puede producirse una linfadenopatía regional. Frecuentemente se observan signos no específicos, tales como fiebre, letargo, pérdida de peso y anorexia (Castañón-Olivares *et al.*, 2007; Welsh *et al.*, 2012).

En algunos gatos, la pérdida de peso severa puede ser el único signo (Gómez & Guida, 2010). Los signos respiratorios no son tan comunes en los gatos como en los perros; sin embargo, pueden existir lesiones pulmonares sin manifestaciones clínicas. Se comprobó que el 25 % de todos los gatos afectados por el hongo tienen dificultad respiratoria, pero la tos no es común. Otros sitios de diseminación son similares a los de los perros, a pesar de que los huesos no parecen estar involucrados con tanta frecuencia como en los caninos (Ettinger & Feldman, 2004).

Los signos de afección del SNC son más variables en los gatos y pueden incluir incoordinación, convulsiones, hiperestesia y cambios de comportamiento. También pueden observarse uveítis anterior, granulomas fúngicos y desprendimiento de retina. En algunos gatos con enfermedad ocular se ha registrado inflamación periorcular y masas inflamatorias en la conjuntiva palpebral (Ettinger & Feldman, 2004; Schaer, 2006; Jinks *et al.*, 2016).

## Diagnóstico diferencial

Todos los signos clínicos referidos son inespecíficos, por lo que son necesarias pruebas de laboratorio para determinar la causa de la enfermedad. Los diagnósticos diferenciales incluyen: tuberculosis, neoplasias, otras micosis sistémicas y neumonías de origen bacteriano. La coccidioidomicosis es, de hecho, la "gran imitadora" (DiCaudo, 20063; Castañón-Olivares *et al.*, 2007).

## Métodos de diagnóstico

El diagnóstico requiere de un conjunto de pruebas directas e indirectas, acompañadas de una anamnesis pertinente y un examen físico minucioso. En los animales con sospechas de granulomas cerebrales se debe recurrir a estudios avanzados de imágenes, tales como la resonancia magnética o la tomografía axial computarizada (Ettinger & Feldman, 2004).

La coccidioidomicosis se diagnostica mediante la observación de *Coccidioides* spp. en muestras procedentes de tejidos, exudados, líquido de lavado transtraqueal o broncoalveolar, linfonódulos y líquido pleural. En el hospedero el agente forma esférulas de un diámetro de 10 a 70  $\mu\text{m}$ , pero se sabe que algunas pueden medir hasta 200  $\mu\text{m}$  (Shubitz & Dial, 2005). En casos raros el hongo forma hifas en los tejidos o los alvéolos pulmonares (Welsh *et al.*, 2012).

La determinación de anticuerpos en animales que padecen la enfermedad puede ser negativa o registrar valores muy bajos. Los estudios serológicos en felinos son discutidos; no obstante, se puede detectar IgM específica en un 82 % de los gatos infectados e IgG específica en el 100 % (Ettinger & Feldman, 2004).

Los hallazgos hematológicos incluyen anemia leve, normocítica, normocrómica y no regenerativa. A menudo se aprecia neutrofilia moderada, por lo general con desviación a la izquierda, y monocitosis, mientras que la hipoalbuminemia y la hiperglobulinemia son anomalías constantes. Los hallazgos bioquímicos incluyen el incremento de las concentraciones séricas de ALT, AST, fosfatasa alcalina (FA) y bilirrubina total (BT), lo que indica compromiso hepático. La azoemia y la hiperfosfatemia pueden ser indicativas de compromiso renal.

En algunos casos se observa hipercalcemia (Morgan *et al.*, 2004). Un estudio retrospectivo evidenció glomerulonefritis mediada por complejos inmunes en caninos y se sugirió que la coccidioidomicosis pulmonar persistente puede estimular una respuesta inmune, que puede producir daño glomerular (Mehrkens *et al.*, 2016).

En las radiografías de tórax de caninos se suelen observar anomalías como patrones intersticiales o peribronquiolares difusos y rara vez infiltrados alveolares. Algunos autores documentaron linfadenopatía hiliar en cerca del 80 % de los

perros y afectación pleural manifestada por engrosamiento o derrame en menos del 65 % (Ettinger & Feldman, 2004).

## Métodos directos

### Examen directo en fresco

En el laboratorio, el examen en fresco con KOH forma parte de la rutina para la observación de hongos en materiales biológicos. Con esta técnica se puede ver la doble pared. La fase tisular del microorganismo generalmente se observa como cuerpos esféricos de 10 a 70  $\mu\text{m}$ , de pared gruesa y sin yemas, en cuyo interior presentan gran cantidad de endosporas de 2 a 5  $\mu\text{m}$  (esférulas inmaduras). Las esférulas más pequeñas pueden carecer de endosporas (Canteros & Suárez-Álvarez, 2012). Las esférulas inmaduras pueden confundirse con otros elementos, por lo que deben buscarse las esférulas maduras llenas de endosporas (Ajithdoss *et al.*, 2011).

## Cultivo

El desarrollo del hongo en cultivo confirma el diagnóstico. No obstante, debido a la naturaleza altamente infectante de los artroconidios, este análisis queda reservado para laboratorios de referencia con niveles de bioseguridad adecuados (laboratorio de bioseguridad nivel 3) (Schaer, 2006).

La identificación depende del hallazgo de los artroconidios característicos de la fase saprofítica de *Coccidioides* (Figura 1). Los artroconidios se consideran altamente infectantes y patógenos, por lo que en muchos casos se obvia el cultivo y se remiten muestras para histopatología o serología. Para la identificación definitiva se requiere la producción de esférulas en animales infectados en forma experimental o en cultivo líquido en medio de Converse a 37 °C en atmósfera de CO<sub>2</sub> (Ajithdoss *et al.*, 2011; Welsh *et al.*, 2012).

*C. immitis* y *C. posadasii* crecen en una gran variedad de medios de cultivo con antibióticos o sin ellos a 28 °C y a 37 °C. En algunos casos, su desarrollo puede tardar hasta 3 semanas (Morgan *et al.*, 2004; Welsh *et al.*, 2012). Existen medios de cultivo como el agar Mycosel® o Mycobiotic® (agar dextrosa Sabouraud con cicloheximida), en los que, entre 25 y 30 °C, se observan que, macroscópicamente, al tercer día la colonia es glabra, después vellosa y luego francamente algodonosa, de color blanco grisáceo o amarillento. Microscópicamente, se observan hifas delgadas y septadas con artrosporas rectangulares de 2 x 3 ó 4 x 6  $\mu\text{m}$ . Los artroconidios, estructuras de pared gruesa, alternos a lo largo de la hifa y separados unos de otros por células disyuntoras, empiezan a aparecer entre el décimo y décimo cuarto día. El cultivo se debe realizar en

tubo y examinar entre siete a diez días posinóculo. Para la observación microscópica, en caso de no poseer un laboratorio de nivel BSL3, es necesario colocar gotas de formol dentro del tubo antes de tomar la alícuota (DiCaudo, 2006; Castañón-Olivares *et al.*, 2007).

Conviene recordar que *Coccidioides* spp. en el cultivo, tanto a 36-37 °C como a 25-30 °C, crece en forma de micelio y es altamente infectante.

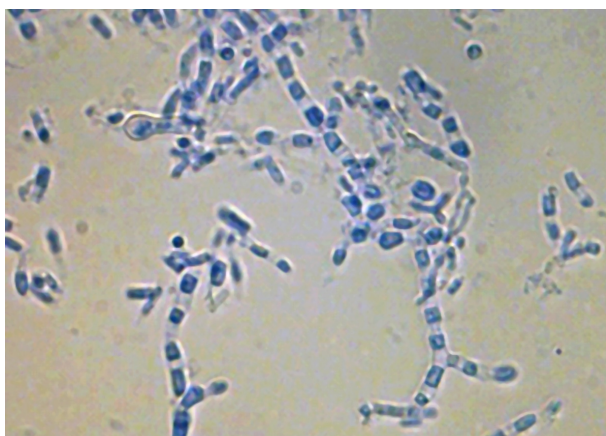


Figura 1. Fase saprófita de *C. posadasii* (objetivo 40X). Impronta de cultivo micológico. Tinción azul de algodón. Gentileza del Dr. Gustavo Giusiano.

### Histopatología

Los pulmones son los órganos más afectados, pero la infección puede involucrar a otros órganos como los linfonódulos, piel, bazo, hígado, riñones, huesos, articulaciones y órganos del SNC. En el examen histológico se observa el granuloma coccidioidal. La presencia de necrosis con abundantes leucocitos polimorfonucleares neutrófilos y eosinófilos es una característica común en estas lesiones, pero también pueden estar presentes en otras formas clínicas. Se observan, además, linfocitos, células epitelioides, células gigantes multinucleadas y fibrosis (Welsh *et al.*, 2012; Carrada-Bravo, 2014).

Las lesiones macroscópicas reflejan los cambios histopatológicos, que pueden incluir respuesta piogranulomatosa con neutrófilos, eosinófilos, macrófagos, células gigantes multinucleadas con células epitelioides, necrosis caseosa e hialinización o fibrosis con linfocitos en la periferia. Los cambios granulomatosos, fibrosis y ocasionalmente calcificación pueden representar lesiones crónicas, pero únicamente la presencia de *Coccidioides* spp. los distingue de lesiones causadas por otras enfermedades (Castañón-Olivares *et al.*, 2007).

En algunos casos se han descrito vasculitis con inflamación perivascular y endarteritis obliterante en asociación con meningitis/encefalitis coccidioidal. La reacción supurativa puede ser

extensa, pero los microabscesos suelen encontrarse adyacentes a los granulomas. Ocasionalmente, la superficie de esférulas maduras teñidas con H&E muestra un depósito eosinófilo similar al fenómeno de Splendore-Hoeppli asociado con otros hongos. Además de las tinciones con H&E y Papanicolau, las tinciones que ponen de manifiesto polisacáridos, como la reacción de PAS y las técnicas de plata metenamina (PMN), son útiles para la identificación de *Coccidioides* (Vale-Echeto *et al.*, 1999). Es posible encontrar esférulas en los tejidos y, en raras ocasiones, hifas (Castañón-Olivares *et al.*, 2007). Las esférulas miden de 10 a 70 µm, tienen pared gruesa y citoplasma eosinófilo. Pueden tener aspecto de cuerpo asteroide (Splendore-Hoeppli) y en lesiones no activas se deforman y adoptan formas variadas; si se rompen dan salida a las endosporas mononucleadas de 2 a 5 µm de diámetro (Shubitz & Dial, 2005).

Con PMN se observan esférulas de color parduzco a negro, mientras que el resto del tejido se tiñe de verde. Las paredes de las células fúngicas son gruesas y en el interior se pueden ver las endosporas. También se pueden ver esférulas inmaduras y endosporas libres (Canteros & Suárez-Álvarez, 2012). La observación de formas hifales/miceliales requiere obligatoriamente de cultivo (Castañón-Olivares *et al.*, 2007).

Con PAS se observan esférulas de 10 a 70 µm de color rojo, mientras que el resto del tejido se tiñe de azul-violáceo. También resaltan con esta tinción las paredes que, al igual que con la PMN, se ven gruesas y en el interior pueden verse las endosporas (Canteros & Suárez-Álvarez, 2012). Estas tinciones especiales se utilizan en caso de duda o cuando las esférulas son escasas. Cuando las esférulas son jóvenes y pequeñas, se requiere el diagnóstico diferencial con otros organismos fúngicos, tales como *Cryptococcus neoformans* y *Blastomyces dermatitidis* y, cuando las esférulas son muy grandes, con *Rhinosporidium seeberi*, el agente de la rinosporidiosis (Welsh *et al.*, 2012).

