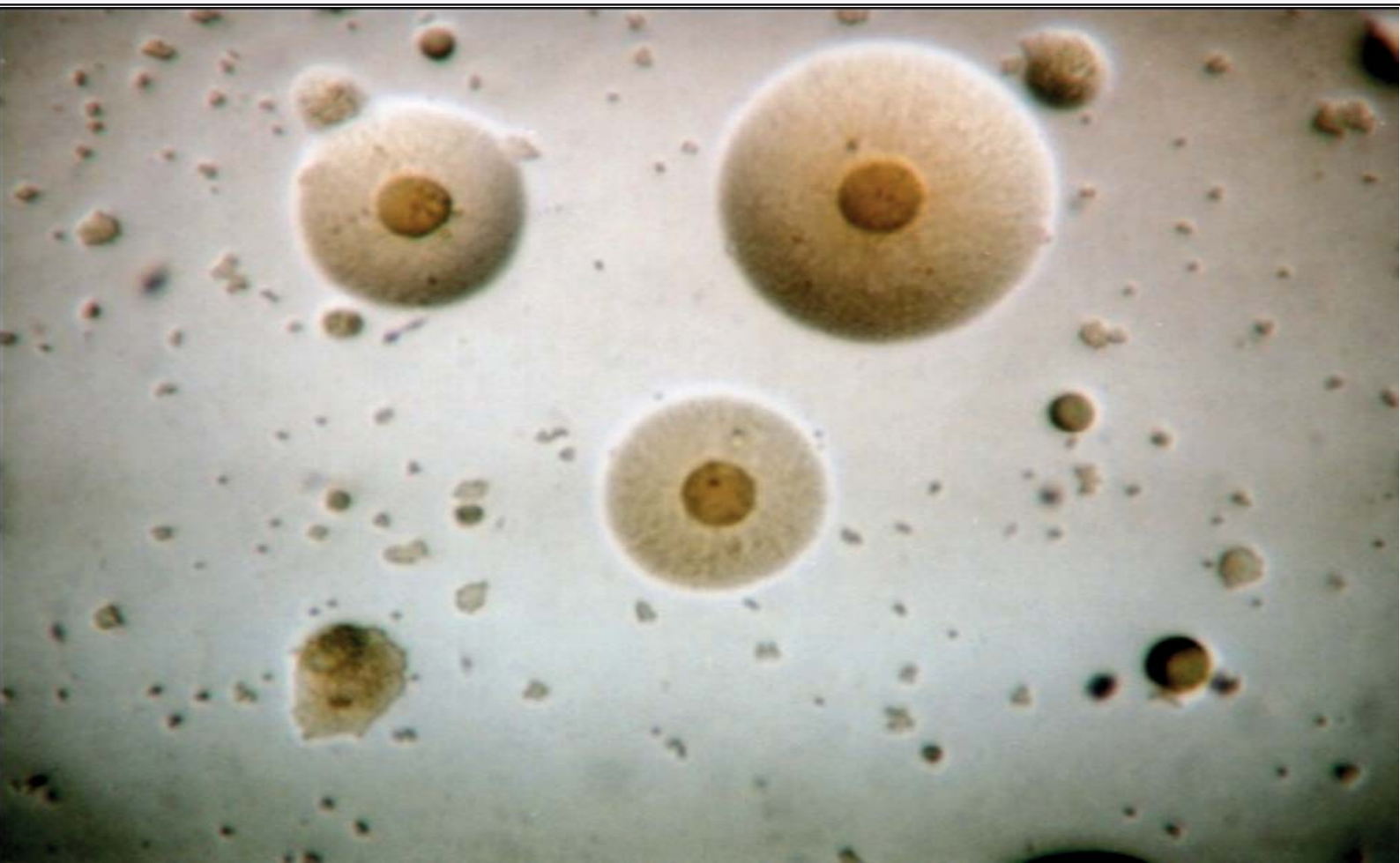


Revista de la Facultad de Ciencias Veterinarias

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

ANALECTA VETERINARIA



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

Volumen 35 nº 2 año 2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

Autoridades

Decano

Dr. Claudio Barbeito

Vicedecano

Dr. Miguel Petruccelli

Secretaria de Asuntos Académicos

Dra. Vanina Cambiaggi

Secretario de Posgrado

Dr. Luzbel de la Sota

Secretario de Ciencia y Técnica

Dr. Enrique Portiansky

Secretaria de Gestión de Calidad

Dra. Cecilia di Lorenzo

Secretaria de Extensión

Méd. Vet. Elena del Barrio

Secretaria de Asuntos Estudiantiles

Méd. Vet. Verano Gómez

Prosecretario de relaciones Institucionales

Ms. Sci. Julio Copes

Coordinador Académico de Campos Experimentales

Méd. Vet. Hugo Marcantoni

ANALECTA VETERINARIA

Editor Responsable

Dr. Claudio Barbeito

Editor Asociado

Dr. Enrique Portiansky

Director

Dr. Nestor Stanchi

Coordinador Editorial

Dr. Julio Idiart

Secretaria de Redacción

Dra. Mónica Diessler

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

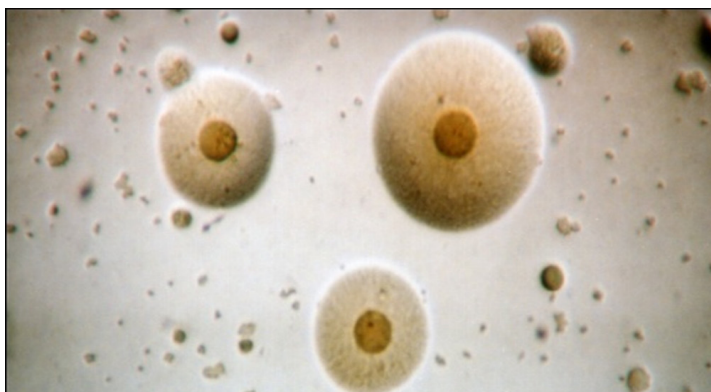


Foto de tapa: Colonias de *Mycoplasma synoviae* cepa 1853. Uriate y col.

La revista ANALECTA VETERINARIA es una publicación semestral de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina. Está destinada a la difusión de trabajos científicos en el campo de las Ciencias Veterinarias, generados en esta Unidad Académica y en otras instituciones.

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

ANALECTA

Pronunciación: «a-n&l-'ek-t&

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

ISSN 0365514-8 Versión Impresa

ISSN 1514-2590 Versión Electrónica

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

ISSN 1666295-4 Versión CD-ROM

Registro Propiedad Intelectual 77383

Dirección postal: 60 y 118 (B1900AVW)

La Plata, Buenos Aires, ARGENTINA

Comité Editorial

Dra. María Barrandeguy
Instituto de Virología, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar, Argentina

Dr. Carlos Campero
Ex Investigador del INTA-Balcarce, Académico Correspondiente, Argentina

Dr. Rodolfo Cantet
Mejoramiento Genético Animal, Departamento de Producción Animal, Universidad de Buenos Aires, Argentina

Dra. Cecilia Furnus
Instituto de Genética Veterinaria "Ing. Fernando N Dulout", Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Dr. Mauricio Giuliudori
Fisiología y Patología Médica, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Dr. Carlos Lanusse
Fisiología y Farmacología Veterinaria, Depto. de Fisiopatología, Universidad Nacional del Centro de la Provincia de Buenos Aires, 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. Martí Pumarola i Batle
Departamento de Medicina y Cirugía Animal, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Autónoma de Barcelona, España

Dr. Francisco Reynaldi
Micolgía Médica e Industrial, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Revisor del idioma inglés

Dr. Pablo Martino
Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires

Evaluadores de trabajos de ANALECTA VETERINARIA

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

Todos los trabajos publicados en ANALECTA VETERINARIA son sometidos a revisores externos

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

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

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

Impreso en papel libre de ácido Printed in acid-free paper
Impreso en Argentina Printed in Argentina

Diseño
Nestor Oscar Stanchi



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

Costa E.F. y col. Alteraciones en la diferenciación y proliferación celular cutánea en bovinos, inducidas por Hipervitaminosis D de origen vegetal. *Analecta vet (VE)* 1998; 18,1/2: 7-13 (7 pantallas). Recuperable de www.fcv.unlp.edu.ar

ANALECTA VETERINARIA está indizada en el Índice Latinoamericano de Revistas Científicas LATINDEX (www.latindex.unam.mx), Ulrich's International Periodicals Directory (www.ulrichsweb.com) Zoological Records (www.biosis.org.uk/products_services/zrss.html) BIOSIS (<http://www.biosis.org>) Infocyt <http://www.redhucyt.oas.org/infocyt/> Directory of Open Access Journals <http://www.doaj.org/>

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

Queda prohibida la reproducción total o parcial por cualquier metodología del material impreso en esta revista sin el consentimiento expreso del Editor. Está autorizada la reproducción con fines académicos o docentes mencionando la fuente. El uso de nombres comerciales está destinado únicamente para la identificación y no implica el respaldo directo o indirecto de los Ministerios de la Nación Argentina ni de los países respectivos de donde provengan los trabajos. Tampoco se garantizan ni respaldan los productos promocionados en los avisos de publicidad.

Acceso Electrónico a ANALECTA VETERINARIA

Si tiene acceso a INTERNET, puede recuperar la revista electrónicamente y en forma gratuita accediendo a la página en la Web

www.fcv.unlp.edu.ar/analecta/analecta.html

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

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

ANALECTA VETERINARIA Vol 35 n° 1, 2015

Artículos de Investigación/Research articles

Factores de virulencia de cepas de *Enterococcus* aisladas de aves silvestres y de corral en la Patagonia.

Virulence Factors of Enterococcus Strains Isolated from Wild Birds and Poultry in Patagonia. Ledesma P, Parada RB, Vallejo M, Marguet ER. 5-12

Evaluación de un producto bactericida aplicado por micronebulización.

Evaluation of a Bactericidal Product Applied by Micronebulization. Linares LH, Guirin G, Stambullian J, Brusa V, de la Torre JH, Ortega EE, Copes J, Leotta GA. 13-16

Congelación de semen porcino: resultados y avances en la técnica.

Boar Semen Cryopreservation: Results and Advances in the Technique. Williams S, Fernández V, Gavazza M, Marmunti M, Zeinsteger P, Prenna G. 17-25

Revisiones/Reviews

Diagnóstico de leptospirosis mediante técnicas moleculares: ventajas y limitaciones en Medicina Veterinaria.

Diagnosis of leptospirosis by molecular techniques: advantages and limitations in veterinary medicine. Martin PL, Arauz MS, Stanchi NO. 26-38

Descripciones de casos/Case Repots

La tomografía axial computarizada como herramienta para el diagnóstico y la planificación quirúrgica de la compresión medular.

Computed Tomography as a Tool for Diagnosis and Surgical Planning of Spinal Cord Compression. Delgado Stagnares JJ, Portiansky EL, Sánchez HL. 39-44

ANALECTA VETERINARIA Vol 35 n° 2, 2015

Artículos de Investigación/Research articles

Producción de la glicoproteína G del virus de la rabia en la levadura *Pichia pastoris*, para su uso en medicina veterinaria.

Production of Rabies Virus Glycoprotein G in *Pichia pastoris* Yeast for Its Use in Veterinary Medicine.

Picotto LD, Sguazza GH, Tizzano MA, Cavalitto SF, Pecoraro MR.

5-11

Revisiones/Reviews

Metapneumovirus aviar: revisión sobre aspectos etiológicos, clínicos, anatomopatológicos y epidemiológicos.

Avian Metapneumovirus: Review of Etiological, Clinical, Anatomopathological and Epidemiological Aspects.

Arias MN, Machuca MA, Petruccelli MA.

12-20

Comunicaciones cortas/Short communications

Chicken erythrocyte Invasion Capability of a *Mycoplasma synoviae* Strain Isolated in Argentina.

Capacidad de invasión de los eritrocitos de pollo de una cepa de *Mycoplasma synoviae* aislada en Argentina.

Uriarte J, Cerdá R, Stanchi N.

21-24

Descripciones de casos/Case reports

Poliartritis asociada a hepatozoonosis canina: descripción de un caso.

Polyarthritis Associated to Canine Hepatozoonosis: Case Report.

Iveli S, Casas L, Machuca M, Eiras D, del Amo A.

25-29

Informe técnico/Technical report

Análisis automatizado de neuronas de la médula espinal mediante la utilización de tres programas de análisis de imágenes.

Automatic Spinal Cord Neuronal Analysis Using Three Different Image Analysis Software Packages.

Portiansky EL.

30-34

Producción de la glicoproteína G del virus de la rabia en la levadura *Pichia pastoris*, para su uso en medicina veterinaria

Production of Rabies Virus Glycoprotein G in *Pichia Pastoris* Yeast for Its Use in Veterinary Medicine

Picotto LD^{1*}, Sguazza GH², Tizzano MA², Cavalitto SF^{1,3}, Pecoraro MR²

¹Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

²Cátedra de Virología, Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias.

³Área Biotecnología, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata.

*Autor correspondiente. Correo electrónico del autor: lpicotto@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: El gen de la glicoproteína G de la cepa CVS-51 del virus de rabia fue clonado, secuenciado y expresado en la levadura *Pichia pastoris* como proteína de secreción. La antigenicidad de esta proteína recombinante fue analizada preliminarmente mediante Western blot. La glicoproteína recombinante mostró reaccionar de la misma manera que la glicoproteína nativa cuando se la enfrentó a anticuerpos específicos. Los datos indican que la glicoproteína recombinante puede ser expresada y aislada de manera sencilla y podría ser usada como fuente segura de antígeno en la producción de sistemas aplicados al diagnóstico y de una vacuna a subunidades para la prevención de la enfermedad.

Palabras clave: Virus de la rabia, glicoproteína G, *Pichia pastoris*.

Abstract: The Glycoprotein (G) gene of rabies virus CVS-51 strain was cloned, sequenced and expressed in *Pichia pastoris* yeast as a secreted protein. The antigenicity of this recombinant protein was preliminarily examined by Western blot. Like native glycoprotein, the recombinant glycoprotein was found reactive when challenged against specific antibodies. The data indicate that the recombinant protein can be expressed and isolated straightforwardly and may be useful as a safe source in the production of diagnostic kits and subunit vaccines to prevent the disease.

Keywords: Rabies virus, Glycoprotein, *Pichia pastoris*.

Introducción

La rabia es una enfermedad viral que causa una forma letal de encefalomielitis en seres humanos y animales susceptibles al virus. El número anual de muertes humanas en todo el mundo por rabia se estima en 59.000 (Hampson *et al* 2015). La mayoría de ellas ocurre en países subdesarrollados o en desarrollo, donde la rabia canina es enzoótica. La principal forma de transmisión es mediante mordedura de un perro rabioso (Meslin *et al* 1994). La existencia de grandes reservorios de virus de la rabia en perros callejeros y muchas especies de animales salvajes representa un grave problema para los seres humanos y animales domésticos (Martínez 2000). El control de la rabia canina se puede lograr a través de programas de vacunación masiva de los animales y de la eliminación de perros callejeros. Sin embargo, la exposición a perros rabiosos sigue siendo responsable de más del 99 % de las muertes humanas en todo el mundo (Franka *et al* 2013).

El virus de la rabia pertenece al género *Lyssavirus* dentro de la familia *Rhabdoviridae*. Presenta un genoma de cadena simple de ácido ribonucleico (ARN) en sentido negativo que codifica cinco proteínas en el siguiente orden: nucleoproteína (N), fosfoproteína (P), proteína de la matriz (M), glicoproteína G (G) y una ARN polimerasa dependiente de ARN (L) (Conzelmann *et al* 1990; Coslett *et al* 1980).

Pichia pastoris es una levadura muy utilizada actualmente como sistema de expresión de proteínas recombinantes debido a su fácil manipulación genética, el alto nivel de producción que puede obtenerse de la proteína de interés y la capacidad de realizar modificaciones postraduccionales similares a las de los organismos eucariotas superiores (glicosilación, puentes disulfuro y procesado proteolítico). Además, posee una secuencia señal de secreción de la proteína heteróloga en el medio, lo que permite purificarla fácilmente (Hollenberg y Gellissen 1997). Este sistema de expresión emplea vectores de integración que generan una estabilidad génica, incluso en procesos a gran escala. Los cultivos se realizan con medios mínimos, sencillos, económicos, y son escalables. Todas estas características hacen a *Pichia pastoris* un sistema de expresión óptimo para la producción de proteínas recombinantes.

El objetivo del trabajo fue expresar la glicoproteína G del virus de la rabia en *Pichia pastoris*, mediante la inducción con metanol en condiciones de crecimiento controladas.

Materiales y métodos

Amplificación del gen de la glicoproteína G de la rabia mediante RT-PCR

La extracción del ARN viral se realizó a partir de una cepa vacunal inactivada del virus de la rabia

(CVS-51), gentilmente cedida por el Instituto Biológico Dr. Tomás Perón de La Plata, utilizando TRIzol® (Invitrogen) de acuerdo al protocolo del fabricante. La transcripción reversa se llevó a cabo utilizando 1 µg de ARN total, cebadores al azar, inhibidor de RNasa RNasin® (Promega) y la transcriptasa reversa del virus de leucemia murina de Moloney (Promega), bajo las condiciones especificadas por el proveedor. La reacción de PCR se realizó mediante la adición de 5 µl del ADN complementario a una mezcla conteniendo los cebadores GRVF (5' ATG TCG ACA AAA GAA TGG TTC CTC AGG CTC TCC TGT TTG TAC C 3') y GRVR (5' ATG AAT TCT CAC AGT CCG GTC TCA CCC CCG CTC TTG 3'). Para facilitar la orientación de la clonación, los sitios de restricción Sall y EcoRI se incorporaron a los cebadores GRVF y GRVR, respectivamente. El perfil de ciclado consistió en un paso de desnaturalización inicial de 3 min a 94 °C, seguido por 30 ciclos de 45 seg a 94 °C, 45 seg a 58 °C, y 90 seg a 72 °C. Por último, se realizó un paso de elongación a 72 °C durante 10 min. El producto de la RT-PCR se corrió en un gel de agarosa al 1,5 % para comprobar si el fragmento amplificado presentaba el tamaño esperado.