Se pueden realizar técnicas de inmunohistoquímica (Figura 2), sensibles y específicas, en las que se utilizan anticuerpos policlonales específicos contra el agente, producidos en otra especie distinta de la del estudio. Luego se agrega un anticuerpo anti-especie, lo que amplifica la señal en el momento de observarla microscópicamente, previo revelado.

### Técnicas moleculares

Las técnicas moleculares, tales como hibridación in situ (HIS) y PCR, pueden ayudar en la identificación de *C. immitis* / *C. posadasii* en tejidos embebidos en parafina. La HIS es menos sensible pero más específica que las tinciones histológicas convencionales, como la PMN. En los casos en que los microorganismos observados no puedan diferenciarse morfológicamente de otros,



la HIS puede proporcionar confirmación específica en las secciones histológicas dificultosas. Esta técnica puede ser particularmente útil para diferenciar esferulas pequeñas e inmaduras de *C. immitis* / *posadasii* de *Blastomyces dermatitidis* y *Cryptococcus neoformans* (DiCaudo, 2006).

Con la técnica de RFLP se inició la caracterización de *Coccidioides* spp., encontrando diferencias genómicas de los aislados de distintas regiones (Zimmermann & Snedker 1994). Por otra parte, en estudios similares se halló una especie de *Coccidioides* endémica de California y otra no perteneciente a esta región (Burt *et al.*, 1997; Koufopanou *et al.*, 1997).

Otras técnicas moleculares disponibles para la identificación de especies de *Coccidioides*, a partir de muestras clínicas, son la PCR anidada y la PCR en tiempo real que amplifican un fragmento del gen que codifica un antígeno específico denominado 2/antígeno rico en prolina (Ag2/PRA) (Peng *et al.*, 1999). La primera técnica amplifica un fragmento de 340 pb perteneciente a una parte del gen que codifica el Ag2/PRA. La secuenciación del fragmento del gen Ag2/PRA amplificado por la PCR anidada permite, además, la identificación a nivel de especie de estos hongos.

La identificación mediante el uso de polimorfismos sencillos de nucleótidos (SNP) por medio de sondas taqman, es otro método de identificación de especies de *Coccidioides*; el mismo amplifica tres secuencias blanco: prolina 157, prolina 174 y glucosa sintetasa 192 (Castañón-Olivares *et al.*, 2007).

Debido al gran riesgo que conlleva el cultivo del hongo y la necesidad de un diagnóstico rápido y certero para la instauración de un tratamiento médico, se desarrolló una PCR en tiempo real para la identificación del género *Coccidioides* basada en la identificación de un fragmento de 170 pb de la región ITS2 (Binnicker *et al.*, 2007). La técnica demostró 100 % de sensibilidad y 98,4 % de especificidad en muestras de tracto respiratorio y 92,9 % de sensibilidad y 98,1 % de especificidad en muestras de tejido fresco, mientras que, en muestras tomadas de tejidos parafinados destinados a técnicas histopatológicas, se evidenció una sensibilidad del 73,4 % y una especificidad del 100 % (Binnicker *et al.*, 2007).

Para identificar de una forma más sencilla las especies a partir de cultivos, se trabajó sobre el fragmento genómico denominado Coi9 de la región ITS2, el cual produce una banda de 634 pb para *C. posadasii* y una banda de 720 pb para *C. immitis* (Umeyama *et al.*, 2006).

Posteriormente se determinó que primers dirigidos a la amplificación de fragmentos de la región ITS3 - ITS4 amplifican también la región ITS2; de esta forma, se descartó el método basado en el segmento ITS2 para la diferenciación de especies del género *Coccidioides* (Tintelnot *et al.*, 2007).

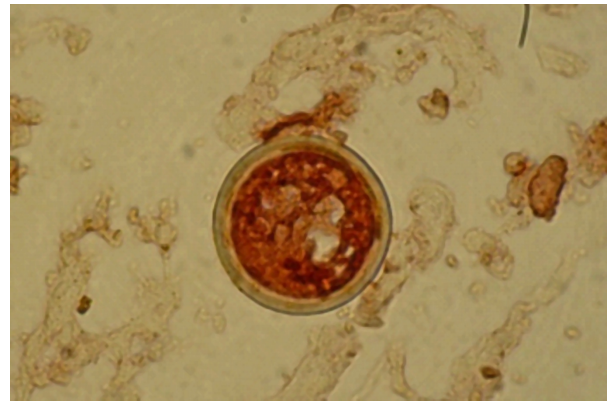


Figura 2. Endosporas de *Coccidioides posadasii*. Técnica inmunohistoquímica con peroxidasa de rábano picante (HRP), realizada en cortes histológicos de una biopsia de piel de perro, utilizando un anticuerpo anti-*Coccidioides* y diaminobenzidina como cromógeno. Aumento 1000X. Gentileza del Dr. Roberto Suárez-Álvarez. Departamento de Micología. ANLIS-INEI "Dr. Carlos G. Malbrán".

### Métodos indirectos

#### Inmunodiagnóstico

Prueba cutánea con coccidioidina o esferulina:

Se la realiza mediante la inyección intradérmica de 0,1 ml de coccidioidina diluida. La reacción de hipersensibilidad se lee a las 24 y 48 horas y se considera positiva con una inflamación de 5 mm o más, con respecto a la medida pre-inoculación. Esta prueba se emplea en estudios epidemiológicos para determinar la prevalencia de exposición y la presencia de brotes. El uso de la coccidioidina para diagnosticar enfermedad activa en zonas endémicas ha sido descartado, ya que solo evidencia contacto con el hongo (primoinfección) y no enfermedad activa. La prueba es de valor diagnóstico solo en animales con antecedentes de reacción negativa. Una prueba cutánea negativa en un animal que antes había resultado positiva, indica anergia acompañada de enfermedad diseminada avanzada (Welsh *et al.*, 2012).

Prueba de precipitación en tubo:

Se usa para detectar la enfermedad activa en estadios tempranos. La prueba detecta anticuerpos precipitantes IgM (Laniado-Laborin *et al.*, 2012).

Prueba de fijación del complemento (FC):

Es una prueba que conlleva altos estándares, tanto en la preparación de reactivos como en la capacitación del personal. Es útil para el diagnóstico de la enfermedad, pero el punto clave es la importancia de la prueba para el pronóstico, mediante el seguimiento de la conversión de títulos; los anticuerpos fijadores del complemento se elevan en la enfermedad activa y diseminada. La FC es una prueba no rutinaria y la realizan



solamente laboratorios de referencia (Ettinger & Feldman, 2004; Morgan *et al.*, 2004).

Inmunodifusión en gel de agar y contrainmuno-electroforesis:

Son los métodos mayormente empleados para el diagnóstico de coccidiodomicosis en la rutina diaria de laboratorios de diagnóstico de zonas endémicas (Ettinger & Feldman, 2004). Esta prueba tiene valor diagnóstico. Arrojan resultados positivos casi al mismo tiempo que la prueba de fijación de complemento. La inmunodifusión (ID) se lleva a cabo usando una muestra de suero y antígeno de *Coccidioides* spp. Es la prueba más común para el diagnóstico de la enfermedad, es de fácil realización y existen reactivos comerciales. No es de elección en lugares endémicos donde el paciente presente signos escasos e inespecíficos.

Aglutinación de partículas de látex:

Se usan partículas de látex sensibilizadas con antígeno coccidiodina. Es útil para el diagnóstico de animales con signos clínicos (Ettinger & Feldman, 2004; Morgan *et al.*, 2004).

Otros métodos serológicos son las técnicas de anticuerpos fluorescentes específicos para descubrir esférulas en los tejidos y artroconidios en el suelo. También se han usado pruebas de inhibición de anticuerpos fluorescentes. Recientemente se probó un inmunoensayo enzimático en el cual los anticuerpos IgG son reconocidos por la proteína A/G como herramienta para estudiar la expansión de la región endémica para la coccidiodomicosis. Este ensayo, con un punto de corte adecuado, puede ser adaptado a otras especies (Chow *et al.*, 2017).

## Tratamiento

Los fármacos utilizados preferentemente son el ketoconazol, a dosis de 5-15 mg/kg por vía oral cada 12 horas, o el itraconazol, a dosis de 5-10 mg/kg por vía oral cada 24 horas. El tratamiento con ketoconazol dura aproximadamente 2 meses o hasta la remisión de los signos clínicos. Una de sus desventajas es la hepatotoxicidad, presente en tratamientos prolongados (12 meses). Además, es teratogénico, limitando su uso en hembras gestantes o en hembras destinadas a la cría comercial. En perros con tratamientos de más de 12 meses puede causar cataratas (Ettinger & Feldman, 2004; Morgan *et al.*, 2004; Schaer, 2006; Gómez & Guida, 2010). El itraconazol es un triazol usado para el tratamiento de la coccidiodomicosis. Es más eficaz y tiene menos efectos secundarios que el ketoconazol. El itraconazol parece tener un mejor efecto en lesiones cutáneas, subcutáneas y óseas. Su biodisponibilidad, después de la administración de la solución oral en condiciones de ayuno, es 60 % mayor en comparación con cápsulas que se toman después de las comidas. El

hidroxitraconazol es un metabolito antifúngico activo de este fármaco, se acumula el doble de la tasa del fármaco original y aumenta la biodisponibilidad de itraconazol hasta un 80 % (Welsh *et al.*, 2012).

Los nuevos triazoles, el posaconazol y el voriconazol, son agentes antimicóticos utilizados en el tratamiento de enfermedades causadas por hongos dimorfos. El posaconazol no es metabolizado por enzima de la familia del citocromo P450 y es excretado principalmente en las heces. El posaconazol es un inhibidor del citocromo P450 3A4, pero no inhibe la actividad de otras enzimas de la familia del citocromo P450. El posaconazol, por lo tanto, comparado con otros azoles, puede tener una menor cantidad de interacciones con otros medicamentos. La dosis de posaconazol es de 800 mg al día para tratar la coccidiodomicosis generalizada (Ajithdoss *et al.*, 2011; Welsh *et al.*, 2012).

La caspofungina es una equinocandina que ha mostrado cierta eficacia en modelos murinos, con una mejor correlación *in vitro/in vivo*, utilizando una concentración mínima efectiva (CME), en lugar de una concentración mínima inhibitoria (CMI) (de Aguiar Cordeiro *et al.*, 2009). Se recomienda suministrar dosis bajas del antimicótico después de la desaparición de los signos para evitar de esa forma casos recurrentes en algunos animales. Un antimicótico muy empleado en micosis sistémicas es la anfotericina B, aunque para el tratamiento de la coccidiodomicosis parece no ser de mucha ayuda (Ettinger & Feldman, 2004).

En la actualidad se están probando fármacos antifúngicos en desarrollo como el VT-1161, el cual resultó eficaz para el tratamiento de formas respiratorias en perros naturalmente infectados, con una toxicidad mínima. Este hecho promueve investigaciones para su uso en humanos (Shubitz *et al.*, 2017).

Con respecto al seguimiento clínico, la mejor manifestación de mejora es la desaparición de los signos de la enfermedad. Cuando se realizan tratamientos con antimicóticos nitrogenados durante largos períodos se debe evaluar el perfil completo de enzimas hepáticas séricas (Ettinger & Feldman, 2004; Morgan *et al.*, 2004). Se deben evaluar los títulos de anticuerpos 3 y 6 meses después de los tratamientos para controlar la reactividad de la infección (Ettinger & Feldman, 2004).

El pronóstico en perros y gatos es bueno cuando solo se presentaron manifestaciones pulmonares. En animales con enfermedad diseminada el pronóstico es reservado; los individuos con enfermedad diseminada y suspensión del tratamiento al desaparecer los signos clínicos, generalmente padecen recaídas. La enfermedad diseminada sin tratar siempre es fatal (Morgan *et al.*, 2004).