Construcción del vector de expresión para *Pichia pastoris*

El producto de la amplificación de la RT-PCR fue ligado al vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) y transformado, mediante electroporación, en *Escherichia coli* TOP10. Se sembraron 400 µl de la mezcla de transformación en una placa conteniendo agar Luria Bertani (LB) con ampicilina, X-Gal e IPTG. Para confirmar la presencia del inserto en el vector, a partir de las colonias obtenidas, se realizó una *colony*-PCR con cebadores específicos para la secuencia M13 presente en el vector pCR2.1-TOPO: M13F (5'-GTAAAACGACGGCCAG-3') y M13R (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'). El plásmido con el gen de la glicoproteína G de la rabia (pCR2.1-TOPO-G) fue digerido con las enzimas de restricción Sall y EcoRI, mientras que el vector de expresión para *Pichia pastoris* (pPIC9), fue digerido con las enzimas de restricción XhoI (compatible con el extremo generado por Sall) y EcoRI. Ambos productos de digestión fueron purificados desde geles de agarosa, usando el *kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up system* (Promega), y posteriormente ligados con el *Kit expressLink T4 DNA Ligase* (Invitrogen) de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

El producto de ligación (pPIC9-G) fue utilizado para transformar *E. coli* TOP10 mediante electroporación. Se sembraron 400 µl de la mezcla de transformación en una placa conteniendo agar LB con ampicilina. La transformación fue confirmada mediante *colony*-PCR utilizando cebadores específicos para la

secuencia AOX1: 5'AOX1 (5' GACTGGTTCCAATT-GACAAGC 3') y 3'AOX1 (5' GCAAATGGCATTCT-GACATCC 3').

Generación de un clon de *Pichia pastoris* recombinante

El ADN plasmídico de una de las colonias obtenidas en la placa conteniendo agar LB con ampicilina fue digerido con la enzima SmaI (la linealización del plásmido favorece el evento de recombinación) y utilizado para transformar, mediante electroporación, la levadura *Pichia pastoris* GS115. Luego de la transformación, 400 µl de la mezcla fueron sembrados en una placa de agar MD (medio mínimo con glucosa y sin histidina) que fue incubada durante 48 h a 28 °C. Para comprobar la transformación, utilizando los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1, se realizaron *colony-PCR* y los productos de amplificación se corrieron en un gel de agarosa al 1,5 %. Se seleccionó, al azar, una de las colonias correctamente transformada y se la secuenció para determinar si el gen había sido clonado correctamente. El resultado se comparó con otras secuencias de la glicoproteína G de rabia almacenadas en bases de datos.

Expresión de la glicoproteína G en pequeña escala

Las colonias positivas a la *colony-PCR* y la cepa control *Pichia pastoris* GS115 sin transformar fueron cultivadas en agitación a 28 °C *overnight* en 5 ml de medio líquido YPD (10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y 20 g/L de D-glucosa). Las levaduras fueron recolectadas mediante centrifugación a baja velocidad (2000 x g, 15 minutos), resuspendidas en 50 ml de medio BMG (glicerol al 1 %, base nitrogenada para levaduras al 1,34 % y fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,0) e incubadas en un frasco Erlenmeyer de 250 ml a 28 °C durante 24 horas, con agitación suave. Las levaduras fueron recolectadas mediante centrifugación a baja velocidad (2000 x g, 15 minutos), resuspendidas en 10 ml de medio BMM (metanol al 0,5 %, base nitrogenada para levaduras al 1,34 % y fosfato de potasio 0,1 M, pH 6,0) e incubadas en un frasco Erlenmeyer de 100 ml a 28 °C durante 72 h, con agitación suave. Para mantener la inducción, se añadió metanol cada 24 horas hasta una concentración final de 0,5 %.

También se realizó un cultivo en condiciones similares de la cepa GS115 sin transformar en medio BMM suplementado con histidina que fue utilizado como control negativo. En todos los casos, se tomaron muestras de los sobrenadantes de cultivos a las 0, 24, 48 y 72 h de inducción, para su posterior análisis mediante SDS-PAGE y ELISA.

Detección de la glicoproteína G mediante ELISA

Para determinar el clon de *Pichia pastoris*, con mayor nivel de expresión de la glicoproteína G recombinante, se desarrolló un método de ELISA. Como control positivo se utilizó la vacuna antirrábica producida en el Instituto de Zoonosis Luis Pasteur de la Ciudad Autónoma de Buenos Aires y, como control negativo, el sobrenadante de cultivo de *Pichia pastoris* GS115 sin transformar. Se colocaron 100 µl de muestra (controles y cada sobrenadante de cultivo a distintos tiempos de inducción) y 100 µl de buffer de pegado (Na₂CO₃ 25 mM, NaHCO₃ 25 mM, pH 9,6). Se incubaron a 4 °C *overnight*. Luego los pocillos fueron bloqueados a 37 °C durante 1 hora con un buffer de bloqueo, conteniendo leche descremada en polvo al 3 % y tween-20 al 0,05 % en PBS. Posteriormente se realizaron tres lavados con 100 µl de solución de lavado (tween-20 al 0,05 % en PBS). Como anticuerpo primario se utilizó un anticuerpo monoclonal anti-glicoproteína G de rabia diluido 1:2000 en buffer de bloqueo. Se agregaron 100 µl por pocillo de solución de anticuerpo primario y se incubaron a 37 °C durante 1 hora. Se realizaron tres lavados con 100 µl de solución de lavado. Se incubaron con 100 µl de una dilución (1:2000) de un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano picante a 37 °C durante 1 hora. Finalmente, las placas fueron lavadas y reveladas con 100 µl de solución 0,3 mg/ml de ATBS conteniendo H₂O₂ al 0,02 % durante 1 hora en oscuridad. Los valores de absorbancia fueron leídos a 405 nm utilizando un fotómetro de microplacas Multiskan FC (Thermo Scientific).

Expresión en fermentador de la glicoproteína G de la rabia en *Pichia pastoris*

Una vez encontrado el clon a amplificar, se realizó un cultivo en un biorreactor BioFlo 310 (New Brunswick Scientific, Eppendorf, Alemania) de 4 litros de volumen de trabajo.

Inicialmente, 150 ml del medio sintético MS fueron inoculados con 5 ml de un cultivo *overnight* en medio YPD del clon seleccionado mediante ELISA, e incubado *overnight* a 28 °C con agitación suave. El medio sintético MS contiene 32 g/L de glicerol; 20 g/L de KH₂PO₄; 2 g/L de MgSO₄·7H₂O; 0,3 g/L de CaCl₂·2H₂O; 15,7 g/L de (NH₄)₂SO₄; 1 ml de solución de vitaminas 1000X (0,002 g/L de biotina, 0,4 g/L de pantotenato de calcio, 0,002 g/L de ácido fólico, 0,4 g/L de niacina, 0,2 g/L de ácido p-aminobenzoico, 0,4 g/L de piridoxina (HCl), 0,2 g/L de riboflavina, 0,4 g/L de tiamina (HCl) y 2 g/L de inositol) y 1 ml de solución de elementos traza 1000X (0,05 g/L de ácido bórico, 0,004 g/L de sulfato de cobre, 0,01 g/L de yoduro de

potasio, 0,02 g/L de cloruro férrico, 0,04 g/L de sulfato de manganeso, 0,02 g/L de molibdato de sodio y 0,04 g/L de sulfato de zinc).

Una vez que el cultivo *starter* alcanzó una densidad óptica (OD_{600nm}) de 10, el fermentador conteniendo 3,85 litros de medio sintético MS fresco fue inoculado. La temperatura de cultivo se fijó en 28 °C y el pH se ajustó a 5.

Durante la primera etapa del cultivo se utilizó glicerol como fuente de carbono. La agitación se programó de manera tal de mantener el nivel de oxígeno disuelto en 30 % del valor de saturación, hasta que se consumiera todo el glicerol disponible en el fermentador.

Una vez consumido el glicerol, se diseñó una estrategia de alimentación para garantizar, en todo momento, un porcentaje de oxígeno disuelto entre el 20 y el 40 % de su valor de saturación en el medio de cultivo (DO-STAT). Se programó la bomba de alimentación de metanol para que se activara una vez que el oxígeno disuelto hubiera superado el 40 % y se apagase una vez que el mismo hubiera disminuido por debajo del 20 %. Este ciclo se mantuvo durante las 48 horas que duró la alimentación de metanol. Durante el proceso de fermentación, se tomaron muestras cada 12 horas, las que posteriormente fueron analizadas mediante SDS-PAGE y Western blot, para determinar los niveles de expresión de la glicoproteína G rábica recombinante.

Ensayos de SDS-PAGE y Western blot

Las proteínas presentes en el sobrenadante del cultivo a distintos tiempos fueron separadas mediante SDS-PAGE en condiciones estándar. Se utilizó un buffer con reductor y un gel de poliacrilamida al 5 % para el apilamiento y otro al 8 % para la separación. La corrida se efectuó a 60 V durante 4 horas. Los geles fueron teñidos con una solución de azul de Coomassie R250 al 0,1 % (Sigma).

Para el análisis de Western blot, se partió también de un SDS-PAGE con un gel al 8 % y luego se transfirió a una membrana de difluoruro de polivinilideno PVDF (Millipore), utilizando un aparato de electroblotting semiseco (Bio-Rad) a 15 V durante 30 minutos en buffer de transferencia (tris 100 mM, glicina 192 mM). La membrana fue incubada *overnight* a 4 °C con solución bloqueo (leche en polvo descremada al 5 % y tween-20 al 0,1 % en PBS). Luego de tres lavados de 5 min cada uno con TPBS (tween-20 al 0,1 % en PBS), se incubó durante 1 h a 37 °C y en agitación con una dilución 1:200 en solución de bloqueo de un suero policlonal anti-rabia producido en conejo. Luego de tres lavados de 5 minutos cada uno con TPBS, se incubó durante 1 h a 37 °C y en agitación con una di-

lución 1:1000 en solución de bloqueo, de un suero de cabra anti-IgG de conejo conjugado con la peroxidasa de rábano picante. Después de ser lavados tres veces durante 5 minutos con buffer TPBS, el anticuerpo unido fue detectado usando 3,3-diaminobenzidina en presencia de H_2O_2 .

Resultados

Construcción del vector de expresión para *Pichia pastoris*

El producto de la RT-PCR se corrió en un gel de agarosa al 1,5 %, comprobándose el tamaño esperado de 1597 pb (Figura 1). Este producto fue ligado al vector pCR2.1-TOPO y transformado, mediante electroporación, en *E. coli* TOP10. Las bacterias transformadas fueron sembradas en una placa selectiva de LB con ampicilina, X-Gal e IPTG, observándose más de 50 colonias blancas candidatas a presentar al gen de interés. Para confirmar el clonado, se realizaron *colony*-PCR con cebadores específicos a la región M13 del vector pCR2.1-TOPO.

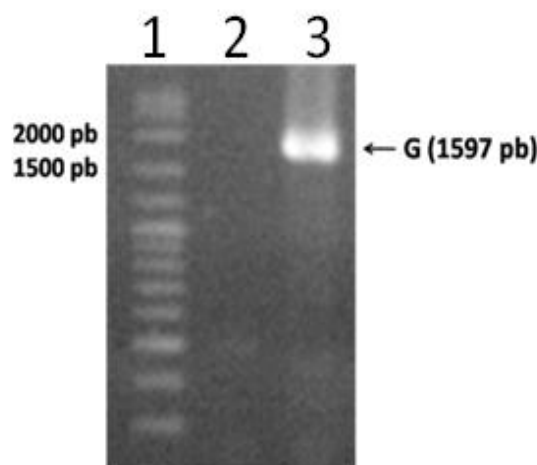


Figura 1: Electroforesis en gel de agarosa al 1,5 % del producto de la RT-PCR. Calle 1: marcador de peso molecular (GeneRuler™ 100 bp plus). Calle 2: control negativo. Calle 3: 10 µl de producto de RT-PCR.

A partir de uno de los clones positivos, se realizó el subclonado del gen de la glicoproteína G en el vector pPIC9. Posteriormente, el vector pPIC9-G fue transformado en *E. coli* TOP10 mediante electroporación, obteniéndose más de 100 colonias candidatas a presentar al gen de interés.

Utilizando cebadores específicos para la secuencia AOX1 se confirmó la transformación en 4 colonias mediante *colony*-PCR, observándose en los 4 casos una banda de 2067 pb de acuerdo a lo esperado.

Generación de un clon de *Pichia pastoris* recombinante

El ADN plasmídico pPIC9-G de uno de los clones previamente analizados fue linealizado con SacI en la región HIS4 y transformado, mediante electroporación, en *Pichia pastoris* GS115. El producto de la transformación fue sembrado en placas selectivas de agar MD (sin histidina), obteniéndose más de 50 colonias a las 72 horas de incubación a 28 °C. Las levaduras transformadas fueron capaces de revertir su auxotrofia a histidina (ya que se reconstituyó el gen HIS4) y lograron crecer en placas de agar MD. La transformación fue confirmada mediante *colony*-PCR, utilizando los cebadores 5'AOX1 y 3'AOX1. Así, se obtuvo un resultado positivo en 9 de las 15 colonias analizadas.

Utilizando una de las colonias positivas, se realizó un cultivo *overnight* en YPD, se extrajo su ADN genómico y se secuenció, usando la combinación de cebadores GRVF y GRVR. La secuencia de aminoácidos de la proteína recombinante (Figura 2), deducida a partir de la secuencia de nucleótidos obtenida, presentó más de un 99 % de homología al ser comparada con otras secuencias de la glicoproteína G almacenadas en el GenBank.

Expresión de la glicoproteína G en pequeña escala

Se realizaron los ensayos de expresión en escala de frasco Erlenmeyer para determinar la capacidad productora de glicoproteína G rábica de los clones de levadura positivos a la *colony*-PCR. Los sobrenadantes de cultivos a los distintos tiempos de inducción fueron evaluados mediante ELISA y SDS-PAGE para determinar la presencia de la glicoproteína G, contrastándolos con el sobrenadante de un cultivo de la cepa control *Pichia pastoris* GS115 sin transformar, producido en las mismas condiciones. Se realizó primeramente un ensayo de ELISA para determinar

cuál de los clones presentaba mayor producción de glicoproteína G, debido a la cantidad de clones a probar (datos no mostrados). Con el clon que presentó mayor señal en el ELISA, se realizó un SDS-PAGE y se observó una banda de aproximadamente 60 KDa que no estaba presente en el sobrenadante utilizado como control negativo (datos no mostrados). Se decidió entonces realizar un cultivo en fermentador para intentar mejorar la producción de la glicoproteína G recombinante.

Escalado en fermentador: ensayos de SDS-PAGE y Western blot

Al comparar mediante SDS-PAGE los sobrenadantes de cultivo en el fermentador del clon seleccionado y de un cultivo control realizado en condiciones similares (Figura 3A), pudo verse en la calle 4 (sobrenadante de cultivo recombinante) una banda intensa a una altura aproximada de 60 KDa que no se observa en la calle 3 (sobrenadante de cultivo control). Este mismo resultado fue observado en el ensayo de Western blot (Figura 3B). Además, pudieron verse las proteínas virales presentes en la vacuna inactivada que no se observaron en el SDS-PAGE (calle 2 de la Figura 3B), donde la banda correspondiente a la glicoproteína G es la que se encuentra a la altura aproximada de 68 KDa.

Discusión

Aunque la rabia no es enzoótica en Argentina, debido a su presencia en Bolivia y al constante movimiento de personas y animales entre ambos países se presentan brotes esporádicos de esta enfermedad en el norte de Argentina. Para poder controlar la presencia del virus en las zonas afectadas, resulta útil el estudio de sistemas aplicados al diagnóstico y de nuevas vacunas.

En el presente trabajo, el gen que codifica para la glicoproteína G de la rabia fue clonado en el sistema

```

1 MVPQALLFVP LLVFPLCFGK FPIYTIPTDKL GPWSPIDIHH LSCPNNLVVE
51 DEGRTNLSGF SYMELKVGYI SAIKMNGFTC TGVVTEAETY TNFVGYVTTT
101 FKRKHFRPTP DACRAAYNWK MAGDPRYEES LHNYPDYHW LRTVKTTKES
151 LVIIISPSVAD LDPYDRSLHS RVFPGGKCSG VAVSSTYCST NHDYTIWMPE
201 NPRLGMSCDI FTNSRGKRAS KGSETCGFVD ERGLYKSLKG ACKLQLCGVL
251 GLRLMDGTWV SMQTSNETKW CPPGQLVNLH DFRSDEIEHL VVEELVKKRE
301 ECLDALESIM TTKSVSFRRLL SHLRKLVPGF GKAYTIFNKT LMEADAHYKL
351 VRTWNEIIPS KGCLRVGGRC HPHVNGVFFN GIILGPDGNV LIPEMQSSLL
401 QQHMELLVSS VIPLMHPLAD PSTVFKNGDE AEDFVEVHLP DVHERISGVD
451 LGLPNWGKYV LLSAGALTAL MLIIFLMTCW RRVNRSEPTQ HNLRGTGREV
501 SVTPQSGKII SSWESYKSGG ETGL

```

Figura 2: Secuencia de aminoácidos de la glicoproteína G recombinante a partir de la secuencia de nucleótidos. Los sitios de glicosilación se encuentran subrayados.

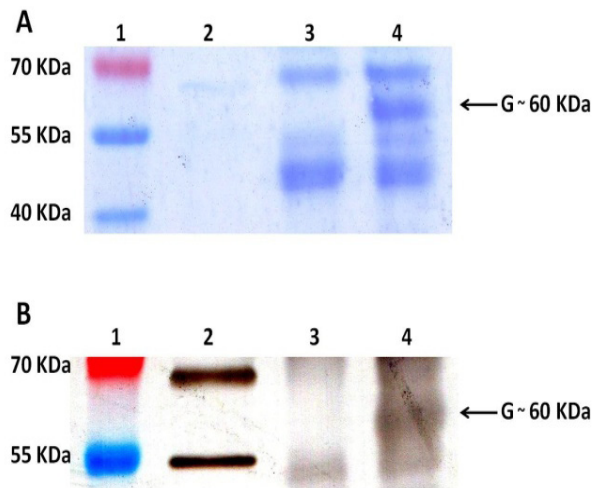


Figura 3: SDS-PAGE (A) y Western blot (B) de los sobrenadantes de cultivos en fermentador. Calle 1: marcador de peso molecular (Fermentas). Calle 2: vacuna inactivada; la banda superior es debida a la glicoproteína G rábica. Calle 3: sobrenadante del cultivo de *Pichia pastoris* GS115 sin transformar. Calle 4: sobrenadante del cultivo de *Pichia pastoris* recombinante a las 48 horas de inducción.

de expresión *Pichia pastoris*. Cuando se contrastaron las secuencias del gen clonado y la de la glicoproteína G de la cepa CVS-11 del virus de la rabia almacenada en el GenBank, el resultado arrojó una homología de secuencia superior al 99 %. Además, se comprobó que los tres sitios de N glicosilación descritos por Wiktor *et al* (1973) están presentes. Esto es de particular interés, debido a que es necesario que la glicoproteína se encuentre correctamente glicosilada y plegada para ser inmunogénica (Foley *et al* 2000).