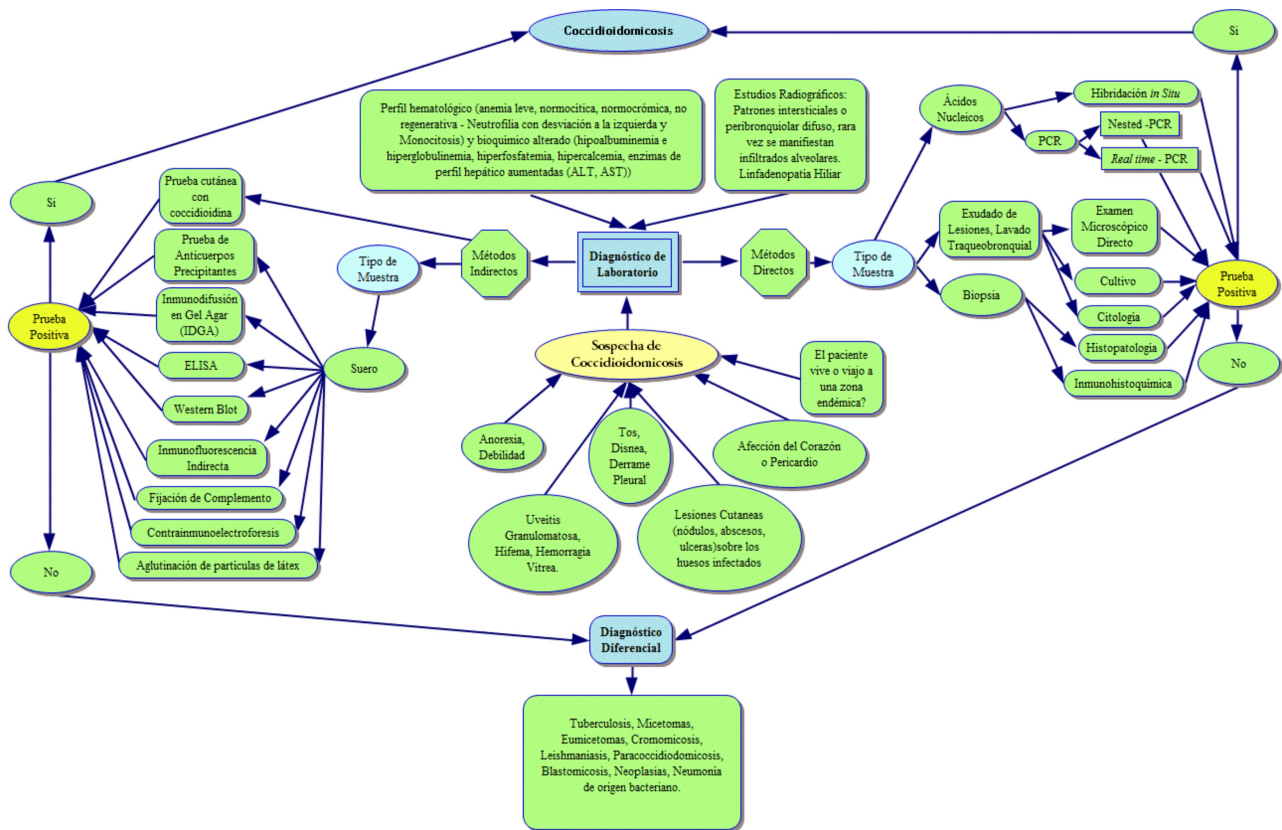


Figura 3. Algoritmo de diagnóstico de coccidioidomicosis.

### Caso clínico

En Catamarca, Argentina, el propietario de un perro de raza boxer, macho, de 2 años y 10 meses de edad, tratado anteriormente con corticoides y antibióticos por un cuadro pulmonar crónico, llegó a la consulta presentando tos, disnea, hipertermia, claudicación, emaciación, lesiones plantares ulceradas y adenopatías submaxilares y poplíteas. El médico veterinario le indicó estudios radiográficos, los cuales mostraron una neumonitis con patrón intersticial, y análisis de sangre que indicaron una leucocitosis con neutrofilia e hiperglobulinemia.

El veterinario decidió obtener una biopsia de las lesiones cutáneas para su estudio histopatológico. En el mismo se observaron granulomas histiocitarios subepidérmicos y esférulas compatibles con *Coccidioides* sp. Además, se realizaron estudios microbiológicos de linfonódulo submaxilar y serológicos para la detección de anticuerpos anti-*Coccidioides*. El examen directo aclarado con KOH, la inmunohistoquímica y otras coloraciones del tejido ganglionar revelaron presencia de esférulas y endosporas.

Se medicó al paciente con fluconazol durante los primeros 4 días de tratamiento y al quinto se decidió cambiar por itraconazol en una dosis de 100 mg/día. El paciente no presentó mejoría y se resolvió la eutanasia, debido al avanzado e irreversible cuadro clínico.

El hongo fue identificado como *Coccidioides* sp. mediante cultivo y conversión dimórfica en medio de Converse y detección de antígenos extracelulares. Posteriormente, utilizando técnicas moleculares, el hongo pudo ser identificado como *C. posadasii* mediante secuenciación de un fragmento del gen Ag2/PRA (Dra. Canteros, comunicación personal) (Casal et al., 2008).

### Algoritmo de diagnóstico

En la figura 3 se muestra un algoritmo simple para arribar al diagnóstico de la coccidioidomicosis. Es recomendable que se obtengan resultados positivos de tres o más pruebas para confirmar el diagnóstico.

### Discusión y conclusiones

El cultivo positivo de *Coccidioides* spp. aun se considera el estándar de oro para el diagnóstico de esta micosis. Sin embargo, la dificultad para la obtención de un aislamiento hace que la utilización de métodos serológicos sea más apropiada (Laniado-Laborin et al., 2012).

En estudios citológicos, dependiendo del material a examinar, puede observarse una escasa cantidad de esférulas, lo que hace dificultoso el

diagnóstico. Para llegar a un diagnóstico exitoso es necesario contar con el material clínico adecuado, en abundante cantidad, y conservarlo convenientemente hasta el momento de analizarlo. En estudios histopatológicos se recomienda tomar muestras de varios sitios para aumentar las posibilidades de encontrar el microorganismo. Las tinciones recomendadas son PAS y PMN (Morgan *et al.*, 2004). El estudio histopatológico se considera más factible que las técnicas moleculares, debido a que existen pocos laboratorios para el diagnóstico de coccidioidomicosis mediante PCR, así como para otras micosis sistémicas (Ramírez-Romero *et al.*, 2016).

En los perros que presenten una signología de debilidad crónica, linfadenopatía generalizada, cojera y nódulos o úlceras cutáneas debe considerarse, dentro de los diagnósticos diferenciales, una micosis sistémica, entre las que se encuentra la coccidioidomicosis, sobre todo en regiones en las que estas enfermedades fúngicas son consideradas endémicas. Se han realizado estudios retrospectivos para determinar la asociación de lesiones glomerulares con la coccidioidomicosis mediante histopatología, ya que un análisis de orina no es frecuente ante una sospecha de coccidioidomicosis (Mehrkens *et al.*, 2016). Sin embargo, se requieren más investigaciones con técnicas que permitan demostrar la presencia de complejos inmunes asociados a la producción de una glomerulonefritis en estos casos.

En regiones donde no es endémica, la coccidioidomicosis representa un desafío para el diagnóstico, debido a que su presentación clínica no es específica y puede sugerir otras enfermedades, incluyendo tuberculosis (Fernández *et al.*, 2017). Es indispensable emplear varias de las técnicas disponibles para llegar a un diagnóstico definitivo, tanto en humanos como animales.

La combinación de terbinafina y un triazol puede tener efectos sinérgicos en el tratamiento (Simões *et al.*, 2016). No obstante, se necesitan estudios más exhaustivos para evaluar su eficiencia en la resolución de la enfermedad.

La coccidioidomicosis es una enfermedad micótica de gran relevancia a causa de la gran variedad de especies que pueden verse afectadas, incluyendo al ser humano. Al tratarse de un problema de salud pública, el control y la vigilancia de esta enfermedad deben integrar los conocimientos de los médicos veterinarios y los médicos, sobre todo en regiones en las que la presentación de esta enfermedad no es frecuente.

### Conflicto de intereses

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.

### Bibliografía

Ajithdoss D K, Trainor KE, Snyder KD, Bridges CH, Langohr IM, Kiupel M, Porter BF. 2011. Coccidioidomycosis presenting as a heart base mass in two dogs. *Journal of Comparative Pathology*. 145:132-7.

doi: [10.1016/j.jcpa.2010.12.014](https://doi.org/10.1016/j.jcpa.2010.12.014)

Binnicker MJ, Buckwalter SP, Eisberner JJ, Stewart RA, McCullough AE, Wohlfiel SL, Wengenack NL. 2007. Detection of *Coccidioides* species in clinical specimens by real-time PCR. *Journal of Clinical Microbiology*. 45:173-8.

doi: [10.1128/JCM.01776-06](https://doi.org/10.1128/JCM.01776-06)

Burt A, Dechairo BM, Koenig GL, Carter DA, White TJ, Taylor JW. 1997. Molecular markers reveal differentiation among isolates of *Coccidioides immitis* from California, Arizona and Texas. *Molecular Ecology*. 6:781-6.

Calderón-Garcidueñas AL, Vázquez-Contreras JA, González-Murillo EA, Vázquez Martínez CA, Cerdá-Flores RM. 2013. Factores de riesgo en pacientes con coccidioidomicosis diseminada fatal. Estudio de casos y controles. *Revista Española de Patología*. 46:212-9.

Canteros C, Suárez-Álvarez R. 2012. Micosis Sistémicas Endémicas. (Tesina. Especialidad en Diagnóstico Veterinario de Laboratorio). Facultad de Ciencias Veterinarias. Universidad Nacional de la Plata, La Plata - Argentina.

Canteros CE, Toranzo A, Suárez-Álvarez R, Davel G, Castañón-Olivares LR, Nápoli J. 2009. Identidad genética del hongo causante del primer caso de coccidioidomicosis descrito por Alejandro Posadas en 1892. *Medicina (Buenos Aires)*. 69:215-20.

Carrada-Bravo T. 2014. Los métodos de laboratorio en el diagnóstico de la coccidioidomicosis. *Revista Chilena de Infectología*. 31:293-7.

Carrasco-Zuber JE, Navarrete-Dechent C, Bonifaz A, Fich F, Vial-Letelier V, Berroeta-Mauriziano D. 2016. Afectación cutánea en las micosis profundas: una revisión de la literatura. Parte 2. Micosis sistémicas. *Actas Dermo-Sifiliográficas*. 107:816-22.

doi: [10.1016/j.ad.2016.06.001](https://doi.org/10.1016/j.ad.2016.06.001)

Casal JI, Álvarez RO, Lee W, Rivas MC, Davel G, Canteros CE. 2008. Disseminated coccidioidomycosis in a dog. *Revista Argentina de Microbiología*. 40:109-19.

Castañón-Olivares LR, Guereña-Elizalde D, González-Martínez MR, Licea-Navarro AF,



- González-González GM, Aroch-Calderón A. 2007. Molecular identification of *Coccidioides* isolates from Mexican patients. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 111:326-35.  
doi: [10.1196/annals.1406.047](https://doi.org/10.1196/annals.1406.047)
- Chow NA, Lindsley MD, Mccotter OZ, Kangiser D, Wohrle RD, Clifford WR, Yaglom H D, Adams LE, Komatsu K, Durkin MM, Baker RJ, Shubitz LF, Derado G, Chiller TM, Litvintseva AP. 2017. Development of an enzyme immunoassay for detection of antibodies against *Coccidioides* in dogs and other mammalian species. *PLoS One*. 12:1-14.  
doi: [10.1371/journal.pone.0175081](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175081)
- De Aguiar-Cordeiro R, Brilhante RS, Rocha MF, Medrano DJ, Monteiro AJ, Tavares JL, De Lima RA, De Camargo ZP, Sidrim JJ. 2009. In vitro synergistic effects of antituberculous drugs plus antifungals against *Coccidioides posadasii*. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 34:278-80.  
doi: [10.1016/j.ijantimicag.2009.04.009](https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2009.04.009)
- DiCaudo DJ. 2006. Coccidioidomycosis: a review and update. *Journal of the American Academy of Dermatology*. 55:929-42.  
doi: [10.1016/j.jaad.2006.04.039](https://doi.org/10.1016/j.jaad.2006.04.039)
- Espinoza Pérez J, Agüero Balbín R, Martínez Meñaca A, Ciorba C, Mora Cuesta V. 2014. Micosis pulmonares. *Medicine*. 11(66):3949-62.  
doi: [10.1016/S0304-5412\(14\)70867-4](https://doi.org/10.1016/S0304-5412(14)70867-4)
- Ettinger SJ, Feldman EC. 2004. *Veterinary Internal Medicine*. Philadelphia, Elsevier. pp. 1359-60.
- Fernández R, Arenas R, Duarte-Escalante E, Frías-De León MG, Vega Memige ME, Acosta Altamirano G, Reyes-Montes MDR. 2017. Diagnosis of coccidioidomycosis in a non-endemic area: inference of the probable geographic area of an infection. *Revista Iberoamericana de Micología*. 34:237-40.  
doi: [10.1016/j.riam.2017.03.006](https://doi.org/10.1016/j.riam.2017.03.006)
- Fisher MC, Koenig GL, White TJ, Taylor J W. 2002. Molecular and phenotypic description of *Coccidioides posadasii* sp. nov., previously recognized as the non-California population of *Coccidioides immitis*. *Mycologia*. 94:73-84.
- Gómez N, Guida N. Coccidioidomycosis. En: Gómez N, Guida N. 2010. *Enfermedades infecciosas de los caninos y felinos*, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Inter-Médica, 65-66.
- Jinks MR, English RV, Gilger BC. 2016. Causes of endogenous uveitis in cats presented to referral clinics in North Carolina. *Veterinary Ophthalmology*. 19(1):30-7.  
doi: [10.1111/vop.12324](https://doi.org/10.1111/vop.12324)
- Koufopanou V, Burt A, Taylor JW. 1997. Concordance of gene genealogies reveals reproductive isolation in the pathogenic fungus *Coccidioides immitis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 94:5478-82.
- Laniado-Laborin R, Alcantar-Schramm JM, Cazares-Adame R. 2012. Coccidioidomycosis: An update. *Current Fungal Infection Reports*. 6:113-20.
- Lloret A, Hartmann K, Pennisi MG, Ferrer L, Addie D, Belak S, Boucraut-Baralon C, Egberink H, Frymus T, Gruffydd-Jones T, Hosie MJ, Lutz H, Marsilio F, Mostl K, Radford AD, Thiry E, Truyen U, Horzinek MC. 2013. Rare systemic mycoses in cats: blastomycosis, histoplasmosis and coccidioidomycosis: ABCD guidelines on prevention and management. *Journal of Feline Medicine and Surgery*. 15:624-7.  
doi: [10.1177/1098612X13489226](https://doi.org/10.1177/1098612X13489226)
- Martínez-Méndez DK, Semprún-Hernández N, Hernández-Valles RC. 2015. Coccidioidomycosis: estado actual de la endemia en Venezuela. *Investigación Clínica*. 56:411-20.
- Mehrkens LR, Mohr FC, Sykes JE. 2016. Clinicopathologic and histopathologic renal abnormalities in dogs with coccidioidomycosis. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. 30:1667-71.  
doi: [10.1111/jvim.14573](https://doi.org/10.1111/jvim.14573)
- Morgan RV, Bright R M, Swartout MS. 2004. *Clínica de pequeños animales 4º ed*. Madrid, SA Elsevier España.
- Negrón R. 2011. Historia del descubrimiento de la coccidioidomycosis. *Revista Argentina de Dermatología*. 92:1-15.
- Ortiz-Encinas V, Lares-Villa F, Luna-Nevárez P, Reyna-Granados J, Munguía-Xóchihua J, Ibarra-Gómez J. 2015. Estudios anatómico patológicos, serológicos e histopatológicos de perros positivos a coccidioidomycosis infectados naturalmente. *Abanico Veterinario*. 5:13-25.
- Peng T, Orsborn KI, Orbach MJ, Galgiani JN. 1999. Proline-rich vaccine candidate antigen of *Coccidioides immitis*: conservation among isolates and differential expression with spherule maturation. *Journal of Infectious Diseases*. 179:518-21.  
doi: [10.1086/314604](https://doi.org/10.1086/314604)



Ramírez-Romero R, Silva-Pérez RA, Lara-Arias J, Ramírez-Hernández C, Marino-Martínez IA, Barbosa-Quintana A, López-Mayagoitia A. 2016. Coccidioidomycosis in biopsies with presumptive diagnosis of malignancy in dogs: report of three cases and comparative discussion of published reports. *Mycopathologia*. 181:151-7.  
[doi: 10.1007/s11046-015-9948-4](https://doi.org/10.1007/s11046-015-9948-4)

Schaer M. 2006. *Medicina clínica del perro y el gato*. Madrid, Elsevier España.

Shubitz LF. 2007. Comparative aspects of coccidioidomycosis in animals and humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1111:395-403.  
[doi: 10.1196/annals.1406.007](https://doi.org/10.1196/annals.1406.007)

Shubitz LF, Dial SM. 2005. Coccidioidomycosis: a diagnostic challenge. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 20:220-6.  
[doi: 10.1053/j.ctsap.2005.07.002](https://doi.org/10.1053/j.ctsap.2005.07.002)

Shubitz LF, Dial SM, Galgiani JN. 2011. T-lymphocyte predominance in lesions of canine coccidioidomycosis. *Veterinary Pathology*. 48:1008-11.  
[doi: 10.1177/0300985810384410](https://doi.org/10.1177/0300985810384410)

Shubitz LF, Roy ME, Trinh HT, Hoekstra WJ, Schotzinger RJ, Garvey EP. 2017. Efficacy of the investigational antifungal VT-1161 in treating naturally occurring coccidioidomycosis in dogs. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 61(5): 111-7.  
[doi: 10.1128/AAC.00111-17](https://doi.org/10.1128/AAC.00111-17)

Simoes DM, Dial SM, Coyner KS, Schick AE, Lewis TP. 2nd. 2016. Retrospective analysis of cutaneous

lesions in 23 canine and 17 feline cases of coccidioidomycosis seen in Arizona, USA (2009-2015). *Veterinary Dermatology*. 27:346-87.  
[doi: 10.1111/vde.12356](https://doi.org/10.1111/vde.12356)

Tintelnot K, De Hoog GS, Antweile E, Losert H, Seibold M, Brandt MA, Van Den Ende A. H, Fisher MC. 2007. Taxonomic and diagnostic markers for identification of *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*. *Medical Mycology*. 45:385-93.  
[doi: 10.1080/13693780701288070](https://doi.org/10.1080/13693780701288070)

Umeyama T, Sano A, Kamei K, Niimi M, Nishimura K, Uehara Y. 2006. Novel approach to designing primers for identification and distinction of the human pathogenic fungi *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii* by PCR amplification. *Journal of Clinical Microbiology*. 44:1859-62.  
[doi: 10.1128/JCM.44.5.1859-1862.2006](https://doi.org/10.1128/JCM.44.5.1859-1862.2006)

Vale-Echeto O, Alvarado-Morillo M, Fernández-Orozco E, Camacho-Bracho J, Delgado C. 1999. Coccidioidomycosis sistémica en canino: estudio radiológico y anatomopatológico de un caso. *Revista Científica FCV-LUZ*. 9: 267-75.

Welsh O, Vera-Cabrera L, Rendon A, González G, Bonifaz A. 2012. Coccidioidomycosis. *Clinics in Dermatology*. 30:573-91.  
[doi: 10.1016/j.clindermatol.2012.01.003](https://doi.org/10.1016/j.clindermatol.2012.01.003)

Zimmermann CR, Snedker CJ, Pappagianis D. 1994. Characterization of *Coccidioides immitis* isolates by restriction fragment length polymorphisms. *Journal of Clinical Microbiology*. 32:3040-2.

# Determinación de la concentración de solutos en orinas de pacientes caninos: comparación de osmometría versus densidad urinaria (refractometría y tiras reactivas)

## *Determination of the urine solutes concentration in dogs: osmometry versus urine density (refractometry and reactive strips) compared*

RODRÍGUEZ JV<sup>1,2\*</sup>, COLLA C<sup>1</sup>, GINES MB<sup>1</sup>, SCHRÖDER G<sup>1</sup>

1 Laboratorio Centralizado Hospital Escuela de Grandes y Pequeños Animales, (HEGYPA). Facultad de Ciencias Veterinarias; 2 Centro Binacional de Investigaciones en Criobiología Clínica y Aplicada (CAIC). Universidad Nacional de Rosario (UNR).

\* Correo electrónico del autor de contacto: [jrodrig@fbiouf.unr.edu.ar](mailto:jrodrig@fbiouf.unr.edu.ar)

### Resumen

Para estimar la concentración de solutos urinarios, los métodos disponibles son la osmometría (OSM) (método de referencia) y la densidad urinaria (DU) que puede ser determinada mediante la densimetría, la refractometría (RF) y las tiras reactivas (TR). En veterinaria se usa tradicionalmente la RF, aunque recientemente se ha detectado la tendencia en algunos laboratorios al uso de TR. En la literatura existen controversias acerca de la eficacia de la TR respecto de su uso en muestras de caninos y felinos. Los objetivos de este estudio fueron: valorar la exactitud de la RF y de las TR en la determinación de la DU en la orina de caninos comparándolas con el método de referencia, la OSM, y establecer un criterio para la valoración de la DU en las muestras de orina recibidas en nuestro laboratorio. Se analizaron 35 muestras de pacientes caninos. Se compararon: 1-osmolalidad de las muestras mediante la técnica de descenso crioscópico, 2- DU utilizando un refractómetro clínico y 3- DU utilizando tiras reactivas comerciales. Los resultados mostraron una fuerte correlación entre los valores de la DU determinados por RF y la OSM con una clara tendencia lineal. En cambio, la correlación entre la DU estimada por TR y la OSM fue muy débil, mostrando la falta de asociación entre dichas mediciones. Estos resultados sugieren que las TR muestran un valor posible de la DU, pero no su valor real. Para estimar la DU en caninos, la RF es el método óptimo en términos de costos, medición en campo, simpleza y fiabilidad.

### Palabras clave

Osmometría, refractometría, tiras reactivas, orina, caninos

### Abstract

Several methods are available for urinary solute concentration determination, such as osmometry (OSM) (reference method) and urine density (UD). UD can be determined by urinometry, refractometry (RF) and reactive strips (RS). In veterinary medicine, RF is the most commonly used method; however, the use of RS to determine UD is increasing in many diagnostic laboratories. The objectives of this investigation were to evaluate the accuracy of RF and RS on the UD determination of canine urine compared to the reference method, and to establish an analytical criterion for the DU estimation of the urine samples received in our laboratory. In this study, 35 urine samples from canine patients were analyzed. We compared the results obtained using three analytical methods: 1- Osmolality by the freezing point depression method, 2- UD by a clinical refractometer and 3- UD using commercial RS. The readings from the clinical refractometer showed an excellent correlation with the osmolality results, with a lineal tendency between both parameters. However, the correlation between UD estimated by RS and osmolality was very weak, showing lack of association between both methods. These results suggest that the RS could provide an approximate but not accurate UD value, and that RF is a more appropriate method in terms of cost, use in the field and accuracy for the assessment of UD in dogs.