Al comparar los cultivos en fermentador mediante SDS-PAGE, en el sobrenadante de cultivo del clon seleccionado se observó una banda intensa a una altura aproximada de 60 KDa no presente en el sobrenadante de cultivo control. Este resultado es acorde a lo esperado, debido a que la glicoproteína G de la rabia tiene un peso aproximado de 56,8 KDa sin glicosilar. Cuando se evaluaron los mismos sobrenadantes mediante Western blot, la glicoproteína G recombinante producida fue reconocida por anticuerpos específicos contra la rabia, de la misma manera que la glicoproteína nativa.

La composición del medio de cultivo y la estrategia de inducción empleada permitieron expresar la glicoproteína G recombinante a las 24 horas de alimentación con metanol. Este período es muy inferior al descrito por Nagesha *et al* (2010), quienes expresaron la glicoproteína G recombinante sólo después de las 108 horas de alimentación. Esta disminución de tiempo permite un ahorro económico considerable,

si se piensa en la posibilidad de escalar este proceso a nivel industrial.

A pesar de que *Pichia pastoris* tiene la capacidad de glicosilar proteínas de manera similar a la de los organismos eucariotas superiores, se observó una ligera variación en el peso molecular de la proteína obtenida respecto a la glicoproteína G del virus, posiblemente debido al agregado en defecto de residuos de azúcares durante el proceso de glicosilación. Esto puede explicarse por el hecho de que no todas las cepas de *Pichia pastoris* presentan las mismas características para glicosilar, teniendo algunas la actividad de glicosilación muy desarrollada y otras no tanto.

Si bien los resultados obtenidos hasta el momento son alentadores, se necesitarán ensayos de inmunización y estudios del bioproceso que mejoren la producción de esta proteína recombinante, para poder ser utilizada en la elaboración de sistemas aplicados al diagnóstico y de vacunas a subunidades para la prevención de la enfermedad.

Declaración de conflicto de intereses

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

Agradecimientos

Los autores agradecen la colaboración de los integrantes de la Cátedra de Virología de la Facultad de Ciencias Veterinarias de la Universidad Nacional de La Plata y del CINDEFI. Este trabajo fue parcialmente financiado por un subsidio otorgado por la UNLP en el marco del Programa de Incentivos a Docentes Investigadores (Proyecto 11/V224).

Bibliografía

- Conzelmann KK, Cox JH, Schneider LG, Thiel HJ. Molecular cloning and complete nucleotide sequence of the attenuated rabies virus SAD B19. *Virology*. 1990;175(2):485-99.
- Coslett GD, Holloway BP, Obijeski JF. The structural proteins of rabies virus and evidence for their synthesis from separate monocistronic RNA species. *J Gen Virol*. 1980;49(1): 161-80.
- Foley HD, McGettigan JP, Siler CA, Dietzschold B, Schnell MJ. A recombinant rabies virus expressing vesicular stomatitis virus glycoprotein fails to protect against rabies virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000;97(26):14680-5.
- Franka R, Smith TG, Dyer JL, Wu X, Niezgodka M, Rupprecht CE. Current and future tools for global canine rabies elimination. *Antiviral Res*. 2013;100(1): 220-5.
- Hampson K, Coudeville L, Lembo T, Sambo M, Kieffer A, Attlan M, *et al*. Estimating the global burden of endemic canine rabies. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(4): e0003709.

Hollenberg CP, Gellissen G. Production of recombinant proteins by methylotrophic yeasts. *Curr Opin Biotechnol.* 1997;8(5): 554-60.

Martínez L. Global infectious disease surveillance. *Int J Infect Dis.* 2000;4(4): 222-8.

Meslin FX, Fishbein DB, Matter HC. Rationale and prospects for rabies elimination in developing countries. *Curr Top Microbiol Immunol.* 1994;187: 1-26.

Nagesha SN, Ramanjini Gowda PH, Ningaraju TM, Madhusudana SN, Deepak N, Mahadeva Swamy HM, Yogendra KN, Nagaraju T, Desai AS. Heterologous expression of CVS rabies virus glycoprotein gene in *Pichia pastoris*. *IJGEB.* 2010;1(1): 101-10.

Wiktor TJ, György E, Schlumberger D, Sokol F, Koprowski H. Antigenic properties of rabies virus components. *J Immunol.* 1973;110(1): 269-76.

Metapneumovirus aviar: revisión sobre aspectos etiológicos, clínicos, anatomopatológicos y epidemiológicos

Avian metapneumovirus: review of etiological, clinical, anatomopathological and epidemiological aspects

Arias MN^{1,2*}, Machuca MA³, Petruccelli MA¹

¹Laboratorio de Enfermedades de las Aves y los Pilíferos, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. ²Becario, Universidad Nacional de La Plata. ³Laboratorio de Patología Especial Veterinaria, Dr. B. Epstein. Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata.

*Autor correspondiente. Correo electrónico del autor: nancyarias_1710@hotmail.com

Resumen: El *Pneumovirus aviar* (APV) es un patógeno viral de aves, que se ha asociado a infecciones del tracto respiratorio superior. El APV ha sido reclasificado y, junto con el *Metapneumovirus humano* (hMPV), fue asignado al género *Metapneumovirus*, motivo por el cual se lo denomina actualmente *Metapneumovirus aviar* (aMPV). Fue descrito por primera vez en 1978 en Sudáfrica. Luego se hizo presente en Europa, África, Medio Oriente y EE.UU. Fue clasificado en cuatro subtipos denominados: A, B, C y D. Si bien en pavos la enfermedad que provoca es grave, en pollos su rol como patógeno primario está menos aclarado. Se presenta junto con otros agentes en afecciones del aparato respiratorio y también formando parte de una entidad conocida como síndrome de cabeza hinchada. Los pollos pueden tener anticuerpos, incluso sin haber presentado signos clínicos. El mecanismo de transmisión requiere del contacto directo entre las aves. Su diseminación a grandes distancias es incierta, pero se postula que las aves silvestres son probables eslabones de la cadena. Generalmente, el diagnóstico se basa en pruebas serológicas, siendo la más utilizada la prueba de ELISA. En Argentina, se estima que este virus estaría presente pues se han detectado anticuerpos en sueros provenientes de aves en sistemas de cría comercial, pero hasta el momento no hay reportes de aislamiento del virus ni de su detección molecular.

Palabras clave: Paramixoviridae, *Metapneumovirus aviar*, *Pneumovirus aviar*, pollos, síndrome de cabeza hinchada.

Abstract: The *Avian pneumovirus* (APV) is a viral pathogen of birds, which has been associated with upper respiratory tract infections. Along with the *Human metapneumovirus* (hMPV), APV was placed in the genus *Metapneumovirus*. That is why it is currently called *Avian metapneumovirus* (aMPV). It was first reported in 1978 in South Africa. Then it was detected in Europe, Africa, Middle East and USA. It was classified into four subgroups called: A, B, C and D. While it causes a severe disease in turkeys, in chickens its role as a primary pathogen is less clear. It causes respiratory symptoms along with other agents and it also takes part of an entity known as swollen head syndrome. Chickens may have antibodies, without exhibiting signology. Transmission requires direct contact among birds. Its spread over long distances is uncertain, but wild birds are postulated as probable chain links. The diagnosis is usually based on serological tests, most commonly ELISA test. In Argentina its presence is estimated by antibodies detected in sera from commercial poultry, but there are no reports of isolation, or molecular detection.

Keywords: Paramixoviridae, *Metapneumovirus aviar*, *Pneumovirus aviar*, chickens, swollen head syndrome.

Introducción

El *Metapneumovirus aviar*, también denominado virus de la rinotraqueítis del pavo, causa infección del tracto respiratorio superior de pavos, pollos y otras especies de aves. Se halla distribuido en América, Europa, Asia y África, donde se crían pavos y pollos, causando importantes pérdidas productivas. En Argentina se ha demostrado la presencia de anticuerpos en parvadas de pollos y reproductores de las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos (Uriarte *et al* 2010a, 2010b). El objetivo de la presente revisión es realizar una actualización de esta entidad, con especial énfasis en la situación que este agente presenta en nuestro país.

Definición

El *Metapneumovirus aviar* (aMPV) causa enfermedad respiratoria de curso agudo en pavos y gallinas de todas las edades. Las aves afectadas presentan secreción nasal y ocular, sinusitis, edema de cara e inflamación de los senos infraorbitarios (Cook 2000). Debido a que origina distintas presentaciones clínicas, la enfermedad tiene diferentes denominaciones. El cuadro observado en pavos se denomina "rinotraqueítis del pavo", en pollos y gallinas se denomina "síndrome de cabeza hinchada" o SHS (del inglés *swollen head syndrome*) y, de un modo más general, se denomina "rinotraqueítis aviar", ya que también puede afectar a otras especies aviares. Dichas presentaciones fueron denominadas sobre la base de los signos clínicos y las lesiones observadas en las diferentes especies (Gough y Jones 2008; Jones 1996).

Historia

En el año 1978 se describió por primera vez en Sudáfrica en poblaciones de pavos, un cuadro respiratorio agudo, altamente contagioso, caracterizado por tos, estornudos y secreciones oculares y nasales (Buys y Du Preez 1980). Los índices de morbilidad y mortalidad fueron muy altos, lo que no se había descrito hasta ese momento en dicha especie. Este mismo cuadro también fue reportado entre 1985 y 1986 en pavos en Francia (Giraud *et al* 1986) y en el Reino Unido, donde se aisló aMPV (McDougall y Cook 1986). A fines de los 80' se identificó también en pollos de Sudáfrica y Europa. En esta especie los signos clínicos característicos fueron secreción nasal, ocular y edema facial. Es por este motivo que la enfermedad recibió el nombre de síndrome de cabeza hinchada (Buys *et al* 1989; Morley y Thomson 1984).

En sus comienzos, se pensó que el SHS era producido por una infección combinada de coronavirus y *Escherichia coli* (Morley y Thomson 1984) pero el síndrome no pudo ser reproducido con

ambos agentes. Unos años después, y gracias a la detección de anticuerpos anti aMPV, se relacionó el síndrome con este microorganismo en particular. Más adelante se logró aislar el virus a partir de aves con la enfermedad clínica (Jones *et al* 1991; McDougall y Cook 1986; Lu *et al* 1994; Pages *et al* 1990).

En 1988 el agente causal fue caracterizado como un virus perteneciente a la familia *Paramyxoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*, e inicialmente fue categorizado dentro del género *Pneumovirus* (Cavanagh y Barret 1988). Actualmente ha sido reclasificado en el género *Metapneumovirus*.

En lo que respecta a la situación en América Latina, en 1986 se observó en Perú un cuadro clínico con signos respiratorios y edema cefálico, compatible con infección por aMPV. Este hallazgo coincidió con la importación de pollos franceses. Alrededor de 10 años después pudo aislarse e identificarse el virus (Icochea 2002). Desde entonces la infección por aMPV ha sido reconocida como uno de los principales problemas en la industria de los pollos de carne en Perú, con comportamiento endémico en los meses de verano. Desde principios de los 90's se han publicado resultados serológicos positivos en gallinas reproductoras de México con SHS (Lucio *et al* 1991) y, recientemente, se logró identificar el virus mediante el aislamiento del agente a partir de muestras obtenidas de gallinas ponedoras (Rivera-Benítez *et al* 2014). En el año 1999 fue detectado en Brasil. Años más tarde se identificó el virus mediante métodos moleculares y se logró su aislamiento (D'Arce *et al* 2005). En Chile se realizó un amplio relevamiento, mediante estudios serológicos, virológicos, bacterianos y moleculares, con el fin de evaluar la presencia de *Ornitobacterium rhinotracheale* (ORT) y aMPV en animales de carne. Este estudio determinó la presencia de ambos agentes en el territorio chileno. Si bien no se identificó el agente en la población de pavos en el momento del relevamiento mencionado (González Rubio y Rivera Salazar 2010), sí fue detectado serológicamente en esta especie a fines de los 90's (Toro *et al* 1998).

Un relevamiento serológico llevado a cabo en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos indicó la presencia de anticuerpos contra aMPV en el 14 % de las muestras de pollos parrilleros y en el 24 % de las muestras de reproductores. Ello sugiere la posibilidad de circulación del virus en el sistema productivo de nuestro país. Además de la evidencia serológica, se han observado aves con signos clínicos característicos de la infección, lo que refuerza la hipótesis de la circulación viral en Argentina (Uriarte *et al* 2010a, 2010b). Para corroborarla es crucial la identificación del agente etiológico.

Etiología

Clasificación del virus

Inicialmente se consideró a este agente como miembro del género *Pneumovirus* (Cavanagh y Barret 1988), por lo cual se lo denominó *Pneumovirus aviar* (APV). En la actualidad ha sido clasificado dentro del género *Metapneumovirus* (Pringle 1998). Los metapneumovirus aviares (aMPV) son miembros de la familia *Paramixoviridae*, subfamilia *Pneumovirinae*. La subfamilia *Pneumovirinae* comprende dos géneros: *Pneumovirus*, en el que están incluidos los virus respiratorios sincitiales de los mamíferos, y *Metapneumovirus*, que comprende los metapneumovirus humanos y aviares.

El aMPV ha sido clasificado en 4 subtipos (A, B, C y D) sobre la base de su antigenicidad y su diversidad de secuencia genética. Los subgrupos A y B están muy relacionados genéticamente. En América predomina el subtipo A, aunque también se ha hallado el subtipo B. Este último es más frecuente en Europa y también ha sido encontrado en países como Israel (Banet-Noach *et al* 2005) y Jordania (Gharaibeh y Algharaibeh 2007). El subtipo C se ha detectado en Estados Unidos (Goyal *et al* 2000; Seal 1998) y en Francia, mientras que el D ha sido reportado solo en Francia (Saif *et al* 2003). Cuando se identificó la secuencia de aminoácidos del aMPV, se constató que aproximadamente el 40 % de los aminoácidos tienen la misma identidad que aquellos de los pneumovirus mamíferos, mientras que se hallaron diferencias en el orden de algunos de los genes.

Fue debido a las diferencias mencionadas con los pneumovirus que se lo reclasificó como la "especie tipo" de un nuevo género denominado: *Metapneumovirus*, del cual era el único miembro (Lamb *et al* 2000; Pringle 1998). En la actualidad se sabe que existe un *Metapneumovirus humano* involucrado en enfermedades respiratorias en niños y que, posiblemente, ha estado presente en los humanos desde hace varias décadas. Se observó que afecta al tracto respiratorio superior de los niños y, además, puede causar bronquiolitis y neumonía (Van den Hoogen *et al* 2001). Al comparar la secuencia de aminoácidos de ciertas proteínas virales de los metapneumovirus humanos y aviares, se puso en evidencia que el subtipo C aviar está relacionado más estrechamente con el virus humano que con los otros subtipos aviares (Njenga *et al* 2003; Shin *et al* 2002b; Van den Hoogen *et al* 2002).

Morfología y composición química del virus

El *Metapneumovirus aviar* es un virus compuesto por una cadena simple de ARN, no segmentado y pleomórfico y, por lo tanto, puede presentarse de forma esférica o en forma filamentosa. Cuando presenta

forma esférica, generalmente su diámetro varía entre 80 y 200 nm, aunque se han comunicado diámetros de 500 nm. Cuando su forma es filamentosa, su diámetro oscila entre 80 a 100 nm y su longitud es de hasta 1000 nm (Wyeth *et al* 1986). El virus es envuelto y posee espículas de entre 13 y 14 nm (Loan *et al* 1992). Como parte de su estructura presenta 9 polipéptidos víricos de pesos moleculares comprendidos entre 14 y 200 kilodaltons. Se han secuenciado sus genes y el orden dentro del genoma viral, lo que permitió la comparación con otros pneumovirus mamíferos y entre los mismos metapneumovirus aviares (Cavanagh y Barret 1988).

Viabilidad viral

Varios desinfectantes son efectivos para disminuir la viabilidad de aMPV, incluyendo los amonios cuaternarios, el etanol, los derivados del fenol y el hipoclorito de sodio. Es resistente a la desecación, pues sorprendentemente se ha observado que después de 7 días de secado a temperatura ambiente las partículas virales siguen viables (Gough y Jones 2008).

Clasificación de las cepas virales

Existen diferencias entre los subtipos de aMPV. Esto fue puesto en evidencia por medio del análisis de la secuencia de nucleótidos de la glicoproteína G (Juhász e Easton 1994). Mediante pruebas de fijación del complemento se comprobó que los subtipos A y B pertenecen a un mismo serogrupo y que ambos pueden infectar tanto a pavos como a pollos (Collins *et al* 1993).

Mediante el análisis filogenético de los subtipos A, B y C se demostró que los subtipos A y B están más estrechamente relacionados entre sí que con el subtipo C. Los estudios retrospectivos que se llevaron a cabo en dos casos a partir de material viral aislado en Francia durante 1985 permitieron identificar el cuarto subtipo, denominado más tarde subtipo D. Este subtipo exhibe diferencias en la secuencia del gen G con respecto a la de los subtipos A, B y C.

Patogenia de la rinotraqueítis por Metapneumovirus

Este virus se replica principalmente en los cornetes nasales y la tráquea, pero también puede replicarse en el pulmón y los sacos aéreos. A las 24 horas puede detectarse en la mucosa nasal y la tráquea, obteniéndose la mayor cantidad de virus entre los 3 y los 5 días. El virus puede ser aislado de la mucosa nasal de las aves hasta 14 días posinoculación. Mediante PCR puede detectarse su material genético hasta 17 días pos inoculación (Jing *et al* 1993). El aMPV se asocia con las células ciliadas y no ciliadas del epite-

lio nasal y traqueal, causando ciliostasis, destrucción ciliar y necrosis, lo que favorece la colonización por los agentes bacterianos secundarios (Majó *et al* 1996).

El virus infecta a los animales en las primeras semanas de vida. El periodo virémico es corto, lo que dificulta el aislamiento ya que, cuando las aves comienzan a manifestar signos clínicos, el virus ya no se encuentra en la sangre, y los agentes que predominan son aquellos que colonizaron gracias a la ciliostasis, la destrucción ciliar y la necrosis epitelial generada por aMPV.

Signos clínicos de la rinotraqueítis por metapneumovirus

Metapneumovirus en los pavos

En pavos este virus afecta el tracto respiratorio superior, por lo cual la enfermedad se denomina "rinotraqueítis del pavo". El cuadro se presenta con estornudos, rales traqueales, tumefacción de senos infraorbitarios y descargas nasal y ocular. Las secreciones inicialmente son serosas y pueden volverse purulentas debido a la infección bacteriana. También pueden observarse tos y sacudimiento de la cabeza. Cuando no ocurre infección bacteriana las aves se recuperan dentro de los 14 días, pero cuando ocurre y/o cuando el manejo de las aves no es el adecuado, pueden desarrollarse lesiones más severas como aerosaculitis, peritonitis, neumonía, perihepatitis y peritonitis. Se han reportado animales con estas lesiones y con un aumento consecuente de los índices de morbilidad y mortalidad (Jones *et al* 1988). Asimismo, en pavas ponedoras las infecciones por aMPV pueden provocar disminución en la producción de huevos y en la calidad de su cáscara y estos animales tardan hasta tres semanas en recuperarse.

Metapneumovirus en los pollos

En los pollos, el rol de este microorganismo como agente primario de enfermedad es menos claro que en los pavos. En pollos y gallinas se lo encuentra implicado en el SHS, pero siempre asociado con otros microorganismos. Además, la presencia de anticuerpos anti aMPV en los animales no necesariamente indica que hayan sufrido la enfermedad. El agente ha sido aislado de pollos de todas las edades y categorías y también se han realizado infecciones experimentales con éxito (Jones *et al* 1991; Picault *et al* 1987; Tanaka *et al* 1995). El SHS se caracteriza por apatía e hinchazón de la cara, en especial de los senos infraorbitarios, de ahí su denominación. A veces las aves pueden presentar signos más severos como desorientación, tortícolis y opistótonos (Cook 2000; Pattison *et al* 1989).

A partir de animales con este síndrome pudieron aislarse, además del aMPV, el virus de la bronquitis infecciosa (IBV) (Morley y Thomson 1984) y el IBV junto con *Escherichia coli*.

Hallazgos anatomopatológicos de la rinotraqueítis por Metapneumovirus

Lesiones macroscópicas

En pollos y reproductores pesados las lesiones macroscópicas incluyen edema y exudado purulento en el tejido subcutáneo de la cabeza, cuello y barbillones, como así también sinusitis infraorbitaria (Lu *et al* 1994; Tanaka *et al* 1995). Las gallinas en postura pueden presentar prolapso de oviducto debido a cuadros tusígenos intensos.

En los brotes naturales, el cuadro suele complicarse por la presencia de patógenos asociados, sumándose así otras lesiones más severas como aerosaculitis, peritonitis, neumonía y perihepatitis (Jones 2001).

Lesiones microscópicas

Microscópicamente se observan hipertrofia e hiperplasia de las glándulas de la mucosa de los cornetes con pérdida, por regiones, del epitelio ciliado. Se observan, además, hiperemia e infiltración mononuclear leve. Estas lesiones se observaron en casos experimentales, siendo más severas entre los 4 y 10 días posinoculación. La recuperación completa de la mucosa se observa 18 días posinoculación. Además, pueden observarse lesiones en la tráquea como engrosamiento de la mucosa debido a la congestión, el edema y la infiltración mononuclear (Catelli *et al* 1998; Majó *et al* 1995, 1996). En conclusión, aMPV causa lesiones circunscriptas en el tracto respiratorio superior.

Epidemiología de la rinotraqueítis por Metapneumovirus

Distribución geográfica del agente viral

En la mayor parte de las regiones más importantes de cría de aves de corral se ha reportado la detección serológica de anticuerpos contra aMPV. Sin embargo, son relativamente pocos los países que comunicaron el hallazgo del agente mediante el empleo de técnicas de aislamiento o detección del genoma viral, debido a las dificultades que este virus presenta para su detección e identificación.

Actualmente, el aMPV es considerado en numerosos países como el agente etiológico de una enfermedad importante tanto en pavos como en pollos. En América Latina su situación no está aún determinada. En Australia y Canadá aún no se han reportado

casos de infección por el virus (Bell y Alexander 1990; Heckert y Myers 1993).

Patogenicidad de Metapneumovirus

Es importante destacar que, "a campo", aMPV es capaz de provocar la enfermedad con altos índices de morbilidad y, en ocasiones, altos índices de mortalidad. La situación es muy diferente en condiciones experimentales, en las que las aves exhiben signos de rinotraqueítis más leves. Todo indica que la diferencia en la severidad de los signos clínicos entre presentaciones a campo y lo que ocurre experimentalmente estaría en relación con el medio ambiente en el que las aves viven y la presencia o no de microorganismos que producen infecciones secundarias.

Se han aislado diferentes bacterias de casos de SHS, tales como *Alcaligenes faecalis*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma* sp, *E. coli* y *Staphilococcus*, aunque se observó que el agente más relevante fue *E. coli* (Pàges et al 1990). Se observó que las lesiones se exacerban cuando aMPV y *E. coli* se presentan en un mismo animal, ya que las mismas son más severas que cuando cada uno de los agentes actúa por separado (Brien 1985; Majó et al 1997). Experimentalmente, se han infectado pavos con *Chlamydia psittaci* antes de la inoculación con aMPV y se observó que aumentó significativamente la severidad de la infección por aMPV (Van Looock et al 2006).

Actualmente está demostrada la existencia de sinergismo entre aMPV y el agente ORT (Marien et al 2005).

Como se ha notado en pollos parrilleros, aMPV podría no comportarse como un patógeno primario; antes bien podría estar involucrado con otra serie de agentes en el SHS o bien en otro cuadro múltiple de enfermedades respiratorias. El empleo de vacunas contra aMPV redujo la presentación de la enfermedad (Cook 2000).

En la actualidad, se considera que aMPV es el agente primario del síndrome y que luego se asocian bacterias complicando el cuadro, tales como *E. coli*, *Pasteurella*, ORT y *Mycoplasmas* (Pàges y San Gabriel 1990). Claro que, como en todas las enfermedades infecciosas, las condiciones del medio ambiente desempeñan un rol fundamental y deben ser consideradas como una variable más en la presentación de la enfermedad.

Infección por Metapneumovirus en otros hospedadores

Si bien el cuadro de SHS es importante en pavos y pollos, ya que su infección se refleja en pérdidas económicas, se ha demostrado la infección también

en otras especies aviares, como en gallinas de Guinea (*Numida meleagris*), en las que se detectaron anticuerpos. En esta especie (Litjens et al 1989) y en los faisanes (Ogawa et al 2001) se ha descrito el SHS y se ha aislado el aMPV. También existen estudios serológicos que sugieren que el virus afecta a las aves de caza (Welchman et al 2002). En gorriones, patos, gansos, golondrinas, gaviotas y estorninos de EE.UU. se ha detectado el agente mediante PCR-RT a partir de muestras obtenidas de cornetes nasales. Este virus está estrechamente relacionado con los virus subtipo C aislados de pavos comerciales también en EE.UU. (Bennett et al 2002, 2004; Shin et al 2000, 2002).

En el año 1988, se realizó una experiencia infectando diferentes especies aviares con el subtipo A y se demostró susceptibilidad tanto de pavos y pollos como de faisanes. Las gallinas de Guinea demostraron responder inmunológicamente a este subtipo, mientras que patos, gansos y palomas parecieron ser refractarios al virus (Gough et al 1988). Sin embargo, más recientemente se informó una infección por virus similares al subtipo C en patos, asociada con signos respiratorios y alteraciones en la producción de huevos (Toquin et al 1999). Además, se han detectado anticuerpos contra aMPV en criaderos de avestruces en Zimbabwe (Cadman et al 1994) y en gaviotas del mar Báltico (Heffels-Redman et al 1998).

En 2011 se realizó un estudio de aves sinantrópicas de Brasil, ya sea de traspatio o vida libre, mediante el cual se detectó el agente mediante métodos moleculares (RT-PCR) (Felippe et al 2011).

Cuando el virus fue reportado en Sudáfrica por primera vez, su diseminación por otras partes del mundo planteó el interrogante sobre su origen. Así es que se pensó en las aves de vida libre como probables eslabones de dicha cadena de diseminación (Shin et al 2000). Aunque se sospecha la existencia de transmisión a través de grandes distancias, solo pudo demostrarse la transmisión por contacto directo entre las aves (Cook et al 1991).

Transmisión de Metapneumovirus

En 1991, Cook y col. demostraron que el virus fue transmitido por pavos infectados a parvadas de pavos susceptibles por contacto directo y durante 9 días pos infección. Estos autores destacaron la importancia del contacto directo, ya que el virus no se extendió a todas las aves del mismo ambiente, sino sólo a las aves alojadas de manera contigua.

No hay evidencia de transmisión vertical del virus a pesar de haberse detectado alto título viral en el tracto reproductivo de aves ponedoras (Jones et al 1988; Khera y Jones 1999).

Las aves migratorias podrían ser transmisoras,

pero no existen evidencias de la propagación de los subtipos A y B de América Central y del Sur a EE.UU., ni de la propagación del subtipo C hacia América del sur (Gough y Jones 2008).

Importancia de la infección por metapneumovirus en la salud pública

En relación con la similitud genética existente entre metapneumovirus humanos (hMPV) y aviares, mediante un trabajo realizado en el año 2006 se comprobó que el hMPV puede causar enfermedad clínica en pavos (Velayudhan *et al* 2006). También se demostró que el virus aviar puede infectar al hombre. En el periodo 2007-2008 se realizó un estudio serológico transversal de 57 productores de pavos, 38 trabajadores de plantas procesadoras y 82 individuos controles sin exposición a pavos. Este trabajo puso de manifiesto que los trabajadores de la industria cárnica eran los individuos con mayor riesgo de infección (con una seroprevalencia de 86,5 %), en comparación con los productores y los grupos controles que tuvieron seroprevalencias del 67,3 % y 66,7 %, respectivamente. Esto también fue informado por investigadores del virus de la leucosis/sarcoma, de la reticuloendoteliosis y de la enfermedad de Marek (Kayali *et al* 2011). No se han realizado aún estudios serológicos en el personal de las plantas procesadoras de pollos en nuestro país, lo que sería interesante para Argentina, que posee una industria avícola muy desarrollada.

Impacto económico de la infección por metapneumovirus

Las infecciones por aMPV en aves de corral, principalmente en pavos, están asociadas con importantes pérdidas económicas y operan en detrimento del bienestar animal. En pavos es considerada la enfermedad respiratoria más grave después de la influenza aviar, aun en aquellos países donde la vacunación es una práctica habitual (Lister 1998). En pollos comerciales, la enfermedad ha tenido menor repercusión económica, aunque en los países donde el SHS tiene alta incidencia se registran importantes mermas en la producción de huevos y en el rendimiento de los animales (Gough y Jones 2008).

En la Argentina no existen estudios que reflejen el impacto económico que genera en las granjas comerciales de pollos, gallinas y pavos, pero se estima que su presencia impacta de manera negativa en la rentabilidad de la producción avícola nacional, ya que limita la capacidad de las aves de transformar el alimento en carne o huevos.

Discusión

De los conceptos vertidos en la revisión se desprende que el aMPV está presente en la mayor parte del mundo donde se crían pavos y pollos. En lo que concierne a las explotaciones de pollos y reproductores, se ha demostrado la presencia de anticuerpos contra aMPV, lo cual sugiere la infección de las aves. En Argentina las evidencias serológicas permiten inferir la presencia del agente en las parvadas de pollos y reproductores en áreas de producción avícola, principalmente en las provincias de Buenos Aires y Entre Ríos. Se han encontrado anticuerpos en aves con signos respiratorios y sin ellos. En nuestro país es muy poca la información que se ha publicado con respecto a esta enfermedad, pues aún no contamos con reportes de aislamientos ni detección molecular y, por supuesto, no se sabe qué subtipos están presentes en el territorio.

Entonces, extrapolando resultados de estudios que reflejan las pérdidas económicas que aMPV genera en regiones de cría en países como EE.UU. (Gough y Jones 2008), es probable que ocurran mermas productivas también en nuestro medio. Es decir, podemos estar subestimando la presencia de este agente en nuestras explotaciones avícolas.

Conclusiones

Para profundizar los conocimientos de la situación de nuestro medio, en relación con la identificación del aMPV y el subtipo actuante, se hace necesario el desarrollo de métodos de diagnóstico eficientes que permitan la identificación del virus en las poblaciones aviares. Si bien los métodos serológicos permiten conocer cuál es la prevalencia de la infección viral y la circulación del agente en las parvadas, solamente sugieren la presencia viral, pero no su identificación y subtipo. Por este motivo, consideramos que el desarrollo y puesta a punto de los métodos moleculares de detección viral, como la técnica de PCR, serán de suma utilidad para conocer la situación de nuestro medio en relación con el *Metapneumovirus aviar*.

Declaración de conflicto de intereses

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

Bibliografía

Banet-Noach C, Simanov L, Perk S. Characterization of Israeli avian metapneumoviruses strains in turkeys and chickens. Avian Pathol. 2005; 34(3): 220-226.

- Banet-Noach C, Simanov L, Laham-Karam N, Perk S, Bacharach E. Longitudinal survey of avian metapneumoviruses in poultry in Israel: infiltration of field strains into vaccinated flocks. *Avian Dis.* 2009; 53(2): 184-189.
- Bennett RS, Mc Comb B, Shin HJ, Njenga MK, Nagaraja KV, Halvorson DA. Detection of avian pneumovirus in wild Canadian geese (*Branta canadensis*) and blue-winged teal (*Anas discors*). *Avian Dis.* 2002; 46(4): 1025-1029.
- Bennett RS, Nezworski J, Velayudhan BT, Nagaraja KV, Zeman DH, Dyeer N, Graham T, Lauer DC, Njenga MK, Halvorson DA. Evidence of avian pneumovirus spread beyond Minnesota among wild and domestic birds in Central North America. *Avian Dis.* 2004; 48(4): 902-908.
- Bell IG, Alexander DG. Failure to detect antibody to turkey rhinotracheitis virus in Australian poultry flocks. *Aust Vet J.* 1990; 67(6): 232-233.
- Buyts SB, Du Preez, JH. A preliminary report of a virus causing rhinotracheitis in turkeys in South Africa and attempts to attenuate the virus. *Turkeys.* 1980; 36:46.
- Buyts SB, Du Preez JH, Els HJ. Swollen head syndrome in chickens: a preliminary report on the isolation of a possible aetiological agent. *S Afr Vet Assoc.* 1989; 60(4): 221-222.
- Cadman HF, Kelly PJ, Zhou R, Davelaar F, Manson PR. Serosurvey using ELISA for antibodies against poultry pathogens in ostriches (*Struthio camelus*) from Zimbabwe. *Avian Dis.* 1994;38(3): 621-625.
- Catelli E, Cook JKA, Chester J, Orbell SJ, Woods MA, Baxendale W, Huggins MB. The use of virus isolation, histopathology and immunoperoxidase techniques to study the dissemination of a chicken isolate of avian pneumovirus in chickens. *Avian Pathol.* 1998; 27(6): 632-640.
- Cavanagh D, Barret T. Pneumovirus-like characteristics of the mRNA and proteins of turkey rhinotracheitis virus. *Virus Res.* 1988; 11(3): 241-256.
- Collins MS, Gough RE, Alexander DJ. Antigenic differentiation of avian pneumovirus isolates using polyclonal antisera and mouse monoclonal antibodies. *Avian Pathol.* 1993; 22(3): 469-479.
- Cook JKA, Ellis MM, Huggins MB. The pathogenesis of turkey rhinotracheitis virus in turkey poults inoculated with the virus alone or together with two strains of bacteria. *Avian Pathol.* 1991; 20(1): 155-166.
- Cook JKA. Avian pneumovirus infections of turkeys and chickens. *Review. Vet J.* 2000; 160(2): 118-125.
- D'Arce RCF, Coswig LT, Almeida RS, Trevisol IM, Monteiro MCB, Rossini LI, Di Favio J, Hafez HM, Arns CW. Subtyping of new Brazilian avian metapneumovirus isolates from chickens and turkeys by reverse transcriptase-nested-polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 2005; 34(2): 133-136.
- Felippe PA, Antoniassi da Silva LH, Bianchi dos Santos M, Tsumi Sakata S, Arns CW. Detection of and phylogenetic studies with avian metapneumovirus recovered from feral pigeon and wild birds in Brazil. *Avian Pathol.* 2011; 40(5): 445-452.
- Gharaibeh S, Algharaibeh G. Serological and molecular detection of avian pneumovirus in chickens with respiratory disease in Jordan. *Poult Sci.* 2007; 86(8): 1677-1681.
- Giraud P, Bennejean G, Guitet M, Toquin D. Turkey rhinotracheitis in France: preliminary investigations on a ciliostatic virus. *Vet Rec.* 1986; 119(24): 606-607.
- González Rubio A, Rivera Salazar A. Identificación de *Ornithobacterium rhinotracheale* y metapneumovirus aviar. Caracterización epidemiológica. *Boletín Veterinario Oficial.* 2010 (11) I semestre. Gobierno de Chile. Disponible en <http://goo.gl/SuPy4V>.
- Goyal SM, Chiang SJ, Dar AM, Nagaraja KV, Shaw DP, Halvorson DA, Kapur V. Isolation of avian pneumovirus from an outbreak of respiratory illness in Minnesota turkeys. *J Vet Diagn Invest.* 2000; 12: 166-168.
- Gough RE, Collins MS, Cox WJ, Chettle NJ. Experimental infection of turkeys, chickens, ducks, guinea-fowl, pheasants and pigeons with turkey rhinotracheitis virus. *Vet Rec.* 1988; 123(2): 58-59.
- Gough RE, Jones RC. 2008. Avian metapneumovirus. En: Saif YM, Fadly AM, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Swayne DE. *Diseases of Poultry*, 12th ed, Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd., pp. 100-110.
- Heckert RA, Myers DJ. Absence of antibodies to avian pneumovirus in Canadian poultry. *Vet Rec.* 1993; 132(7): 172.
- Heffels-Redmann U, Newmann U, Branne S, Cook JKA, Pruter J. Serological evidence for susceptibility for sea gulls to avian pneumovirus (APV) infections. En: *Proceedings International Symposium on Infection Bronchitis and Pneumovirus Infections in Poultry.* Heffels-Redmann U, Kaleta E. (eds) Rauschholzhausen, Germany, 1998. pp 23-25.
- Icochea E. 2002. Infección por pneumovirus aviar. *Memorias del I Seminario de la Asociación de Médicos Veterinarios Especialistas en Aves.* Lima, Perú: AMEVEA.
- Jing L, Cook JKA, Brown TDK, Shaw K, Cavanagh D. Detection of turkey rhinotracheitis virus in turkeys using the polymerase chain reaction. *Avian Pathol.* 1993; 22(4): 771-783.
- Jones RC. Avian pneumovirus infection: questions still unanswered. *Avian Pathol.* 1996; 25(4): 639-648.
- Jones RC. 2001. Pneumovirinae. En: Jordan F, Pattison MD, Alexander D, Faragher T (eds). *Poultry Diseases*, 5th edition, W. B. Saunders publishers, pp 272-280.
- Jones RC, Naylor CJ, Bradbury JM, Savage CE, Worthington K, Williams RA. Isolation of a turkey rhinotracheitis-like virus from broiler breeder chickens in England. *Vet Rec.* 1991; 129(23): 509-510.
- Jones RC, Williams RA, Baxter-Jones C, Savage CE, Wilding GP. Experimental infections of laying turkeys with rhinotracheitis virus: distribution of virus in the tissues and serological response. *Avian Pathol.* 1988; 17(4): 841-50.
- Juhász K, Easton AJ. Extensive sequence variation in the attachment (G) protein gene of avian pneumovirus: evidence for two distinct subgroups. *J Gen Virol.* 1994; 75(11): 2873-2880.
- Kayali G, Ortiz EJ, Chorazy ML, Nagaraja KV, DeBeauchamp J, Webby RJ, Gray GC. Serologic evidence of avian metapneumovirus infection among adults occupationally exposed to turkeys. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2011; 11(11): 1453-1458.
- Kehra RS, Jones RC. *In vitro* and *in vivo* studies on the pathogenicity of avian pneumovirus for the chicken oviduct. *Avian Pathol.* 1999; 28: 257-262.
- Lamb RA, Collins PL, Kolakofsky D, Melero JA, Nagai Y, Oldstone MBA, Pringle CR, Rima BK. 2000. Paramixoviridae. En *MHV Regenmortel*, CM Fauquet, DHL Bishop, EB