### Key words

Osmometry, refractometry, reactive strips, urine, canine

Fecha de recepción: 12/10/2017

ANALECTA VET 2018; 38(1): 45-49

Fecha de aprobación: 02/03/2018

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

doi.org/10.24215/15142590e024

## Introducción

Para estimar la concentración de solutos en la orina existen dos métodos, 1- la osmometría (OSM), considerada la técnica de referencia, (Watson, 1998) y 2- la determinación de la densidad urinaria (DU), equivalente al peso específico en el sistema métrico decimal. Para determinar la DU pueden utilizarse técnicas como la refractometría (RF), la urinometría (densímetro) y las tiras reactivas (TR). En el laboratorio clínico veterinario, debido al pequeño volumen de las muestras de orina, se utiliza tradicionalmente la RF, aunque recientemente se ha detectado la tendencia en algunos laboratorios al uso de TR, tanto manual como automatizado con lectores de TR. En la literatura existen controversias acerca de la eficacia de la TR (diseñada para orina humana) respecto de su uso en caninos y felinos (Dossin *et al.*, 2003; Sink & Weinstein, 2012). Dada la importancia creciente de la aplicación de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) en los laboratorios clínicos veterinarios es imprescindible estandarizar protocolos con referencia a la metodología a aplicar en el análisis de las muestras. Los objetivos de este estudio fueron: a- valorar la exactitud de la RF y de las TR en la determinación de la DU en la orina de caninos comparándolas con el método de referencia (OSM) y b- establecer un criterio para la valoración de la DU en las muestras de orina recibidas en nuestro laboratorio.

## Descripción metodológica

Se analizaron 35 muestras de orina provenientes de un universo de pacientes caninos de distintas edades, sexo y razas. Las muestras fueron recibidas y procesadas en el laboratorio, se excluyeron las muestras que contenían glucosa y, en los casos en que se detectaron trazas de proteínas, se aplicó el criterio que se detalla en el texto. La presencia de glucosa y proteínas se estimó mediante la TR (Siemens Multistix 1056, Alemania). En todas las muestras se determinó la concentración de proteínas urinarias utilizando la técnica espectrofotométrica del rojo de pirogalol (Proti U/LCR, Wiener Lab, Argentina) y la concentración de creatinina urinaria mediante la reacción de Jaffé (Biggs & Cooper, 1961). El criterio para la exclusión de muestras con presencia de proteínas fue: concentración de proteínas urinarias >270 mg/l y relación proteína/creatinina >0,20 (Tvedten, 2016). Para valorar la exactitud de la RF y de las TR se decidió comparar los resultados obtenidos utilizando los tres métodos: 1- determinación de la osmolalidad de las muestras mediante la técnica de descenso crioscópico (Osmomat 030, Gonotec, Alemania, calibración del instrumento mediante estándares de 300, 850 y 2000 mOsm/KgH<sub>2</sub>O), 2- determinación de la DU utilizando un refractómetro clínico (Alla France mod. 95000-017, Francia) y 3-

determinación de la DU utilizando tiras reactivas (Siemens Multistix 1056, Alemania). Esta última fue realizada por un sólo operador por comparación colorimétrica visual con la escala provista en el kit.

En las muestras se determinó la DU por RF y TR y luego fueron conservadas a -20 °C hasta la determinación de la OSM. En los casos en que la DU excedió los límites establecidos en el refractómetro (DU >1,050) y en TR (DU >1,030) las muestras fueron diluidas 1/2 con agua destilada y luego analizadas. Para determinar la DU de la dilución se multiplicó la porción decimal de la nueva lectura por la dilución realizada (por ejemplo: DU determinada en dilución 1/2 =1,020, luego: 0,020 x 2 = 0,040, entonces la DU corregida será 1,040) (Sink & Weinstein, 2012).

## Discusión y conclusiones

Los resultados mostraron una fuerte correlación entre los valores de la DU determinados por RF y la OSM, ( $r = 0,9884$ ), con una clara tendencia lineal (Fig. 1A). También ello sucedió para los valores de DU >1,050 que fueron diluidos. En cambio, la correlación entre la DU estimada por TR y la OSM fue muy débil ( $r = 0,4306$ ), mostrando una falta de asociación entre dichas mediciones (Fig. 1B). Debido a la dispersión de los datos obtenidos no podemos determinar si la interferencia presentada en el análisis por TR sobre o subestima la DU.

Cuando se correlacionaron los valores de DU determinados por RF y TR también se encontró una asociación débil entre ellos (DU-RF,  $r = 0,3844$ ; DU-TR =  $0,668 + 0,342 \cdot n$ ,  $n=35$ ) (Fig. 1C).

Respecto de la concentración urinaria de glucosa, proteínas y creatinina, ninguna muestra contenía glucosa. La relación proteína/creatinina en la orina se utilizó como criterio para compensar la dilución o concentración de la orina en la excreción de analitos como las proteínas (Trumel *et al.*, 2004). En este trabajo, las concentraciones de proteínas oscilaron entre 14–268 mg/l (mediana 192 mg/l), las concentraciones de creatinina urinaria fueron de 93–2940 mg/l (mediana 1131 mg/l) y las relaciones P/C fueron de 0,01–0,203 (mediana 0,074) para las 35 muestras de orina analizadas.

La TR estima indirectamente la DU utilizando la medida de la fuerza iónica de la orina. El principio básico de este método considera que los constituyentes iónicos y no iónicos de la orina están presentes en proporción constante y esto no es siempre así (Chadha *et al.*, 2001). Esta determinación es afectada por la composición iónica de la orina, las proteínas que tienen carga eléctrica en solución y por el pH de la misma, mayormente en el rango alcalino (Dorner *et al.*, 1984). Por estas razones, solamente las orinas con un pH de 7 a 7,5 deberían ser analizadas utilizando

TR; en nuestro caso el rango de pH de las orinas analizadas fue de 6,0 a 8,5. Además, para la misma concentración iónica total, diferentes iones afectan de distinta manera la DU, por ejemplo: para orinas con osmolalidad constante los cationes como el  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  incrementan la DU desproporcionadamente con respecto al  $\text{Na}^+$  y al  $\text{K}^+$  (Dorner *et al.*, 1984). En cambio, la glucosuria o proteinuria incrementan las lecturas refractométricas de la orina; por ello, es importante realizar las correcciones apropiadas en la DU (Chadha *et al.*, 2001). Para las determinaciones de DU diarias utilizamos los factores de corrección informados en la bibliografía (Pradella *et al.*, 1988).

Los resultados obtenidos indican claramente que las TR no deben utilizarse para estimar la DU en caninos, siendo la RF el método óptimo en términos de costos, medición en campo y fiabilidad.

Como consecuencia de la investigación realizada, se estableció entonces la siguiente secuencia para la determinación de la DU en el análisis completo de la orina realizado en muestras de caninos (Fig. 2):

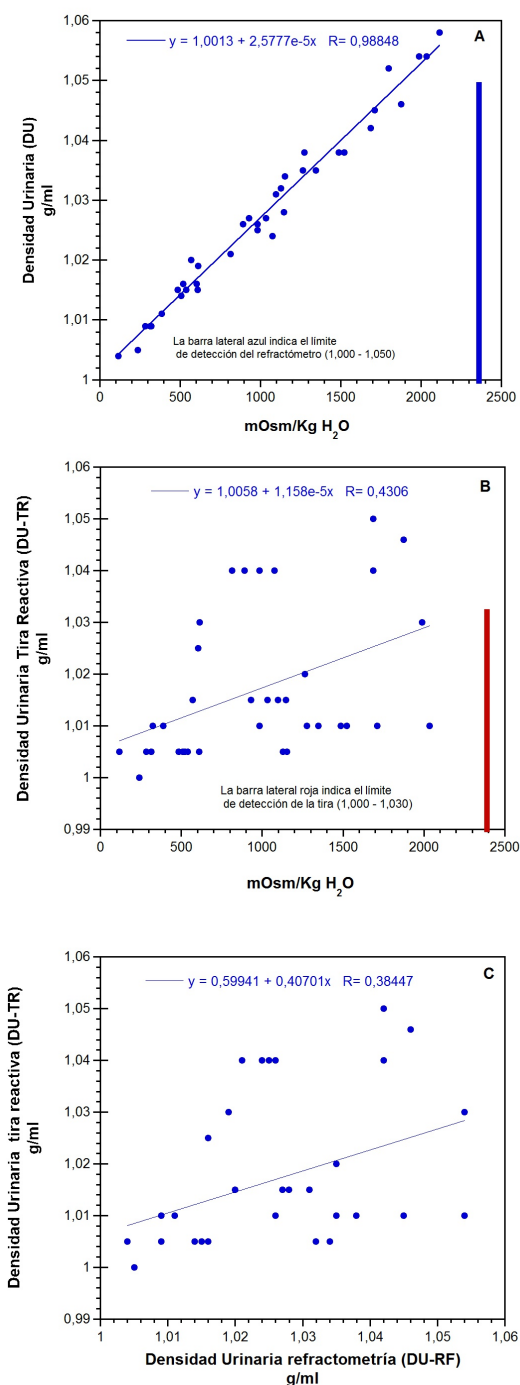
1- análisis con TR, 2- centrifugación, 3- análisis de la muestra por RF, si el valor obtenido es  $>1,050$  se diluye la muestra 1/2 con agua destilada y se corrige el resultado, 4- nueva determinación de la RF, realizando el cálculo correspondiente, 5- en caso de detectar glucosa o proteínas, determinación de las concentraciones de las mismas utilizando las técnicas analíticas correspondientes y realización de las correcciones respectivas a la DU determinada por RF. Por cada g/l de proteína urinaria, se sustraen 0,003 unidades a la DU medida (su impacto sobre la osmolalidad es de aproximadamente 3 mOsm/kg  $\text{H}_2\text{O}$ ), en cambio, para glucosa, por cada 10 g/l de glucosa la Osm se incrementa en 55 mOsm (180 g/l de glucosa equivalen a 1000 mOsm), por ello el factor de corrección es la sustracción de 0,004 unidades a la DU determinada (Pradella *et al.*, 1988).

Hemos sugerido realizar el análisis de orina con TR en primera instancia debido a que de esta manera podemos establecer qué orinas contienen glucosa o concentraciones elevadas de proteínas y así organizar el análisis fisicoquímico de las orinas en dos grupos diferentes: las normales, que son procesadas inmediatamente, y las presuntamente patológicas, que requieren determinación de la concentración de glucosa, proteínas, etc., por otros métodos analíticos.