- Carstens, MK Estes, SM Lemon, J Maniloff, MA Mayo, DJ McGeoch, CR Pringle, RB Wickner (Eds). Virus taxonomy. pp. 835-849. New York: Academic Press.
- Lister SA. 1998. Current experiences with respiratory diseases in meat turkeys in the U.K. En: 1st International Symposium on Turkey Diseases. Ed HM Hafez. German Veterinary Medicine Society 19-21 february, Berlin. pp 104-13.
- Litjens JB, Kleyn van Willigen FC, Sinke M. A case of swollen head syndrome in a flock of guinea-fowl. Tijdschr Diergeneesk. 1989; 114(13): 719-720.
- Lucio DE, Cortés ME, Le Gros FX. Presentación del síndrome de la cabeza hinchada en parvadas de aves reproductoras pesadas en México. En ANECA. (ed). Memorias de la XVI Convención Nacional ANECA & 40th WPDC pp. 158-161. Acapulco, México.
- Lu YS, Shien YS, Tsai HJ, Tseng CS, Lee SH, Lin DF. Swollen head syndrome in Taiwan isolation of an avian pneumovirus and serological survey. Avian Pathol. 1994; 23(1): 169-174.
- Majó N, Allan GM, O'Loan CJ, Pages A, Ramis AJ. A sequential histopathologic and immunocytochemical study of chickens, turkey poults and broiler breeders experimentally infected with turkey rhinotracheitis virus. Avian Dis. 1995; 39(4): 887-896.
- Majó N, Giber X, Vilafranca M, O.Loan CJ, Allan GM, Costa LL, Pagès A, Ramis A. Turkey rhinotracheitis virus and *Escherichia coli* experimental infection in chickens. Histopathological, immunocytochemical and microbiological study. Vet Microbiol. 1997; 57(1): 29-40.
- Majó N, Martí M, O Loan CJ, Allan GM, Pagès A, Ramis A. Ultrastructural study of turkey rhinotracheitis virus infection in turbinates of experimentally infected chickens. Vet Microbiol. 1996; 52(1-2): 37-48.
- Marien M, Decostere A, Martel A, Chiers K, Froyman R, Nauwynck H. Synergy between avian pneumovirus and *Ornithobacterium rhinotracheale* in turkeys. Avian Pathol. 2005; 34(3): 204-211.
- McDougall JS, Cook JKA. Turkey rhinotracheitis: preliminary investigations. Vet Rec. 1986; 118(8): 206-220.
- Morley AJ, Thomson DK. Swollen head syndrome in broiler chickens. Avian Dis. 1984; 28(1): 238-243.
- Njenga MK, Lwamba HM, Seal BS. Metapneumoviruses in birds and humans. Review. Virus Res. 2003; 91(2): 163-169.
- O'Brien JDP. Swollen head syndrome in broiler breeders. Vet Rec. 1985; 117(23): 619-662.
- Ogawa A, Murakami S, Nakane T. Field cases of swollen-head syndrome in pheasants. J Jpn Vet Med Assoc. 2001; 54: 87-91.
- O.Loan CJ, Curran WL, McNulty MS. Immuno-gold labelling of turkey rhinotracheitis virus. Zentralbl Veterinarmed B. 1992; 39(6): 459-466.
- Pagès A, San Gabriel A. Consideraciones actuales del síndrome de cabeza hinchada en las aves. Medicina Veterinaria. 1990; 7: 243-250.
- Pagès A, Nogareda M, Casadevall P. Aislamiento de un virus de la rinotraqueítis del pavo (TRT) en aves reproductoras afectadas del síndrome de cabeza hinchada (SHS). Vet Rec. 1990; 7: 271-272.
- Pattison M, Chetl N, Randall CJ, Wyeth PJ. Observations on swollen head syndrome in broiler and broiler breeder chickens. Vet Rec. 1989; 125(9): 229-231.
- Picault JP, Giraud P, Drouin P, Guittet M, Bennejean G, Lamande J, Toquin D, Gueguen C. Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen head syndrome. Vet Rec. 1987; 121(6): 135.
- Pringle CR. Virus taxonomy- San Diego 1998. Arch Virol. 1998; 143(7): 1449-1459.
- Rivera-Benítez JF, Martínez-Bautista R, Ríos-Cambre F, Ramírez-Mendoza H. Molecular detection and isolation of avian metapneumovirus in Mexico. Avian Pathol. 2014; 43(3): 217-223.
- Saif YM, Barnes H, Glisson J, Fadly A, Mc Dougald L., Swayne D. 2003. Disease of poultry. 11^o ed. Balckwell Publishing. Ames, Iowa, EE.UU. pp. 1233.
- Seal B. Matrix protein gene nucleotide and predicted amino acid sequence demonstrate that the first US avian pneumovirus isolate is distinct from European strains. Virus Res. 1998; 58(1-2): 45-52.
- Seal B. Avian pneumovirus and emergence of a new type in the United States of America. Anim Health Res Rev. 2000; 1(1): 67-72.
- Shin HJ, Cameron KT, Jacobs JA, Turpin EA, Halvorson DA, Goyal SM, Nagaraja KV, McComb B, Mahesh CK, Lauer DA, Seal BS, Njenga MK. Molecular epidemiology of subtype C avian pneumovirus isolated in the United States and comparison with subgroups A and B viruses. J Clin Microbiol. 2002b; 40: 1687-1693.
- Shin HJ, Njenga MK, McComb B, Halvorson DA, Nagaraja KV. Avian pneumovirus RNA from wild and sentinel birds in the US has genetic homology with APV isolates from domestic turkeys. J Clin Microbiol. 2000a;38(11): 4282-84.
- Shin H J, Nagaraja KV, McComb B, Halvorson DA, Jirjis FF, Shaw DP, Seal BS, Njenga MK. Isolation of avian pneumovirus from mallard ducks that is genetically similar to viruses isolated from neighbouring commercial turkeys. Virus Res. 2002a; 83(1-2): 207-212.
- Tanaka M, Takuma H, Kokumai N, Oishi E, Obi T, Hiramatsu K, Shimizu Y. Turkey rhinotracheitis virus isolated from broiler chickens with swollen head syndrome in Japan. J Vet Med Sci. 1995; 57(5): 939-941.
- Toquin D, Bayon-Auboyer MH, Eterradosi N, Morin H, Jestin V. Isolation of a pneumovirus from a Muscovy duck. Vet Rec. 1999; 145(23): 680.
- Uriarte J, Corva S, Origlia J, Gornatti D, Píscopo M, Cerdá R, Herrero M, Marcantoni H, Unzaga MF, Spinsantti E, Marino F, Pecoraro M, Petruccelli M. Evidencia serológica de infección por metapneumovirus en aves comerciales de las Provincias de Buenos Aires y Entre Ríos (Argentina). Analecta Vet. 2010; 30(2): 2-7.
- Uriarte J, Suzuki K, Origlia J, Gornatti D, Píscopo M, Cerdá R, Herrero M, Marcantoni H, Unzaga MF, Spinsantti E, Marino F, Pecoraro M, Corva, Petruccelli M. Stochastic estimation of seroprevalence against *Ornithobacterium rhinotracheale* and avian pneumovirus among chickens in Argentina. Int J Poult Sci. 2010; 9(4): 352-356.
- Van den Hoogen BG, Bestebroer TM, Osterhaus ADME, Foucher RAM. Analysis of genome sequence of human

M.N. Arias y col.

metapneumovirus. *Virology*. 2002; 295(1): 119-132.

Van den Hoogen BG, de Jong JC, Groen J, Kuiken T, de Groot R, Fouchier RAM, Osterhaus DME. A newly discovered human pneumovirus isolated from young children with respiratory tract disease. *Nat Med*. 2001; 7(6): 719-724.

Van Loock M, Loots K, Van de Zande S, Van Heerden M, Nauwynck H, Goddeeris BM, Vanrompay D. Pathogenic interactions between *Chlamydophila psittaci* and avian pneumovirus infections in turkeys. *Vet Microbiol*. 2006; 112(1): 53-63.

Velayudhan BT, Nagaraja KV, Thachil AJ, Shaw DP, Gray GC, Halvorson DA. Human metapneumovirus in turkey poults. *Emerg Infect Dis*. 2006; 12(12): 1853-1859.

Welchman DB, Bradbury JM, Cavanagh D, Aebischer NJ. Infectious agents associated with respiratory disease in pheasants. *Vet Rec*. 2002; 150(21): 658-64.

Wyeth PJ, Gough RE, Chettle N, Eddy R. Preliminary observations on a virus associated with turkey rhinotracheitis. *Vet Rec*. 1986; 199(6): 139.

Chicken erythrocyte Invasion Capability of a *Mycoplasma synoviae* Strain isolated in Argentina

Capacidad de invasión de los eritrocitos de pollo de una cepa de *Mycoplasma synoviae* aislada en Argentina

Uriarte J^{1,2,3*}, Cerdá R^{1,2}, Stanchi N^{1,3}

¹Cátedra de Microbiología, Facultad de Ciencias Veterinarias UNLP. La Plata. Buenos Aires. Argentina.

²ECO Animal Health. London. UK. ³Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Católica de Cuyo. San Luis.

*Autor correspondiente. Correo electrónico del autor: javieruriarte@fcv.unlp.edu.ar

Abstract: *Mycoplasma synoviae* is one of the most important pathogens in poultry industry and often causes diseases of a chronic and persistent nature. Little is known about the mechanisms of persistence in the host and the strains differ significantly in invasiveness and pathogenicity. A recent study demonstrated the capacity of *M. synoviae* to invade chicken erythrocytes (CER). The aim of this study was to determine whether a field *M. synoviae* strain isolated from an Argentinean laying hen farm has the same cell invasiveness capacity. The test used for this purpose was the gentamicin invasion assay. Samples of chicken erythrocytes *in vitro* infected with the *M. synoviae* field strain and control infective strains (*M. synoviae* WVU 1853 and *M. gallisepticum*, 14102) were taken 2, 4 and 24 hours after infection, inoculated in Frey broth with or without gentamicin, plated in Frey agar and incubated at 37 °C for 4-6 days. *M. gallisepticum* 14102 treated with gentamicin grew well in the agar plates after 2 hours of infection. *M. synoviae* WVU 1853 and *M. synoviae* field strain treated with gentamicin grew in the agar plates after 24 hours of inoculation. It is very likely that the strains recovered from the infected chicken cells had invaded the erythrocytes and escaped the mycoplasmacidal effect of gentamicin. This study provides the first evidence of nonphagocytic cell invasion capability of a *M. synoviae* strain isolated in Argentina.

Keywords: *Mycoplasma synoviae*, cell invasion, chicken erythrocytes.

Resumen: *Mycoplasma synoviae* es uno de los patógenos más importantes en la industria de aves de corral y a menudo causa enfermedades de naturaleza crónica. Poco se sabe acerca de los mecanismos de persistencia en el hospedador y las cepas difieren significativamente en la invasividad y patogenicidad. Un estudio reciente demostró la capacidad de *M. synoviae* para invadir los eritrocitos de pollo (CER). El objetivo de este estudio fue determinar si una cepa de campo de *M. synoviae*, aislada de una granja de gallinas de postura de la Argentina, tiene la misma capacidad de invasión celular. La prueba utilizada para este fin fue el ensayo de invasión de gentamicina. Muestras de eritrocitos de pollo, infectadas *in vitro* con la cepa de campo de *M. synoviae* y con cepas de referencia como controles positivos (*M. synoviae* WVU 1853 y *M. gallisepticum* 14102), se tomaron 2, 4 y 24 horas después de la infección, se inocularon en caldo Frey con o sin gentamicina, se plaquearon sobre agar Frey y se incubaron a 37 °C durante 4-6 días. La cepa de *M. gallisepticum*, 14102 tratada con gentamicina desarrolló bien en las placas de agar 2 horas después de la inoculación. La cepa de *M. synoviae* WVU 1853 y la cepa de campo tratadas con gentamicina desarrollaron en las placas de agar después de 24 horas de la infección. Es muy probable que las cepas recuperadas de las células de pollo infectadas invadieran los eritrocitos y escaparan al efecto micoplasmacida de la gentamicina. Este estudio proporciona la primera evidencia de la capacidad de una cepa de *M. synoviae* aislada en la Argentina para invadir células no fagocíticas.

Palabras clave: *Mycoplasma synoviae*, invasión celular, eritrocitos de pollo.

Introduction

Mycoplasma synoviae is one of the most important pathogens in poultry worldwide. Infection may produce a disease that ranges from subclinical to severe. Clinical manifestations vary depending on the strain, and some appear to have a greater tropism for the synovial membranes or the respiratory tract than others (Kleven *et al.*, 1975). Adhesion of mycoplasma to epithelial cells by specific cytodhesins is considered to be the first step in pathogenesis and has been mainly studied in relation to the respiratory tract epithelium (Bencina D., 2002; Narat *et al.*, 1998). In a recent study (May *et al.*, 2007), the sialidase activity of different *M. synoviae* strains has been evaluated as a virulence factor associated to strain invasiveness of the host. In agreement with its pathogenic profile, two *M. synoviae* strains isolated from chicken farms in Argentina had high sialidase activity (Cerdá *et al.*, 1998).

Evasion from the immune system by changing surface proteins has been studied in *M. synoviae* as well as in many other *Mycoplasma* species as a mechanism of persistence in the host (Noormohammedi *et al.*, 2000; Winner *et al.*, 2003). More recently, nonphagocytic cell invasion capability has been found in *M. gallisepticum* and *M. synoviae* as another way of host defense evasion and persistence in the host (Much *et al.*, 2002; Dusanic *et al.*, 2009). The aim of the present study was to determine if a *M. synoviae* strain isolated in Argentina from a laying hen farm, in which hens were severely affected with clinical signs of synovitis, have comparatively the same capacity to invade chicken erythrocytes as the one of a reference *M. synoviae* strain.

Materials and Methods

Mycoplasma cultures

M. synoviae reference strain WVU 1853, *M. gallisepticum* strain 14102 and a *M. synoviae* strain JR2010 isolated in Argentina from a laying hen farm located in Buenos Aires province were used. Prior to the cell infection, mycoplasma cultures were grown at 37 °C in Frey's broth until reaching a mid-exponential phase, as indicated by the metabolic color change of the medium (phenol red). The number of viable mycoplasmas in the suspension was determined by plating ten fold serial dilutions on Frey's agar plates, followed by incubation at 37 °C for 4 to 6 days.

Chicken red blood cells

Blood samples were taken from adult specific pathogen-free chickens and mixed with EDTA. Chicken erythrocytes (CER) were separated from the collected blood by adding sterile phosphate buffer saline (PBS)

pH 7.4 and centrifugation at 400 g for 10 min. CER were washed 3 times in PBS and were re-suspended in PBS to a final concentration ranging from 5×10^5 to 10^6 cells/ml.

Determination of the Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC) of gentamicin

The susceptibility of the mycoplasma strains to gentamicin was determined by inoculating 25 µl samples of each mycoplasma cultures (10^5 to 10^6 CFU/sample) into 100 µl of Frey's broth containing two fold serial dilutions of a gentamicin solution into a u-bottom 96 wells plate. After 24 hours of incubation at 37 °C, the MIC was calculated as the minimum dilution of antibiotic that avoid the culture to grow. To determine the MBC of gentamicin for each strain, 10 µl of each non growing dilution of the broth was inoculated in agar plates without gentamicin and the plates were incubated at 37 °C for 4 to 6 days.

Experimental infection of chicken erythrocytes (CER)

The mycoplasma strains used for the infections were incubated until they reached the late logarithmic phase of growth 100 µl of broth containing 10^7 to 10^8 CFU were used to inoculate 1 ml ($5-6 \times 10^5$ cells) of CER samples suspended in Frey's broth. The multiplicity of infection (MOI) ranged from 10 to 100 mycoplasmas per chicken cell. CER infected with mycoplasma and uninfected samples of CER were used as negative controls. All CER samples were incubated at 37-38 °C.

Gentamicin invasion assay

The presence of intracellular mycoplasmas inside chicken erythrocytes was determined using the gentamicin invasion assay described by Winner *et al.* (2000) and Vogl *et al.* (2008). This assay is based on the inability of gentamicin to cross eukaryotic cell membranes exerting its antibiotic activity only against extracellular mycoplasmas. Briefly, 2-4 and 24 hours after infection, the content of each selected well was centrifugated for 10 min at 300 g. Then the pellets were re-suspended either in 1 ml of Frey's broth without gentamicin, or in 1 ml of Frey's broth supplemented with 1,000 µg gentamicin (concentration more than 4 times up the MBC). Cells were re-suspended several times during the 4 h of incubation at 37 °C. After treatment, the cell suspensions were washed three times with PBS pH 7.4. The infected cells treated with gentamicin were re-suspended in approximately 150 µl of Frey's broth and 20 µl of samples were plated

onto Frey's agar and incubated at 37 °C. The infected cells, which were not treated with gentamicin were re-suspended in 1.5 ml of Frey's broth and plated as described above. Uninfected cells were incubated in Frey's broth in the same way as the infected cells and were used as negative controls. After 4-6 days, mycoplasma colonies on the plates were identified and counted.

Results and Discussion

In agreement with previous reports, *M. gallisepticum* strain 14102 was found viable into the erythrocytes treated with gentamicin after two hours of infection (Vogl *et al*, 2008) (Figure 1). However, *M. synoviae* WVU 1853 (Figure 2) was viable in erythrocytes only after 24 hours of infection (Figure 3), much

Table 1. Results of the cell infection with different mycoplasma strains.

Strains	MBC (µg/ml)	Growth 2hours		Growth 4 hours		Growth 24 hours	
		PI		PI		PI	
		CER	CER + Gen	CER	CER + Gen	CER	CER + Gen
<i>M. synoviae</i> wvu 1853	125	+	-	+	-	+	+
<i>M. synoviae</i> JR2010	125	+	-	+	-	+	+
<i>M. gallisepticum</i> 14102	250	+	+	+	+	+	+

PI: Post Infection; CER: Chicken Erythrocytes; GEN: Gentamicin; MBC: Minimal Bactericidal Concentration for gentamicin.

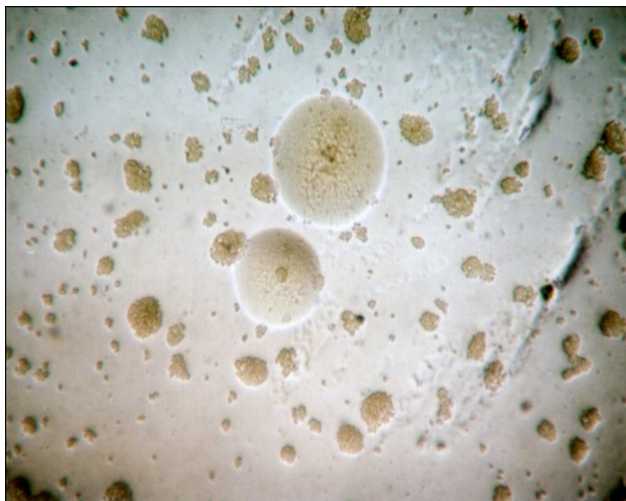


Figure 1. *M. gallisepticum* colonies 2 hours PI (CER+GEN).



Figure 2. *M. synoviae* wvu 1853 colonies 4 hours PI (CER).



Figure 3. *M. synoviae* wvu 1853 colonies 24 hours PI (CER+GEN).

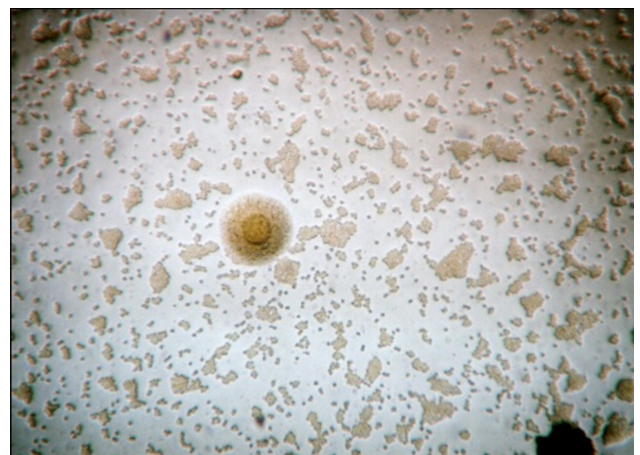


Figure 4. *M. synoviae* field strain colonies 24 hours PI (CER+GEN).

later than the lapse of time observed by Dusanic *et al* (3 hours after infection) (Table 1). These differences could be explained by the number of laboratory passages to which reference strains were subjected. The *M. synoviae* JR2010 field strain showed the same invasiveness behavior as the reference strain (Figure 4). Considering the fact that in the present study more than 4 times of the usual gentamicin concentration was used in the MBC test to kill the extracellular mycoplasma cells, it is very likely that the *M. gallisepticum* and *M. synoviae* organisms recovered from the infected chicken cells had invaded the erythrocytes and escaped from the mycoplasmacidal effect of the antibiotic. The results provided in this study are consistent with the data published on the ability of *M. synoviae* to *in vitro* invade CER (Dusanic *et al.*, 2009), and is the first report on this subject in a strain isolated in Argentina. Further studies will be conducted to evaluate *in vivo* this invasiveness behavior with other field isolates as well as to study the antibiotic effectiveness in infected CER.

Conclusions

This *in vitro* study provides the first evidence that a *M. synoviae* strain isolated in Argentina is able to penetrate inside chicken erythrocytes. This finding, together with the sialidase activity described before (Cerdá *et al*, 1998) on strains isolated from the same country, may contribute to understand the virulence of this mycoplasma species in the region. The advantage of entering into erythrocytes might be not only a mechanism to reach new sites of infection, but also to escape from the immune system of the host and avoid the contact with specific antibiotics.

Conflict of interest

All authors declare that there are not conflict of interests, including financial, personal or other relationships with other people or organizations that could inappropriately influence the work.

References

- Bencina D. Haemagglutinins of pathogenic avian mycoplasmas. *Avian Pathol.* 2002; 31(6):535-47.
- Cerdá RO, Xavier JA, Petrucelli MA, Etcheverrygaray ME. Aislamiento de *Mycoplasma synoviae* de pollos parrilleros y gallinas reproductoras. Primera comunicación en la República Argentina. *Analecta Vet.* 1998; 18(5):41-6.
- Dusanic D, Bercic RL, Cizelj I, Salmic S, Narat M, Bencina D. *Mycoplasma synoviae* invades non-phagocytic chicken cells *in vitro*. *Vet Microbiol.* 2009; 138:114-9.
- Kleven SH, Fletcher OJ, Davis RB. Influence of strain of *Mycoplasma synoviae* and route of infection on development of synovitis or airsacculitis in broilers. *Avian Dis.* 1975; 19:126-35.
- May M, Kleven S, Brown D. Sialidase activity in *Mycoplasma synoviae*. *Avian Disease.* 2007; 51: 829-33.
- Much P, Winner F, Stipkovits L, Rosengarten R, Citti C. *Mycoplasma gallisepticum*: Influence of cell invasiveness on the outcome of experimental infection in chickens. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2002 34(3): 181-6
- Narat M, Bencina D, Kleven SH, Habe F. The hemagglutination positive phenotype of *Mycoplasma synoviae* induces experimental infectious synovitis in chickens more frequently than does the hemagglutination-negative phenotype. *Infect Immun.* 1998; 66(12):6004-9.
- Noormohammadi AH, Markham PF, Kanci A, Whithear KG, Browning GF. A novel mechanism for control of antigenic variation in the haemagglutinin gene family of *Mycoplasma synoviae*. *Molecular Microbiol.* 2000; 35: 911-23.
- Vogl G, Plaickner A, Szathmary S, Stipkovits L, Rosengarten R, Szostak MP. *Mycoplasma gallisepticum* invades chicken erythrocytes during infection. *Infect Immun.* 2008; 76(1): 71-7.
- Winner F, Rosengarten R, Citti C. *In vitro* cell invasion of *Mycoplasma gallisepticum*. *Infect Immun.* 2000; 68(7): 4238-44.
- Winner F, Markova I, Much P, Lugmair A, Siebertgulle K, Vogl G, Rosengarten R, Citti C. Phenotypic switching in *Mycoplasma gallisepticum* hemadsorption is governed by a high frequency, reversible point mutation. *Infect and Immun.* 2003;71: 1265-73.

Poliartritis asociada a hepatozoonosis canina: descripción de un caso

Polyarthritis Associated to Canine Hepatozoonosis: a Case Report

Iveli S^{*1}, Casas L¹, Machuca M², Eiras D^{3,4}, del Amo A⁵

¹Actividad Privada, ²Laboratorio de Patología Especial Veterinaria, ³Laboratorio de Inmunoparasitología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata ⁴Laboratorio DIAP, Pueyrredón 1098, Banfield, Buenos Aires, Argentina. ⁵Cátedra de Semiología.

Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de La Plata. Argentina.

*Autor correspondiente. Correo electrónico del autor: sebaiveli@hotmail.com

Resumen: El objetivo de este trabajo fue describir un caso de poliartritis asociada a *Hepatozoon canis* en un canino, mestizo, macho, de 5 meses de edad. El paciente presentaba fiebre (40,1 °C), mucosas pálidas, linfonódulos superficiales ligeramente aumentados de tamaño, dolor lumbar, aumento de tamaño de varias articulaciones y abundantes garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*). En los extendidos sanguíneos se constató la presencia de gamontes de *Hepatozoon* sp. en el citoplasma de los neutrófilos. El estudio citológico del líquido sinovial reveló la presencia de abundantes macrófagos y neutrófilos segmentados, sugiriendo un proceso inflamatorio aséptico. Mediante el uso de técnicas de biología molecular se identificó al agente como *H. canis*. Estos hallazgos, sumados a la presencia de merontes en la cápsula articular, permiten relacionar la hepatozoonosis canina por *H. canis* con el cuadro clínico de poliartritis.

Palabras clave: *Hepatozoon canis*, poliartritis, canino.

Abstract: The aim of this study was to describe a case of polyarthritis associated to *Hepatozoon canis* in a five-month-old mixed breed male dog. The following alterations were observed: elevated rectal body temperature (40.1 °C), pale mucous membranes, mild superficial lymphadenomegaly, lumbar pain, enlargement of several joints and a great amount of ticks (*Rhipicephalus sanguineus*). Neutrophils parasitized by gamonts of *Hepatozoon* sp. were detected in blood smears. Synovial fluid samples exhibited a great number of macrophages and segmented neutrophils, indicating a non-suppurative inflammatory process. Using molecular techniques the agent was identified as *H. canis*. These findings, added to the presence of meronts of *Hepatozoon* sp. in the articular capsule, suggest a relationship between *H. canis* and polyarthritis.

Key words: *Hepatozoon canis*, polyarthritis, dog.

Introducción

Las enfermedades articulares inflamatorias en el perro se deben generalmente a procesos infecciosos o inmunomediados (Merich Taylor 2000). La artritis infecciosa puede ser causada por bacterias (rickettsias como *Ehrlichia canis*, micoplasmas y espiroquetas), hongos y virus. Las bacterias son los agentes infecciosos más comunes. Las artritis fúngicas, virales y por protozoarios (principalmente *Leishmania chagasi infantum*) son poco frecuentes y, por lo general, se asocian con alteraciones que acompañan a otros desórdenes sistémicos (Greene y Budsberg 2008).

La hepatozoonosis canina es una enfermedad transmitida por garrapatas y causada por protozoos del género *Hepatozoon*. Además de la transmisión vectorial, se ha descrito la transmisión horizontal de la madre a la crías (Greene y Budsberg 2008; Baneth et al 2008). La especie reportada en Europa, Asia, África y Sudamérica es *Hepatozoon canis* (Gonen et al 2004, Perez Tort et al 2007), cuyo hospedador definitivo es la garrapata marrón del perro *Rhipicephalus sanguineus*. La distribución geográfica es, en esencia, la del hospedador definitivo. Los hospedadores intermediarios incluyen al perro y a otros mamíferos silvestres como chacales, zorros, coyotes, hienas y felinos africanos (Baneth et al 2008; Georgi y Georgi 1994). Los casos descritos en perros en el sur de EEUU se deben a una especie más patógena, denominada *Hepatozoon americanum* (Vincent-Johnson et al 1997), transmitida por la garrapata de la costa del Golfo, *Amblyomma maculatum* (Ewing y Panciera 2003).

La hepatozoonosis canina producida por *H. canis* es una enfermedad compleja que requiere de diversas condiciones relacionadas con la inmunocompetencia del animal, además de la presencia del ectoparásito, para inducir el síndrome clínico (Baneth et al 2008). La mayoría de los perros afectados presentan infección subclínica (Merich Taylor 2000) y la aparición de signos clínicos se encuentra relacionada con la cantidad de parásitos circulantes en la sangre (Eiras et al 2010). Los perros con afección clínica usualmente son jóvenes o inmunodeficientes (Merich Taylor 2000) y los signos clínicos que se observan con mayor frecuencia son fiebre, anemia y emaciación (Greene y Budsberg 2008). Muchos perros presentan, además, descarga óculo-nasal purulenta, rigidez muscular y, en los casos debidos a *H. americanum*, dolor localizado en los miembros y columna lumbar (Taborda y Merchant 1997). Algunos autores han observado otras manifestaciones, tales como diarrea, anorexia y paraparesia. Si bien el curso de la enfermedad suele ser prolongado, los signos clínicos pueden ser intermitentes. Algunos perros experimentan períodos de recuperación antes de la recurrencia. Asimismo, también puede esperarse una remisión espontánea (Baneth et al 2008; Taborda y Merchant 1997).

Las fases tisulares de *H. canis* inducen inflamación piogranulomatosa y/o necrosis en diferentes órganos, responsables de la enfermedad clínica (Merich Taylor 2000). Además, como consecuencia de la afección crónica, puede depositarse sustancia amiloide en múltiples órganos y, en casos más severos, se ha podido observar vasculitis y glomerulonefritis, lo que sugiere la participación de complejos inmunitarios como consecuencia de la infección (Baneth et al 2008).

En nuestro país, la hepatozoonosis canina está descrita desde 1999 y la confirmación molecular de la enfermedad producida por *H. canis* se realizó unos años después en perros de la provincia de Buenos Aires (Eiras et al 2007, Perez Tort y Petetta 2012). Desde ese entonces, la infección ha sido detectada en muchas provincias argentinas y aparece con elevada prevalencia durante los meses cálidos del año (Eiras et al 2010, Perez Tort y Petetta 2012).

Caso clínico

Se presentó a la consulta un canino, mestizo, macho, de 5 meses de edad con decaimiento y dolor generalizado de 24 horas de evolución. Durante el examen físico, los hallazgos fueron: temperatura rectal de 40,1 °C, mucosas pálidas, linfonódulos superficiales ligeramente aumentados de tamaño y presencia de abundantes garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*). El animal manifestaba intenso dolor en la palpación-presión de la región lumbar. No se observaron alteraciones en los estudios radiográficos de la columna lumbar. El paciente fue medicado con tramadol (1 mg/kg/PO c/8 h, durante 48 h), amoxicilina (20 mg/kg/PO/ c/12 h, durante 10 d) e ivermectina, exhibiendo una mejoría clínica. Durante el control (20 días posteriores a la primera consulta), el cachorro manifestó dolor muy marcado en ambas articulaciones escapulo-humerales, hallándose la articulación izquierda aumentada tres veces su tamaño (Figura 1). También estaban afectadas las articulaciones humerorradiocubitales, coxofemorales y femorotibiorrotulianas (Figura 2). Se extrajo sangre de la vena cefálica con y sin anticoagulante (EDTA) para la realización de estudios hematológicos y bioquímicos de rutina. Además, se confeccionaron extendidos sanguíneos para la búsqueda de patógenos (mórulas de *Ehrlichia* o merozoitos de piroplasmas) con sangre periférica del pabellón auricular. Se extrajo una muestra del líquido sinovial, mediante aspiración con aguja fina (AAF) de la articulación coxofemoral izquierda, para estudio citológico. Durante la extracción se observó que el volumen estaba aumentado, el color era amarillo amarillento (xantocromía por hemorragia previa) y la viscosidad estaba disminuida (hallazgo frecuente en la inflamación intraarticular intensa) (Figura 3). En el

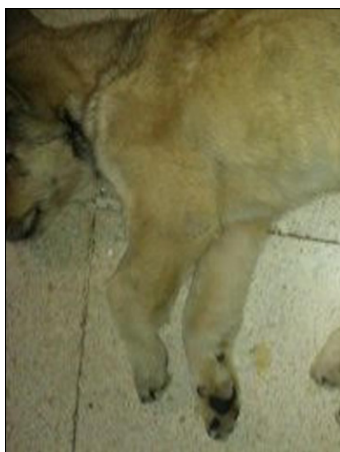


Fig. 1. Articulación escapulo-humeral izquierda aumentada de tamaño.



Fig. 2. Articulaciones coxo-femoral y femoro-tibio-tarsal izquierdas aumentadas de tamaño.