## Agradecimientos

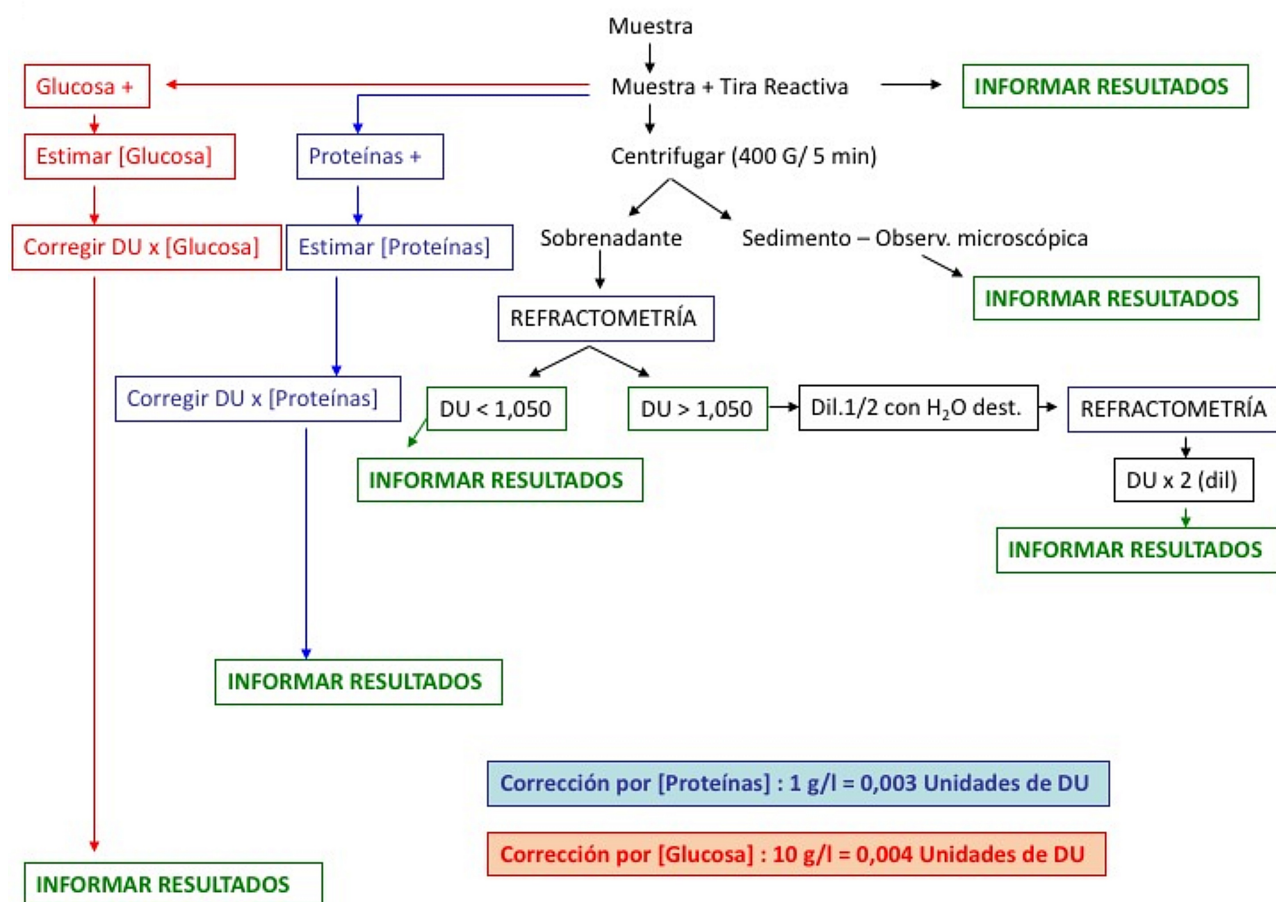
Agradecemos a Wiener Lab, por la generosa donación del kit Proti U/LCR. Los equipos utilizados en este trabajo fueron provistos por el subsidio del Servicio de Relaciones Internacionales y Partenariado Territorial de la Región Friuli-Venezia-Giulia de Italia para la

ejecución del proyecto "Creación del Centro Binacional (Argentina – Italia) de Investigación en Criobiología Clínica y Aplicada". Protocolo: n. 19096/PT.



**Figura 1.** A. Relación entre la densidad de la orina medida por refractometría (DU-RF) y la osmolalidad de la orina (mOsm/Kg  $\text{H}_2\text{O}$ ), n = 35 muestras. B. Relación entre la densidad de la orina medida por tiras reactivas (DU-TR) y la osmolalidad de la orina (mOsm/Kg  $\text{H}_2\text{O}$ ), n = 35 muestras. C. Relación entre la densidad de la orina analizada mediante refractometría (DU-RF) con la densidad de la orina determinada mediante tiras reactivas (DU-TR), n = 35 muestras.





**Figura 2.** Esquema propuesto para el análisis completo de orina en muestras de caninos.

## 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

Biggs HG, Cooper JM. 1961. Modified Folin methods for the measurement of urinary creatine and creatinine. *Clinical Chemistry* 7(6):655-64.

Chadha V, Garg U, Alon US. 2001. Measurement of urinary concentration: a critical appraisal of methodologies. *Pediatric Nephrology* 16(4):374-82.  
doi:10.1007/s004670000551

Dorner K, Campos R, Bornser S. 1984. Further evaluation of the SG test strip for estimation of

urinary osmolality. *Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry* 22(6):419-25.

Dossin O, Germain C, Braun J. 2003. Comparison of the techniques of evaluation of urine dilution/concentration in the dog. *Journal of Veterinary Medicine Series A Physiology Pathology Clinical Medicine* 50(6):322-5.  
doi: 10.1046/j.1439-0442.2003.00542.x

Pradella M, Dorizzi RM, Rigolin F. 1988. Relative density of urine: methods and clinical significance. *CRC Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 26(3):195-242.  
doi:10.3109/10408368809105890

Sink CA, Weinstein NM. Chapter 3: Routine Urinalysis: Physical properties. En: *Urine Practical Veterinary Urinalysis*. 2012. West Sussex, UK: Wiley-Blackwell. pp. 23-24.

Tdveten H. 2016. Urine protein total concentration in clinically normal dogs. *Veterinary Clinical Pathology* 45(3):395-6.  
doi: 10.1111/vcp.12379

Trumel C, Diquélou A, Lefebvre H, Braun JP. 2004. Inaccuracy of routine creatinine measurement in canine urine. *Veterinary Clinical Pathology* 33(3):128-32.  
[doi: 10.1111/j.1939-165X.2004.tb00361.x](https://doi.org/10.1111/j.1939-165X.2004.tb00361.x)

Watson ADJ. 1998. Urine specific gravity in practice. *Australian Veterinary Journal* 76(6):392-8.  
[doi: 10.1111/j.1751-0813.1998.tb12384.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-0813.1998.tb12384.x)

# Medio de cultivo líquido para el diagnóstico de paratuberculosis bovina. Aplicación y análisis comparativo con el medio de Herrold: resultados preliminares

## *Liquid culture medium for diagnosis of bovine paratuberculosis. Usefulness and comparative analysis with Herrold medium: preliminary results*

ROMERO M<sup>1,2\*</sup>, ALVARADO PINEDO M<sup>2</sup>, MOYANO R<sup>3,4</sup>, PERALTA L<sup>2</sup>, SOSA P<sup>2</sup>, SANTANGELO M<sup>3,4</sup>, TRAVERÍA G<sup>2</sup>

1. Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires (CICPBA). 2. Centro de Diagnóstico e Investigaciones Veterinarias, FCV, UNLP (CEDIVE, Chascomús). 3. Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). 4. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Instituto de Biotecnología, Castelar. Argentina

\* Correo electrónico de la autora de contacto: [mromero@fcv.unlp.edu.ar](mailto:mromero@fcv.unlp.edu.ar)

### Resumen

La paratuberculosis es una enfermedad crónica producida por un bacilo ácido-alcohol resistente (BAAR), el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). No existe tratamiento ni vacuna aprobada por SENASA para esta enfermedad, por lo que es imprescindible el diagnóstico de los animales positivos para controlar la enfermedad antes de que infecten a otros. Se probó la implementación de un medio de cultivo líquido para el diagnóstico de paratuberculosis en bovinos, modificado a partir del medio Middlebrook M7H9 caldo. Para probar la efectividad del medio se realizó la siembra pareada de muestras de materia fecal y tejidos animales en el medio de cultivo sólido de Herrold con micobactina (HEYM) y en el medio de cultivo líquido modificado a partir del M7H9 caldo. Además, se lograron comparar el tiempo de detección de colonias en el medio sólido con el de detección de BAAR formando grupos en el medio de cultivo líquido en estudio. Se corroboró que hay diferencias significativas entre el medio de cultivo líquido y el medio HEYM, tanto en el tiempo de detección como en la cantidad de muestras positivas detectadas, observando BAAR en el medio líquido o colonias bacterianas en el medio HEYM. Sobre la base de estos resultados se concluye que el medio líquido probado posee una mayor sensibilidad analítica y un tiempo de detección del crecimiento menor con respecto a los del medio HEYM.

### Palabras clave

Micobacterias, medio de cultivo líquido, Ziehl-Neelsen, micobactina

### Abstract

Paratuberculosis is a chronic disease caused by acid-fast bacilli (AFB) *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map). There is neither an effective treatment nor any vaccine approved by the sanitary authority (SENASA) in Argentina. Diagnosis and segregation of positive animals are essential for the control of the disease. For the diagnosis of cattle paratuberculosis, a modified Middlebrook M7H9 broth medium was developed. To test the effectiveness of the medium, fecal and tissue samples were cultured in Herrold with mycobactin and liquid culture media, and time to growth was compared by direct observation of colonies and microscopic grouped AFB observation, respectively. Significant differences were observed between liquid tested and Herrold media, both in time to grow and in the number of positive animals detected. Based on these results, it is concluded that liquid medium offers greater analytical sensitivity and faster detection than Herrold medium.

### Key words

*Mycobacterium*, liquid culture medium, Ziehl-Neelsen, mycobactin

Fecha de recepción: 01/12/2017

ANALECTA VET 2018; 38(1): 50-55

Fecha de aprobación: 16/03/2018

Impresa ISSN 03655 14-8 Electrónica ISSN 1514-2590

doi.org/10.24215/15142590e025

## Introducción

La paratuberculosis, causada por el *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* (Map), se caracteriza por provocar una ileocolitis granulomatosa, crónica y debilitante en los animales que la padecen. Es una enfermedad que tiene un gran impacto productivo y económico en el ámbito mundial y en nuestro país, principalmente en producciones lecheras (Morsella & Paolicci, 2008; Soto *et al.*, 2002). La particularidad de esta enfermedad es que no cuenta con tratamientos eficaces ni métodos profilácticos aprobados por el SENASA hasta el momento, debido a que podrían interferir con el diagnóstico de la tuberculosis. Por lo tanto, su control se basa en el diagnóstico de los animales infectados y su segregación. El diagnóstico puede realizarse determinando la magnitud de la respuesta inmune celular o humoral y, de forma directa, mediante estudios microbiológicos. Entre las posibilidades diagnósticas, el cultivo bacteriológico es considerado la técnica de oro, aun con las dificultades que presentan las micobacterias de crecimiento lento. El medio de cultivo utilizado comúnmente es el de Herrold con yema de huevo y el agregado de micobactina (HEYM), ya que cumple con las exigencias del Map para su crecimiento *in vitro* (Merkal & Curran, 1974). Este medio de cultivo presenta una especificidad del 99 % y una sensibilidad cercana al 50 %. La decontaminación previa con cloruro de hexadecil-piridinio (HPC) elimina la mayoría de las micobacterias no patógenas, con escasos efectos dañinos sobre el Map (Collins *et al.*, 1996; Whipple *et al.*, 1991). Otro inconveniente que se suma a la baja sensibilidad del medio HEYM es que la aparición de colonias requiere entre dos y cuatro meses de incubación, y solo luego de seis meses es posible asegurar un resultado negativo (Stabel *et al.*, 1997; Whipple *et al.*, 1991). Los tiempos de incubación prolongados limitan la implementación del cultivo bacteriológico, incluso cuando se lo usa con fines de investigación. Debido a todas las dificultades que presenta el cultivo micobacteriano, en un intento por abreviar el lapso hasta la constatación del crecimiento bacteriano y por mejorar la sensibilidad del método, se han probado diversos medios de cultivo, habiéndose obtenido mejores resultados con el uso de medios de cultivo líquidos (Pozzato *et al.*, 2011; Stabel *et al.*, 1997; Whittington, 2009). Así se han logrado incluso tipificar las cepas aisladas a partir de ellos (Motiwala *et al.*, 2005). Sin embargo, estos medios comerciales no están disponibles en el país y su adquisición resulta actualmente difícil y de alto costo.