Fig. 3. Abundante líquido sinovial amarillo ambarino.

estudio citológico del líquido se hallaron abundante cantidad de macrófagos y polimorfonucleares neutrófilos segmentados, compatibles con un proceso inflamatorio aséptico. Los resultados del análisis clínico de la sangre fueron: hematocrito 17 % (ref. 37-55), hemoglobina 5,1 g/dl (ref. 12-18), eritrocitos 2,3 millones/ μ l (ref. 5,5-8,5), albúmina 1,92 g/dl (ref. 2,3-3,8), globulinas 4,31 g/dl (ref. 3-4,1), relación A/G 0,44 (ref. 0,6-1,1) y presencia de abundantes gamontes de *Hepatozoon sp.* dentro de los neutrófilos. Con el diagnóstico de hepatozoonosis, se indicó un protocolo combinado de toltrazuril 20 mg/kg/c24 h/PO, durante 7 días y sulfadimetoxina 40mg/kg/c12 h/PO, durante 15 días. Se realizó, además, una transfusión sanguínea que generó el aumento del hematocrito. El tratamiento logró reducir la tumefacción articular y disminuir el dolor. Quince días después, el animal se presentó a la consulta con decaimiento, vómitos, deshidratación y diarrea con hematoquesia. El paciente murió 12 h después. En la necropsia se observaron edema subcutáneo, congestión y edema pulmonar, intususcepción en el tercio distal del intestino delgado y congestión de la mucosa del intestino grueso con contenido sanguinolento en toda su extensión. El hígado presentó un aspecto de nuez moscada, observándose, además, linfadenomegalia generalizada y moderada renomegalia. En las articulaciones se constataron engrosamiento de la cápsula articular y abundante cantidad de líquido sinovial seroso amarillento rosado (Figura 4). Se tomaron muestras de linfonódulos, hígado, bazo, cápsula articular, hueso, riñón e intestino delgado para estudios histopatológicos. Los hallazgos fueron: linfonódulos con marcada depleción linfoidea, hepatitis con hiperplasia de células de Kupffer e infiltración de neutrófilos y células mononucleares y esplenitis con marcada depleción linfoidea e infiltración de células histiocíticas. Se observaron abundantes merontes

en diversos estadios de desarrollo en linfonódulos, hígado y bazo (Figura 5). En el riñón se observó glomerulonefritis y en el intestino delgado enteritis necrótica superficial y presencia de un meronte. En el hueso no se observaron lesiones. En la cápsula articular se constataron infiltración de células mononucleares y abundantes merontes inmaduros (Figura 6). Se realizó el estudio molecular para la identificación y tipificación del agente. Se utilizó el kit QIAamp DNA FFPE *tissue* (QIAGEN, Alemania) para la extracción de ADN de las muestras de linfonódulos y de cápsula articular que habían sido embebidas en parafina y procesadas para su estudio histopatológico. Del ADN extraído se amplificó, mediante PCR, un fragmento de aproximadamente 650 pares de bases correspondientes al gen 18S rRNA, utilizando los *primers* Hep1 y Hep2 en el Laboratorio de Inmunoparasitología (FCV-UNLP). El protocolo de trabajo para la amplificación mediante PCR fue: 94 °C durante 5 min, 35 ciclos de amplificación



Fig. 4. Articulación femoro-tibio-tarsal izquierda. Engrosamiento de la cápsula y de la membrana sinovial.

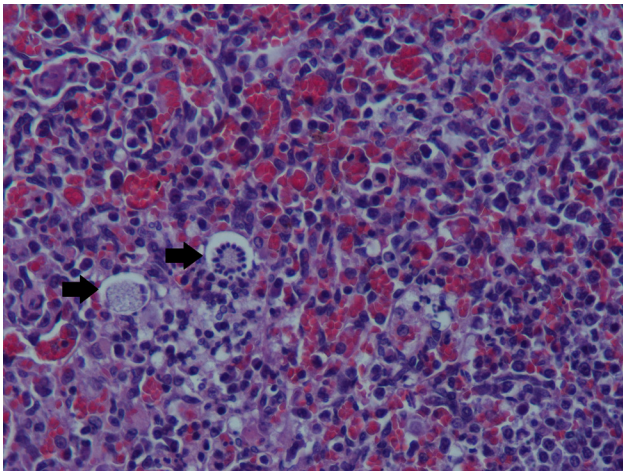


Fig. 5. Bazo con leve infiltración de células histiocíticas y merontes (→), uno con patrón clásico de “rayos de rueda”. H&E, Obj. 40X.

(94 °C durante 60 segundos, 58 °C durante 60 seg y 72 °C durante 60 seg) y 7 min a 72 °C para la extensión final. Los productos de amplificación del ADN fueron purificados y enviados al Instituto de Biotecnología (INTA- Castelar) para su secuenciación. Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la información disponible en el GENBANK mediante BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). El producto secuenciado mostró un 100 % de identidad con *H. canis*.

Discusión

En el presente trabajo se describe un caso atípico de poliartritis aséptica asociada a la infección por *H. canis*, con presencia de merontes en la cápsula articular. La confirmación de hepatozoonosis por *H. canis* en perros con afección articular asociada es un hallazgo muy poco frecuente y ha sido escasamente reportada en la literatura internacional (Bitton *et al* 2012).

En este caso se observó una parasitosis por garrapatas del género *Rhipicephalus sanguineus*, hospedador definitivo y vector de *H. canis*. Entre las alteraciones observadas, la hiperglobulinemia puede asociarse con el curso crónico de la enfermedad, debida a mecanismos inmunomediados descritos en la literatura (Greene y Budsberg 2008; Baneth y Weigler 1997). La hipoalbuminemia también ha sido descrita en la hepatozoonosis, como consecuencia de escasa síntesis hepática, anorexia y pérdida glomerular considerable debida a glomerulonefritis (Greene y Budsberg 2008; Baneth *et al* 1995). En nuestro caso, tanto el hígado como el riñón se encontraban afectados.

La detección de numerosos gamontes de *Hepatozoon* sp. en los extendidos sanguíneos permitió arribar al diagnóstico de hepatozoonosis. Éste es el método diagnóstico más efectivo y rápido para el

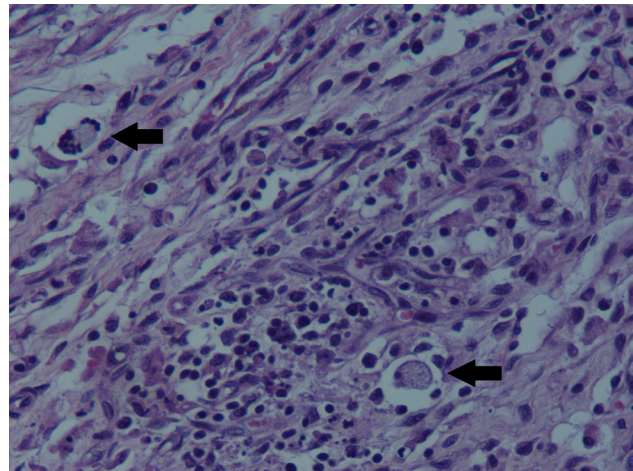


Fig. 6. Cápsula articular con moderada infiltración de células mononucleares y dos merontes (→). H&E, Obj. 40X.

diagnóstico de la infección por *H. canis*, pero no así para la infección por *H. americanum*, porque es mucho más infrecuente la detección de gamontes circulantes (Greene y Budsberg 2008).

En el estudio histopatológico de los órganos hemolinfáticos se encontraron merontes en diferentes estadios de maduración, con veinte a treinta micromerozoítos o formando la imagen típica en “rayo de rueda”. También se halló un meronte maduro en el intestino delgado. Esta localización muy poco frecuente, ya que cuando ingresan los esporozoítos, penetran la pared intestinal, invaden las células mononucleares y por vía sanguínea o linfática alcanzan los órganos hemolinfáticos, el riñón y el hígado, donde tiene lugar el proceso de reproducción asexual o merogonia.

El cuadro clínico descrito en este trabajo coincide con algunos signos descritos en la bibliografía (Merit Taylor 2000; Greene y Budsberg 2008; Tabora y Merchant 1997) para la afección por *H. canis*: fiebre, anemia, letargo y linfadenomegalia. Sin embargo el dolor lumbar que presentó el cachorro ha sido descrito y es más común en la infección por *H. americanum* (Greene y Budsberg 2008). Por tal motivo, la determinación de la especie actuante con técnicas moleculares resultó de mucha utilidad para la confirmación del diagnóstico.

La patogenia de las lesiones articulares generadas por protozoarios no está totalmente clara. Si bien, en este caso, la presencia del parásito en la cápsula articular podría explicar las alteraciones observadas, debe considerarse, también, como mecanismo de daño, el depósito de inmunocomplejos circulantes (Greene y Budsberg 2008) y otros procesos articulares de origen inflamatorio que no pudieron ser evaluados en el caso que aquí se presenta.

En conclusión, se destaca el hallazgo poco frecuente de un cuadro de poliartritis y dolor lumbar con

lesión de la cápsula articular junto con la presencia de merontes de *H. canis* y en ausencia de lesiones óseas. Resulta necesaria mayor investigación en este campo y sumar casos clínicos similares, para determinar si existe un mecanismo en el que *H. canis* puede estar directamente implicado en el proceso articular.

Declaración de conflicto de intereses

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

Bibliografía

Baneth G, Harmelin A, Presentey BZ. *Hepatozoon canis* infection in two dogs. J Am Vet Med Assoc. 1995; 206: 1891-94.

Baneth G, Weigler B. Retrospective case-control study of hepatozoonosis in dogs in Isr J Vet Intern Med. 1997; 11: 365-70.

Baneth G, Douglass K, Nancy A, Craig T. Hepatozoonosis. En: Greene CE, 2008. Enfermedades infecciosas del perro y el gato, 3° edición. Buenos Aires; Inter-médica, pp.766-73.

Bitton E, Bibring U, Bruchim Y, Baneth G. Hepatozoonosis in a dog with skeletal and joint involvement: a case report and review of the literature. Isr JVet Med. 2012; 67(2): 120-6.

Eiras DF, Basabe J, Scodellaro CF, Banach DB, Matos ML, Krimer A, Baneth G. First molecular characterization of canine hepatozoonosis in Argentina: evaluation of asymptomatic *Hepatozoon canis* infection in dogs from Buenos Aires. Vet Parasitol. 2007; 149: 275-9.

Eiras DF, Basabe J, Scodellaro CF, Fontanarrosa MF, Vezzani D, Mekuzas Y, Gonen L, Baneth G. Epidemiología de la hepatozoonosis canina en Buenos Aires (Argentina) durante el período 2002-2008. XVIII Reunión Científico-Técnica, AAVLD (Asociación Argentina de Veterinarios de Laboratorio Diagnóstico). Mercedes, Corrientes. 3, 4 y 5 de noviembre de 2010.

Ewing S, Panciera R. American canine hepatozoonosis. Clin Microbiol Rev. 2003; 16 (4): 688-97.

Georgi J, Georgi M, 1994. Parasitología en clínica canina, 1° edición. México; Interamericana-Mc Graw-Hill.

Gonen L, Straus-Ayali D, Shkap V, Vincent-Johnson N, Macintire D, Baneth G. An enzyme-linked immunosorbent assay for antibodies to *Hepatozoon canis*. Vet Parasitol. 2004; 122: 131-9.

Greene CE, Budsberg SC. Infecciones musculoesqueléticas. En: Greene CE, 2008. Enfermedades infecciosas del perro y el gato, 3° edición. Buenos Aires, Inter-médica; pp. 917-20.

Meric Taylor S. Enfermedades articulares. En: Nelson RW y Couto CG, 2000. Medicina interna de animales pequeños, 2° edición. Buenos Aires, Inter-médica; pp. 1149-55.

Pérez Tort G, Petetta L. Estudio de 50 casos de hepatozoonosis en caninos naturalmente infectados en el Gran Buenos Aires, Argentina. Vet Arg. 2012; 29 (293): 1-10.

Pérez Tort G, Petetta L, Favre M, Mas J, Robles A. Primera descripción de un brote de hepatozoonosis en un refugio

de perros y su tratamiento mediante una formulación de toltrazuril especialmente preparada para caninos. Vet Arg. 2007; 20 (235): 388-98

Taborda J, Merchant SR. Protozoosis e infecciones varias. En: Ettinger SJ y Feldman EC, 1997. Tratado de medicina interna veterinaria, enfermedades del perro y el gato. 4° edición. Buenos Aires; Inter-médica, pp.476-7.

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

Análisis automatizado de neuronas de la médula espinal mediante la utilización de tres programas de análisis de imágenes

Automatic Spinal Cord Neuronal Analysis Using Three Different Image Analysis Software Packages

Portiansky EL

Laboratorio de Análisis de Imágenes. Facultad de Ciencias Veterinarias.
Universidad Nacional de La Plata. Av. 60 y 118. (1900) La Plata. Argentina.
Correo electrónico del autor: imagelab@fcv.unlp.edu.ar

Resumen: La detección automatizada de elementos libres (microorganismos, células, minerales, etc.) no reviste la misma complejidad que la que presenta el reconocimiento y posterior análisis morfométrico de elementos inmersos dentro de un contexto, tal como células particulares dentro de un tejido. En el presente informe técnico se muestran alternativas para la identificación de neuronas presentes en la sustancia gris de un segmento de la médula espinal de rata, utilizando tres programas distintos de análisis de imágenes digitales. Se comparan los resultados y se discuten las ventajas y diferencias del procedimiento realizado con cada uno de estos programas.

Palabras clave: Identificación de células, neuronas, análisis de imágenes.

Abstract: Automated detection of free elements (microorganisms, cells, minerals, etc.) does not have the same complexity as that necessary to recognize and subsequently morphometrically analyse elements involved in a context such as particular cells within a tissue. In this technical report, alternatives for the identification of neurons in the gray matter of a rat spinal cord segment using three different digital image analysis software packages are described. The results are compared and the advantages and differences of the performed procedures are discussed.

Keywords: Identification of cells, neurons, image analysis.

Introducción

Existen decenas de tutoriales que muestran cómo contar partículas en una imagen digital (Cheng 2011; Bruhemaayush 2012; Foley 2013). Más aún, existen programas macro y complementos (*plug-ins*) específicamente diseñados para el recuento de elementos con determinadas características, que sólo operan sobre determinado tipo de imágenes (Kuo y Byun 2011). Para el uso de estos últimos también existen tutoriales de acceso libre (CELT 2011). La gran mayoría de los tutoriales utiliza el programa ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>) para su demostración, ya que es de distribución libre y aceptado por la comunidad científica internacional. Este programa cuenta con un manual, donde sólo se explican las funciones de la aplicación para el recuento de partículas, pero no cómo lograr los resultados deseados. La mayoría de los ejemplos que se aprecian en los tutoriales están orientados al reconocimiento de células aisladas o de partículas diminutas dentro de células. Esto presenta la ventaja de la relativa sencillez en la identificación de las estructuras, lo que permite el posterior recuento y caracterización morfométrica.

En muchas circunstancias, es necesario identificar células particulares presentes en un determinado tipo de tejido. Para ello, se recurre a la tinción diferencial utilizando técnicas histoquímicas (Portiansky *et al* 2006), inmunohistoquímicas (Fontana *et al* 2009) o inmunofluorescentes (Portiansky *et al* 2011). Si bien la forma más apropiada para la identificación específica de un tipo celular es mediante la utilización de técnicas que involucren la utilización de anticuerpos, no siempre se consiguen los efectos deseados (Nishida *et al* 2015). En estos casos, la identificación de las poblaciones celulares se realiza por particularidades en el color y/o la intensidad de tinción y por sus características morfométricas.

Como se mencionara previamente, ImageJ es un programa universalmente reconocido que cuenta con herramientas para la identificación de partículas y su posterior análisis. Existen otros programas, de carácter comercial, que también permiten la identificación, recuento y análisis de elementos presentes en imágenes digitales. En el presente informe técnico se muestran los procedimientos necesarios para la identificación de neuronas de un segmento de la médula espinal de la rata, utilizando una misma imagen en tres programas de análisis diferentes.

Descripción metodológica

Software utilizado

*ImageJ, (v.1.49n, *National Institutes of Health*, EE.UU.), para una plataforma de 64 bits. Este programa es de distribución gratuita y se puede descargar

a través de la página web: <http://imagej.nih.gov/ij/download.html>

*cellSens Dimension (v. 1.6, *Olympus Corporation*, Japón). Programa comercial.

*ImagePro plus (v. 6.3.1, *Media Cybernetics*, EE.UU.). Programa comercial.

Captura de la imagen

El segmento C6 extraído de la médula espinal de una rata macho clínicamente sana, de 5 meses de edad, fue sumergido en una solución criopreservante, luego de su perfusión con una solución salina de paraformaldehído al 4 %, hasta su utilización. Se realizaron cortes coronales del mencionado segmento utilizando un micrótopo de vibración (Leica VT 1000S, Alemania). Los cortes fueron montados sobre portaobjetos y teñidos mediante la técnica del violeta de cresilo, coloración utilizada para el reconocimiento de estructuras nerviosas (Suvarna *et al* 2012).

Para la captura de la imagen se utilizó el programa cellSens, ya que controla la platina motorizada (Prior H101AFI, EE.UU.) montada sobre un microscopio de investigación (Olympus BX53, Japón). La imagen digital fue capturada mediante una cámara digital (Olympus DP71, Japón) también controlada mediante el mismo *software*. Para la composición de una imagen que contuviera la totalidad del segmento, al utilizar un objetivo de 40X (NA 0,75), se activó la función *Multiple Image Alignment* (MIA), en modo automatizado, lo que permitió el desplazamiento de la platina motorizada en un área de 5,5 mm². De esta manera, se capturaron, de manera secuencial en X e Y, aproximadamente 140 imágenes, las que fueron alineadas para reproducir la totalidad de la muestra. Previo a la captura de las imágenes, se tuvo particular precaución en establecer una iluminación de la muestra de manera tal de generar el mayor de los contrastes entre el tejido, las células y el fondo de la misma, para evitar posteriores requerimientos de procesamiento de la luz.

Secuencia de eventos para la cuantificación y medición de neuronas

A continuación se muestran las animaciones realizadas mediante AdobeTM Captivate 7 (*Adobe Systems Incorporated*, EE.UU.), correspondientes a la identificación, recuento y análisis morfométrico de las neuronas presentes, utilizando los programas ImageJ ([link 1](#)), ImagePro Plus ([link 2](#)) y cellSens Dimension ([link 3](#)).

Para el recuento y análisis de neuronas utilizando ImageJ se realizaron los siguientes pasos:

1. Calibración espacial de la muestra, basada

en la barra incluida dentro de la imagen.

2. Establecimiento del umbral de color (segmentación) para su posterior binarización.
3. Binarización.
4. Selección de los parámetros a ser medidos.
5. Establecimiento de los límites de valores para los parámetros seleccionados.
6. Recuento.
7. Almacenamiento de los datos en un administrador de regiones de interés (*ROI Manager*).
8. Traspaso de los resultados a una planilla de cálculo.