En este trabajo se probó la preparación e implementación de un medio de cultivo líquido modificado a partir del medio líquido M7H9C (Whittington *et al.*, 2013). Se comparó su eficacia, con respecto al tiempo hasta la constatación del

crecimiento bacteriano y la sensibilidad analítica, en comparación con el medio sólido HEYM.

## Descripción metodológica

### Medios de cultivo

-Medio de Herrold con yema de huevo y micobactina (HEYM):

Los componentes de la preparación se detallan en la tabla 1. Se fraccionó en botellas de cultivo celular de 50 ml colocando 10 ml de medio en cada una de ellas.

-Medio de cultivo líquido:

Se preparó según los componentes detallados en la tabla 1. Se basó en el medio de cultivo descrito por Whittington *et al.* (2013) al que se le agregó agar al 0,185 % para que se mantuviera el estado líquido del medio, pero colaborara con la homogeneidad de la yema de huevo en la columna. Además, se agregó ácido nalidíxico y nistatina para evitar la contaminación. Este medio se fraccionó en tubos de vidrio de 30 ml conteniendo 10 ml de medio cada uno.

Se procesaron 47 muestras provenientes de bovinos con y sin signos de la enfermedad (Tabla 2). Las muestras de materia fecal se recolectaron directamente del recto de los animales. También se procesaron muestras de tres órganos (íleon, yeyuno y linfonódulo) obtenidas durante la necropsia de animales con signos compatibles con la enfermedad. Las necropsias fueron realizadas por nuestro grupo de trabajo en el establecimiento.

### Procesamiento de las muestras

Se realizó la decontaminación de acuerdo con el método de doble incubación (Stabel, 1997) colocando 2 g de muestra (materia fecal o tejido, según el caso) en 30 ml de agua destilada estéril. Estas muestras luego se agitaron y dejaron reposar durante 30 minutos. Posteriormente se colocaron 5 ml del sobrenadante en 25 ml de solución de HPC y esta solución se mantuvo en estufa a 37 °C durante 24 h. Se centrifugó a temperatura ambiente durante 30 minutos a 1000 rpm, se descartó el sobrenadante, se agregó 1 ml de mezcla antibiótica y se conservó 24 h a 37 °C. Las muestras así procesadas se sembraron, en forma pareada, colocando 800 µl en las botellas con HEYM y 100 µl (Whittington *et al.*, 2013) en los tubos con el medio de cultivo líquido en estudio. Ambos fueron incubados en estufa a 37 °C.

### Seguimiento de las muestras en ambos medios de cultivo y criterios de positividad

Se observaron ambos medios de cultivo semanalmente. En el HEYM se consideraron positivas aquellas muestras que evidenciaron al



menos una colonia blanquecina, lisa, brillante y visible macroscópicamente (Fig. 1). La observación del medio de cultivo líquido se realizó microscópicamente, utilizando la coloración de Ziehl-Neelsen para poner de manifiesto bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR). Se consideraron positivas aquellas muestras que mostraron BAAR agrupados y morfológicamente compatibles con Map (Fig. 2). Las coloraciones se realizaron semanalmente y se inspeccionaron 50 campos de observación, como mínimo, cada semana.

Ingredientes	A	B	C
base medio M7H9C	3,1 g	3,1 g	
albúmina bovina	1,34 g	1,6 g	
dextrosa	0,52 g	0,64 g	
catalasa	0,8 mg	0,96 mg	
Bacto Casitone®	666 mg	680 mg	
cloruro de sodio	0,22 g	0,22 g	15,3 g
yema de huevo	167 ml	170 ml	120 ml
Micobactina J®	0,8 mg	1 mg	2 mg
Panta plus®	30 ml	30 ml	
ácido nalidíxico		200 mg	100 mg
nistatina		800 mg	400 mg
vancomicina			100 mg
agar		1,8 g	15,3 g
peptona de carne			9 g
piruvato de sodio			4,1 g
extracto de carne			2,7 g
glicerol			34 ml
verde de malaquita al 2 %			5,2 ml
agua tridestilada	800 ml	770 ml	840,9 ml

**Tabla 1. Composición (por litro) de cada medio.** A. Medio descripto por Whittington *et al.* (2013). B. Medio líquido experimental del trabajo. C. Medio sólido HEYM.

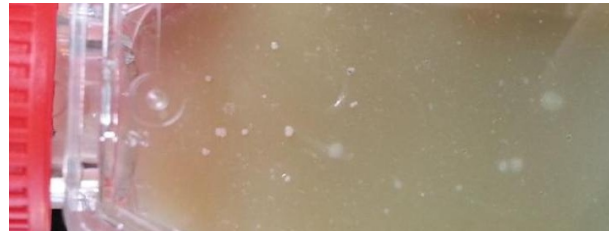
### Confirmación de resultados

Para el caso del medio de cultivo líquido se procedió a confirmar la presencia de Map en las muestras positivas mediante la técnica de análisis molecular de reacción en cadena de la polimerasa (PCR). El segmento de inserción que se buscó amplificar fue IS900 (Collins *et al.*, 1993). Las muestras positivas en el HEYM fueron coloreadas con la técnica de Ziehl-Neelsen y procesadas mediante PCR IS900.

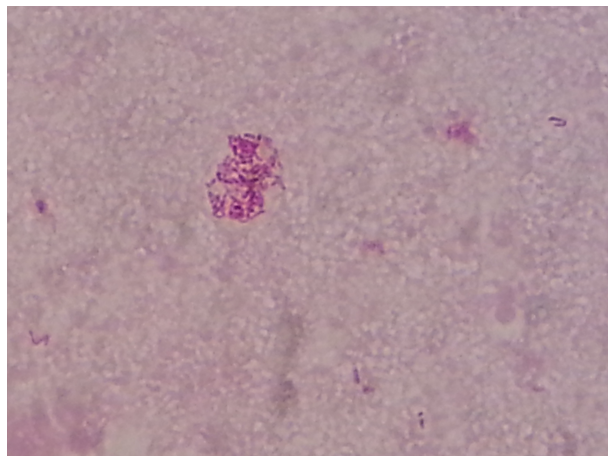
### Recuperación y extracción de ADN para PCR IS900

Debido a la presencia de inhibidores del crecimiento en el huevo, componente del medio de cultivo líquido en estudio, se debió realizar un repique en medio Löwenstein-Jensen (con micobactina), donde se observó el desarrollo de colonias entre los 5 y los 10 días. A partir de este medio se tomó una colonia y se diluyó en 200 µl de agua ultra pura para PCR, sometiéndola a 3 ciclos de hervido/congelación (shock térmico) para la extracción de ADN. Las muestras fueron procesadas mediante PCR IS900 siguiendo el protocolo de Collins *et al.* (1993). Los cebadores utilizados fueron: hacia adelante (F) GATCGGAAC-GTCGGCTGGTCAGG y reverso (R) GATCGCCTT-GCTCATCGCTGCCG, utilizando DNA Polymerase

BIOLINE® (Londres, Reino Unido) y termociclador Evo MPI M-02® (La Plata, Argentina). Se obtuvo un producto de 218 pb.



**Figura 1.** Colonias típicas de Map, blanquecinas, lisas, brillantes. Medio HEYM, 70 días posincubación (muestra N° 43).



**Figura 2.** Bacilos ácido-alcohol resistentes compatibles con Map, medio líquido, 17 días posincubación. Coloración de Ziehl-Neelsen (muestra N° 43).

### Análisis de datos

Se analizó los resultados en el medio de cultivo líquido en estudio respecto del HEYM mediante la prueba de chi cuadrado con corrección de Yates, y se obtuvo un valor de  $p = 0,002$  (intervalo de confianza -IC- 95 %). También se utilizó la prueba de T de Student para analizar las diferencias en cuanto al tiempo de detección de crecimiento en ambos medios de cultivo, mediante la cual se encontraron diferencias con valor de  $p = 0,0000000005$  (IC 95 %). Tanto el chi cuadrado como la prueba de T fueron realizadas mediante programa Excel, Windows 8.1. Para las mismas muestras se puso en evidencia una mayor cantidad de casos positivos en el medio líquido que en el medio sólido. Las muestras positivas en el medio líquido fueron 34 y, en el medio HEYM, 22 (diferencias estadísticas con un valor de  $p = 0,002$ , IC 95 %). Mediante la técnica de PCR IS900 se confirmaron 25 de las 34 muestras positivas en el medio líquido, 8 de las cuales habían resultado negativas en el medio HEYM.

N°	Tipo de muestra	Año*	Categoría	Raza	Signos clínicos	Zona de procedencia	Medio líquido		Medio de Herrold	
							Rdo	Tiempo (días)	Rdo	Tiempo (días)
1	MF	2016	Vaca	AA	Si	Magdalena, Bavio	POSITIVO	8	POSITIVO	60
7	MF	2016	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	19	POSITIVO	111
13	MF	2016	Vaca	AA	Si	Azul	POSITIVO	12	POSITIVO	50
14	MF	2016	Vaca	AA	Si	Azul	POSITIVO	19	POSITIVO	70
15	MF	2016	Vaca	AA	Si	Azul	POSITIVO	8	POSITIVO	67
17	MF	2016	Vaca	AA	Si	Magdalena, Bavio	POSITIVO	4	POSITIVO	70
19	MF	2015	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	17	POSITIVO	58
32	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	POSITIVO	5	POSITIVO	40
33	MF	2016	Vaca	AA	Si	Gral. Belgrano	POSITIVO	5	POSITIVO	32
34	MF	2016	Vaca	AA	Si	Chascomús	POSITIVO	6	POSITIVO	58
35	MF	2016	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	19	POSITIVO	49
36	MF	2016	Vaquillona	AA	Si	La Plata	POSITIVO	12	POSITIVO	49
37	MF	2016	Vaca	AA	Si	Brandsen	POSITIVO	7	POSITIVO	106
38	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	POSITIVO	14	POSITIVO	72
39	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	POSITIVO	13	POSITIVO	58
40	MF	2015	Vaca	AA	Si	Chascomús	POSITIVO	8	POSITIVO	56
41	MF	2015	Vaca	AA	Si	Chascomús	POSITIVO	8	POSITIVO	58
43	Yeyuno	2015	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	17	POSITIVO	52
44	Íleon	2015	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	17	POSITIVO	122
45	MF	2016	Vaca	AA	Si	Azul	POSITIVO	12	POSITIVO	87
46	MF	2016	Vaca	AA	Si	Azul	POSITIVO	8	POSITIVO	50
47	MF	2016	Vaca	AA	Si	Gral. Belgrano	POSITIVO	5	POSITIVO	60
2	MF	2016	Vaquillona	AA	No	Gral. Belgrano	POSITIVO	35	NEGATIVO	
3	MF	2016	Vaquillona	AA	No	Gral. Belgrano	POSITIVO	49	NEGATIVO	
4	MF	2016	Vaquillona	AA	No	Gral. Belgrano	POSITIVO	5	NEGATIVO	
5	MF	2016	Vaca	AA	Si	Gral. Belgrano	POSITIVO	5	NEGATIVO	
6	MF	2016	Vaca	AA	Si	Gral. Belgrano	POSITIVO	5	NEGATIVO	
8	MF	2016	Vaca	AA	No	Vieytes	POSITIVO	14	NEGATIVO	
9	MF	2015	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	17	NEGATIVO	
10	Linfonodo	2015	Vaca	AA	Si	Vieytes	POSITIVO	50	NEGATIVO	
11	MF	2016	Vaca	AA	Si	Chascomús	POSITIVO	20	NEGATIVO	
12	MF	2016	Vaca	AA	Si	Chascomús	POSITIVO	13	NEGATIVO	
16	MF	2016	Vaca	AA	Si	Azul	POSITIVO	6	NEGATIVO	
18	MF	2016	Vaca	AA	Si	La Plata	POSITIVO	12	NEGATIVO	
42	MF	2015	Vaca	AA	Si	Chascomús	NEGATIVO		POSITIVO	69
20	MF	2015	Vaca	AA	Si	Chascomús	NEGATIVO		NEGATIVO	
21	MF	2016	Vaca	AA	Si	Vieytes	NEGATIVO		NEGATIVO	
22	MF	2016	Vaca	AA	Si	Luján	NEGATIVO		NEGATIVO	
23	MF	2016	Vaca	AA	Si	Gral. Belgrano	NEGATIVO		NEGATIVO	
24	MF	2016	Vaca	AA	Si	Gral. Belgrano	NEGATIVO		NEGATIVO	
25	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	NEGATIVO		NEGATIVO	
26	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	NEGATIVO		NEGATIVO	
27	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	NEGATIVO		NEGATIVO	
28	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	NEGATIVO		NEGATIVO	
29	MF	2016	Vaca	HA	Si	Tandil	NEGATIVO		NEGATIVO	
30	MF	2016	Vaca	AA	Si	Chascomús	NEGATIVO		NEGATIVO	
31	MF	2016	Vaca	AA	Si	Chascomús	NEGATIVO		NEGATIVO	

**Tabla 2.** Origen y características de las muestras, resultados y tiempos de detección en medio de cultivo líquido y medio de cultivo de Herrold. MF: Materia fecal. Rdo: Resultado. AA: Aberdeen Angus. HA: Holando Argentino. \*Año en el que se tomó y procesó la muestra.

Las 9 muestras restantes se contaminaron, dieron resultado negativo y no pudieron ser recuperadas para un nuevo procesamiento mediante PCR. Sin embargo, todas ellas mostraron características morfológicas típicas de Map con la coloración de Ziehl-Neelsen, incluyendo el agrupamiento clásico de BAAR. Cinco de ellas, además, resultaron positivas en el medio HEYM, con el desarrollo de colonias de morfología clásica. A su vez, las muestras positivas en el medio HEYM fueron corroboradas en su totalidad mediante la coloración de Ziehl-Neelsen y con la amplificación del segmento IS900, aunque en dos de los casos (muestras 37 y 44) la banda resultante en el gel de corrida electroforética fue débil respecto de las demás y podrían considerarse negativas.

En cuanto al tiempo de detección de crecimiento, el promedio para el medio HEYM fue de 65 días, mientras que para el medio de cultivo líquido fue de 11 días (Tabla 2). Estos datos arrojaron un grado de significancia de  $p=0,00000000005$  (IC 95 %) mediante la prueba de T, mostrando que existen diferencias significativas también para esta variable.

## Discusión y conclusiones

Con el uso del medio líquido modificado a partir del medio M7H9C (Whittington *et al.*, 2013) fue posible mejorar notablemente, tanto la sensibilidad analítica del cultivo como así también el tiempo de incubación, marcadamente menor que el requerido con el medio HEYM, utilizado de rutina. Estos resultados son coincidentes con los de trabajos previos que demuestran la mayor sensibilidad de los medios de cultivo líquidos y que también describen un desarrollo en menor tiempo (Pozzato *et al.*, 2011; Stabel *et al.*, 1997; Shin *et al.*, 2007; Whittington, 2009, 2013). La observación de crecimiento diagnóstico de Map en el cultivo en un promedio de 11 días fue algo destacable, teniendo en consideración que se trata de una micobacteria de crecimiento lento. Sin embargo, Shin *et al.* (2007) describen los tiempos de detección de crecimiento y consignan que, en los sistemas BACTEC 460 y MGIT, muestras con 105 UFC/ml resultan positivas 7 u 8 días posincubación. Teniendo en cuenta este dato y considerando que la mayor parte de las muestras de este trabajo provenían de animales con signos clínicos (y que, por lo tanto, se encuentran eliminando micobacterias en grandes cantidades), es posible afirmar que los resultados del trabajo aquí presentado se encuentran dentro de lo esperable.

En cuanto a la mayor sensibilidad analítica que mostró el medio de cultivo líquido respecto del sólido, cabe aclarar que la utilización de la presencia de BAAR como criterio de positividad posibilita la inclusión errónea de otros BAAR (diferentes de Map), alterando la especificidad del cultivo. Para determinar la presencia de Map se utilizó la técnica de PCR IS900, que nos permitió

corroborar los resultados de gran parte de las muestras y confirmar alrededor del 66 % de las muestras que resultaron positivas en el medio líquido, pero no en el HEYM, utilizado de rutina como técnica de oro. Si bien es necesario aumentar la cantidad de muestras procesadas para robustecer el soporte estadístico, los resultados obtenidos son prometedores, y permitirían dar respuesta a la necesidad de mejorar las características del cultivo micobacteriano para poder brindar un mejor servicio de diagnóstico. Una mayor cantidad de muestras procesadas eventualmente permitirán decidir si es factible proponer al cultivo en este medio líquido como una alternativa superadora del realizado en medio HEYM, con respecto al tiempo de incubación y a la sensibilidad, sin disminuir su especificidad.

## Agradecimientos

Este trabajo fue financiado mediante beca de la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires.

## Conflicto de intereses

No existe conflicto de intereses que declarar.

## Bibliografía

- Andrews AH. 2004. Bovine medicine: diseases and husbandry of cattle. 2° Ed. Reimp. Reino Unido, Blackwell Publishing Company.
- Collins DM, Stephens DM, de Lisle GW. 1993. Comparison of polymerase chain reaction tests and faecal culture for detecting *Mycobacterium paratuberculosis* in bovine faeces. *Veterinary Microbiology*. 36(3-4):288-99.
- Collins, MT. 1996. Diagnosis of paratuberculosis. *The Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice*. 12(2):357-71.
- Merkal RS, Curran BJ. 1974. Growth and metabolic characteristics of *Mycobacterium paratuberculosis*. *Applied Microbiology*. 28:276-9.
- Morsella C, Paolicchi F. 2008. Aplicación de métodos de diagnóstico y control de paratuberculosis en Argentina. XXI Congreso Panamericano de Ciencias Veterinarias. Guadalajara, México, pp. 37-43.
- Motiwala AS, Strother M, Theus NE, Stich RW, Byrum B, Shulaw WP, Kapur V, Sreevatsan S. 2005. Rapid detection and typing of strains of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis*

from broth cultures. *Journal of Clinical Microbiology*. 43(5):2111-7.  
[doi: 10.1128/JCM.43.5.2111-2117.2005](https://doi.org/10.1128/JCM.43.5.2111-2117.2005)

Pozzato N, Gwozdz J, Gastaldelli M, Capello K, Ben CD, Stefani E. 2011. Evaluation of a rapid and inexpensive liquid culture system for the detection of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* in bovine faeces. *Journal of Microbiological Methods*. 84(3):413-7.  
[doi: 10.1016/j.mimet.2011.01.019](https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.01.019)

Shin SJ, Han JH, Manning EJ, Collins MT. 2007. Rapid and reliable method for quantification of *Mycobacterium paratuberculosis* by use of the BACTEC MGIT 960 system. *Journal of Clinical Microbiology*. 45(6):1941-8.  
[doi:10.1128/JCM.02616-06](https://doi.org/10.1128/JCM.02616-06)

Soto JP, Kruze J, Leiva S. 2002. Aislamiento de *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* de fecas en rebaños lecheros infectados mediante el método de Cornell modificado. *Archivos de Medicina Veterinaria*. 34(2):275-82.  
[doi: 10.4067/S0301-732X002000200013](https://doi.org/10.4067/S0301-732X002000200013)

Stabel JR. 1997. An improved method for cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal samples and comparison to three

other methods. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 9(4) 375-80.

Whipple DL, Callihan DR, Jarnagin JL. 1991. Cultivation of *Mycobacterium paratuberculosis* from bovine fecal specimens and a suggested standardized procedure. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*. 3(4):368-73.  
[doi: 10.1177/104063879100300424](https://doi.org/10.1177/104063879100300424)

Whittington RJ. 2009. Factors affecting isolation and identification of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* from fecal and tissue samples in a liquid culture system. *Journal of Clinical Microbiology*. 47(3):614-22.  
[doi: 10.1128/JCM.01986-08](https://doi.org/10.1128/JCM.01986-08)

Whittington RJ, Whittington AM, Waldron A, Begg DJ, De Silva K, Purdie AC, Plain KM. 2013. Development and validation of a liquid medium (M7H9C) for routine culture of *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* to replace modified Bactec 12B medium. *Journal of Clinical Microbiology*. 51(12):3993-4000.  
[doi: 10.1128/JCM.01373-13](https://doi.org/10.1128/JCM.01373-13)



# INSTRUCCIONES PARA 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 Consejo 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
- 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 (<http://www.cem.es/sites/default/files/siu8edes.pdf>). Las abreviaturas deberán ser aclaradas la primera vez que el término se mencione, pero no será necesaria su utilización si este 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 formato de hoja 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: 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, esta página podrá sobrepasar la extensión de la hoja A4.

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

- **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 puntos. 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 mediante 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 los 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/la autor/a de contacto: dd@mail.com

Título abreviado

Datos del/la autor/a 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 Resumen y, por debajo, dejando un espacio, se incluirán 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 en el título. Se aceptarán entre 3 y 5 palabras separadas mediante comas.

### 1.2.3. Páginas sucesivas

- **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).

- **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.

- **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

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.

- **Bibliografía.** ANALECTA VETERINARIA 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 (Deeg *et al.*, 2002).

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

Los autores también podrían haber elegido expresar:

“Según Deeg *et 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 (Fadok *et 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).

Estas mismas letras deberán ser consignadas, posteriormente, en la lista de referencias.

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 las referencias

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), seguido de dos puntos y las páginas del artículo separadas por un guión, 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 (*Axis 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 *Epub ahead 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 libros

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, Médica Panamericana, 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



---

## Página web/Website

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/NFIeWT> [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].

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.olympusmicro.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 a través de su correo electrónico.

1.2.4. Formando parte del documento principal, pero en hoja aparte, 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 que para el resto del trabajo presentado.

### 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 constituyan 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 (en formato de hoja A4, excluyendo la primera página y la página de resúmenes) ni las 3 figuras.

- **Trabajos de revisión.** Son revisiones narrativas orientadas 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. Para establecer el formato de los resúmenes de presentaciones en reuniones científicas, se invita a los organizadores de tales reuniones a ponerse en contacto para conocer los aspectos formales requeridos, a través del correo electrónico ([analecta@fcv.unlp.edu.ar](mailto:analecta@fcv.unlp.edu.ar)).

## 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** (líneas horizontales inicial y final de tabla y línea de encabezados de columna), 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. El autor de contacto es responsable por esa situación.

El envío se realizará en línea:

(<https://revistas.unlp.edu.ar/analecta/index>)

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 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 Editorial verificará que se cumplan las siguientes premisas:

- calidad de contenido para ser remitido a los evaluadores
- estructura gramatical del idioma del trabajo
- 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. 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 formalidades 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] (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.