Para el recuento y análisis de neuronas utilizando ImagePro Plus se realizaron los siguientes pasos:

1. Si la imagen hubiese sido capturada mediante este software, probablemente ya hubiese estado calibrada espacialmente de acuerdo con el objetivo utilizado, ya que este programa tiene la capacidad de controlar el microscopio. De no estarlo, se deberá proceder como en el punto 1 del listado correspondiente a ImageJ.
2. Segmentación de los objetos. Para ello se seleccionan los límites de color de los objetos problema (neuronas).
3. Selección de los parámetros a ser medidos y establecimiento de sus límites.
4. Recuento.
5. Traspaso de los resultados a una planilla de cálculo.

Para el recuento y análisis de neuronas utilizando cellSens Dimension se realizaron los siguientes pasos:

1. Al estar la imagen capturada mediante este software, no fue necesario calibrarla. De lo contrario, hubiese sido necesario proceder como en el punto 1

del listado correspondiente a ImageJ.

2. Selección de los parámetros a ser medidos.
3. Establecimiento de los límites de valores para los parámetros seleccionados.
4. Segmentación de los objetos. Para ello se seleccionan los límites de color de los objetos problema (neuronas).
5. Recuento.
6. Traspaso de los resultados a una planilla de cálculo.

Los parámetros para la identificación de las neuronas, así como el rango de valores elegidos, fueron seleccionados sobre la base de trabajos previamente publicados (Portiansky *et al* 2004; Portiansky *et al* 2011). Para la selección de los objetos a ser cuantificados, en todos los casos se utilizó el método de segmentación por color. Con ImageJ, se utilizó el sistema de color HSB (*Hue, Saturation, Brighthness*), que es un sistema llamado "cilíndrico" por su forma de representación (Portiansky 2013). Con los programas comerciales se utilizó el sistema RGB (*Red, Green, Blue*). En ambos casos se utilizó el sistema de gotero, en el que el profesional selecciona las intensidades de color que considera que se corresponden con las estructuras a analizar. También puede utilizarse el histograma de la imagen para conseguir el mismo propósito. En este último caso hubiese sido necesario establecer el rango de cada uno de los colores del RGB, a diferencia del HSB que selecciona los colores sólo con el canal H.

Independientemente de la forma en que el software selecciona los colores, en los tres programas se utilizó un método intuitivo de selección y, por lo tanto, el criterio de selección fue similar en todos los casos. La figura 1 muestra el efecto producido al realizar la segmentación del mismo sector de la imagen con cada uno de los programas. Allí se observa que el área de color superpuesto sobre los objetos seleccionados es similar en todos los casos.

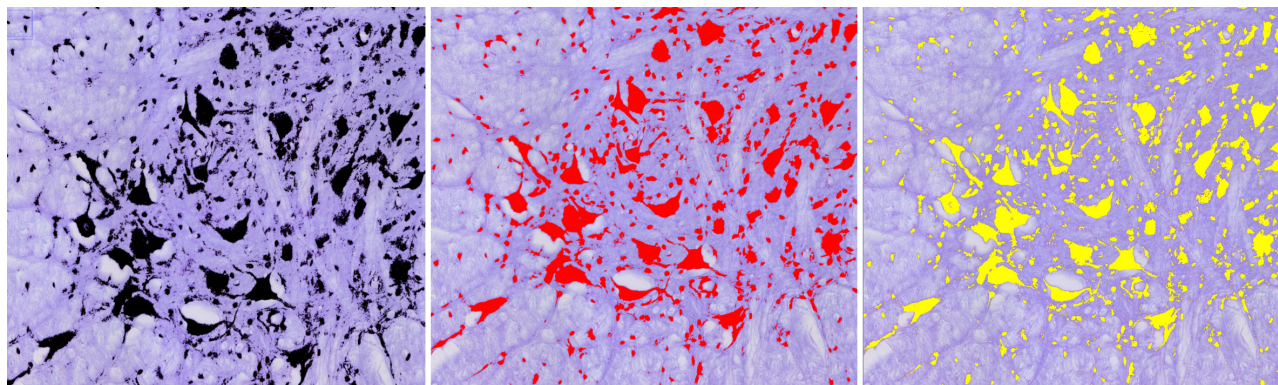


Figura 1. Efecto de la segmentación producida mediante ImageJ (izquierda), ImagePro Plus (centro) y cellSens Dimension (derecha), sobre una misma imagen del sector medular, teñido con violeta de cresilo.

La utilización del ROI Manager con ImageJ permite manejar de manera individual cada uno de los objetos encontrados. De esta manera, el operador puede seleccionar manualmente aquellas células que considere que deban o no ser incluidas en el recuento o la medición.

En el video correspondiente al programa ImagePro Plus se observa que es posible separar dos neuronas (*splitting*), consideradas como únicas al realizar el recuento automatizado. Con los programas comerciales es posible separar los objetos manualmente. Con los tres programas se puede realizar una separación automatizada basándose en el filtro Watershed (Portiansky 2013).

Discusión y conclusiones

Los tres programas de análisis permitieron resolver el desafío de reconocer las neuronas por su aspecto morfológico o por su color. Cada situación requirió, sin embargo, de una selección particular en cuanto a los rangos de valores que debieron elegirse para obtener los resultados más apropiados. Esto es válido tanto para la muestra seleccionada en el presente trabajo, como para cualquier otra muestra en la que se pretenda seleccionar objetos con determinadas características. Independientemente de cuál sea el *software* elegido, el punto crítico consiste en capturar la imagen con el mayor de los contrastes para lograr una segmentación inicial que evite el procesamiento posterior. De esta manera, se identifican los objetos y el fondo de manera independiente, hecho que facilita la posterior segmentación y análisis (Portiansky 2013).

ImageJ es un programa de análisis digital de imágenes de dominio público, diseñado con una arquitectura abierta que proporciona extensibilidad vía *plug-ins* Java y *macros* (Collins 2007). Es utilizado por cientos de investigadores y los resultados obtenidos mediante este programa son aceptados universalmente. Si bien no tiene un ambiente de trabajo propio, las funciones y aplicaciones que presenta o que se le pueden adicionar, hacen de ésta una herramienta de alto valor laboral. Por su parte, los otros dos programas analizados, que son de origen comercial, tienen su propio ambiente de trabajo. Esto implica la ventaja de poder manejar imágenes y funciones relacionadas con ellos, de manera aislada de otros utilitarios de la computadora. Sin embargo, en estos programas, las actualizaciones de las funciones sólo pueden ser provistas por los propios fabricantes del producto. Por otro lado, la versatilidad de estos programas permite que el mismo usuario diseñe la forma en que se presenta la información y la distribución de los menús. Si bien ImageJ provee programas (*drivers*) de manejo de algunas cámaras de video, la gran ventaja de los

programas comerciales es que permiten controlar los componentes motorizados del microscopio de manera integral, junto a los objetivos y filtros de fluorescencia. De esta manera, se asegura que la intensidad de luz en el momento de la captura, así como el contraste entre los objetos y el foco de la imagen, sean los apropiados para el propósito planteado.

Si bien con los programas comerciales analizados se pudieron evitar ciertos pasos intermedios que fueron requeridos por ImageJ para analizar la imagen utilizada en el presente trabajo, tales como la transformación a una imagen monocromática y su posterior binarización, no siempre se obtienen los resultados esperados. Cada caso particular requiere de un análisis exhaustivo de las condiciones apropiadas, previo al procedimiento de captura de gran cantidad de muestras, ya que lo que se presupone ideal para una muestra puede no serlo para otra.

El conocimiento de la composición celular de una región específica del sistema nervioso es relevante para la comprensión de la funcionalidad de los sistemas neurobiológicos (Miller *et al* 2014). La identificación de neuronas, como de muchas otras células presentes dentro de un tejido, requiere de un conocimiento particular de su estructura. Existen diversos tipos de neuronas que difieren en su morfología según el órgano nervioso considerado (Ramón Cajal, 1899). Si bien dentro de los tejidos cada neurona es una célula individual, que se contacta con otras células o estructuras mediante sus prolongaciones, no siempre puede individualizarse en la forma en que se visualizan en los cultivos celulares. Por otro lado, las neuronas presentan diversos tamaños dentro de un mismo tejido. Particularmente, en la médula espinal coexisten neuronas de 10 μm de diámetro, presentes en la Lámina I, con motoneuronas de 300 μm de diámetro, localizadas en la Lámina IX (Portiansky *et al* 2004). Esto implica que deben realizarse varios cortes finos y seriados o tomar series de imágenes en pila de un corte grueso para poder medir a estas células dentro de un mismo contexto. De esta manera, habrá mayor posibilidad de contabilizar neuronas que hayan sido correctamente identificadas.

La secuencia de pasos realizada por los programas comerciales permitiría inferir que los procedimientos realizados para obtener los resultados presentados podrían ser más prácticos o menos laboriosos en comparación con los requeridos por ImageJ. No obstante, esto no asegura la precisión de los datos obtenidos. Para confirmar dicha aseveración es necesario confrontar los resultados obtenidos por cada uno de ellos.

En este trabajo se presentó la secuencia de eventos necesarios para la identificación, cuantificación y análisis morfométrico de neuronas presentes

en un segmento de la médula espinal. Esta misma metodología podría ser utilizada para otros segmentos del órgano, otros órganos nerviosos y hasta otros tejidos, cuando el objetivo principal consista en identificar poblaciones celulares que tengan alguna característica diferencial con el resto de las células del mismo tejido, ya sea ésta tanto de tipo tintorial como morfométrica.

Declaración de conflicto de intereses

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

Agradecimientos

El presente trabajo fue financiado por el proyecto PICT-2012-0574 de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) dependiente del Ministerio de Ciencia y Tecnología (MINCyT). El autor agradece al Dr. F. Nishida por el aporte de la imagen utilizada en el presente trabajo.

Bibliografía

- Suvarna KS, Layton C, Bancroft JD. Bancroft's Theory and Practice of Histological Techniques. 2013. Londres: Churchill Livingstone Elsevier.
- Bruhemaayush. 2012. Learn nanoparticle analysis using Image-J in 10 minutes. <https://www.youtube.com/watch?v=js9ECPuoOwA>. Accedido el 26/3/2015.
- Celt. 2011. Automated cell counting in ImageJ. Keene State College. https://www.youtube.com/watch?v=PqHFsmS1_JY. Accedido el 26/3/2015.
- Cheng I. 2011. How to count cells using ImageJ. https://www.youtube.com/watch?v=8c68qIz_ftw. Accedido el 26/3/2015.
- Collins T.J. ImageJ for microscopy. *BioTechniques* 2007; 43: 25-30.
- Foley K. 2013. Counting cells with ImageJ. <https://www.youtube.com/watch?v=D1qBaFwuF4E>. Accedido el 26/3/2015.
- Ferreira T, Rasband W. 2012. ImageJ user guide. <http://imagej.nih.gov/ij/docs/guide/index.html>. Accedido el 26/3/2015.
- Fontana PA, Barbeito CG, Goya RG, Gimeno EJ, Portiansky EL. Impact of very old age on the expression of cervical spinal cord cell markers in rats. *J Chem Neuroanat.* 2009; 37: 98-104.
- Kuo T, Byun J. 2011. ITCN: Image-based tool for counting nuclei. <http://rsb.info.nih.gov/ij/plugins/itcn.html>. Accedido el 26/3/2015.
- Miller DJ, Balam P, Young NA, Kaas JH. Three counting methods agree on cell and neuron number in chimpanzee primary visual cortex. *Front Neuroanat* 2014. 8:36. doi: 10.3389/fnana.2014.00036.
- Nishida F, Zanuzzi CN, Martínez A, Barbeito CG, Portiansky EL. Functional and histopathological changes induced by

intraparenchymal injection of kainic acid in the rat cervical spinal cord. *Neurotoxicol.* 2015;49: 68-78

Portiansky EL. Análisis multidimensional de imágenes digitales. 2013. 1a ed. - La Plata: Universidad Nacional de La Plata.

Portiansky EL, Barbeito CG, Goya RG, Gimeno EJ, Zuccolilli GO. Morphometry of cervical segments grey matter in the male rat spinal cord. *J Neurosc Meth.* 2004;139: 217-29.

Portiansky EL, Barbeito CG, Flamini MA, Gimeno EJ, Goya RG. Presence of binucleate neurons in the spinal cord of young and senile rats. *Acta Neuropathol.* 2006;112: 647-9.

Portiansky EL, Nishida F, Barbeito CG, Gimeno EJ, Goya RG. Increased number of neurons in the cervical spinal cord of aged female rats. *PLoS One.* 2011;6: e22537.

Ramón Cajal. Textura del sistema nervioso del hombre y de los vertebrados. 1899. 2 tomos. Madrid: Nicolás Moya.

INSTRUCCIONES A LOS AUTORES

Política editorial y generalidades

Las opiniones expresadas por los autores que contribuyen con *Analecta Veterinaria* no reflejan, necesariamente, las opiniones de este medio ni de las entidades que lo auspician ni de nuestra institución. Asimismo, *Analecta Veterinaria* agradece el auspicio de las distintas empresas que la respaldan, pero deja establecido que dichas empresas no participan de las decisiones editoriales y su apoyo no genera obligaciones comerciales.

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. Los editores de *Analecta Veterinaria* tienen en consideración el tratamiento ético de los animales de experimentación y se reservan 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, 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 eventuales conflictos 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 trabajo para publicación. Se aceptan: artículos de investigación, comunicaciones cortas, descripciones de casos, informes técnicos y revisiones bibliográficas (ver definiciones y características de cada tipo de trabajo). Los editores decidirán la prioridad de publicación de los trabajos. 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 adecuar los resúmenes a las instrucciones que se encuentran en el punto 1.3.

Analecta Veterinaria adhiere a lo propuesto por el consenso de Vancouver del International Committee of Medical Journal Editors con respecto a asuntos de índole general como, por ejemplo, la definición de la autoría, las responsabilidades de los editores y las causas que obran

como posibles conflictos de intereses. En relación con otros aspectos, como el formato y el estilo de preparación del original, incluyendo las referencias bibliográficas, *Analecta Veterinaria* establece un conjunto de normas que se detallan en el apartado Instrucciones para la preparación del trabajo para publicación. Todas las dudas que se susciten podrán ser consultadas por correo electrónico a:

analecta@fcv.unlp.edu.ar

Instrucciones para la preparación del trabajo

Definición. El original para publicación comprende un documento principal y 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

Los artículos escritos en inglés deberán seguir la gramática propia del inglés británico. Se aceptan otras variantes del idioma inglés, siempre que se respeten de manera uniforme en todo el trabajo. Las unidades de medida se expresarán según el Sistema Internacional de Medidas (documento disponible para su descarga en la página web de la facultad: <http://www.fcv.unlp.edu.ar/analecta>). Las abreviaturas deberán ser aclaradas la primera vez que el término se mencione, pero no será necesaria su utilización si el término se menciona menos de cinco veces. Si el trabajo requiere el uso de numerosas abreviaturas (más de diez) deberá generarse una lista que se incluirá luego de los resúmenes. Ciertas siglas o acrónimos y abreviaturas (ATP, DNA, ELISA, OMS, PBS, Dr., N°, entre otras) no requieren aclaración.

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

1- Documento principal

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

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

zando 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.

1.2. Otras características comunes a todo tipo de trabajos

1.2.1. Primera página o página de presentación: contendrá el título del trabajo en dos idiomas, los autores y sus respectivas filiación/lugar de trabajo, la dirección electrónica de todos los autores, los datos completos del autor de contacto y el título abreviado. De ser necesario, la página de presentación podrá sobrepasar una página de extensión.

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

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

1.2.1 Primera página: página de presentación

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

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

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

El autor de contacto será identificado con un asterisco.

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

-Datos personales.

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

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

Ejemplo de primera página

Título completo en idioma del trabajo

Título en segundo idioma (inglés/español)

Autor AA¹, Autor BB^{1,2}, Autor CC³, Autor DD⁴*

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

Título abreviado

Datos del autor de contacto (*)

Nombre completo

Dirección postal laboral

Dirección electrónica laboral

Teléfono

Correo electrónico de los autores

Autor AA: aa@mail.com

Autor BB: bb@mail.com

Autor CC: cc@mail.com

1.2.2. Páginas segunda y tercera

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

KEY WORDS

-Características de los resúmenes. En ellos deben constar 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. Para una mayor utilidad en la búsqueda dentro de los sistemas de indización, se sugiere la utilización de términos no incluidos ni en el título ni en el resumen. Se permiten hasta cinco por idioma.

1.2.3. Páginas sucesivas

a- Texto. Organizado en secciones. Estas estarán encabezadas por subtítulos en mayúsculas, sin punto final. El texto contendrá las entradas para todas las tablas, figuras, referencias bibliográficas y material complementario. A continuación del texto se listarán las referencias bibliográficas.

b- Referencias bibliográficas

Cantidad. Se establece un máximo de treinta referencias para los artículos de investigación y quince para las comunicaciones cortas, descripciones de casos e informes técnicos. Para las revisiones bibliográficas se establece un mínimo de cuarenta referencias.

Formato de las citas en el texto. Se consignará, entre paréntesis y en color de fuente azul, el apellido del primer autor (seguido de la expresión et al si se trata de más de dos autores) y el año de publicación. Si el artículo tiene sólo dos autores, se consignarán ambos, separados por la letra y. Si la construcción así lo requiere podrá colocarse la cita a mitad de la oración.

... puede persistir el infiltrado de linfocitos (Deeg et al 2002).

El autor también podría haber elegido decir: "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)

Formato de las citas en la lista de referencias (al final del texto).

El orden será alfabético.

Artículos en publicaciones periódicas. Se citará la nómina completa de autores y sus iniciales. Luego del punto seguido, se introducirá el título del trabajo con mayúsculas y minúsculas (tipo oración), sin comillas ni negritas. A continuación, el título abreviado de la revista según consta en el servicio PubMed. Luego, el año, volumen, número y páginas, en ese orden, sin espacios luego de los signos de puntuación, según el formato que se muestra a continuación:

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

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

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 punto y 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, título del capítulo. En: autor del libro, año de publicación. Luego el título del libro, la edición (si no es la primera).

Ciudad de publicación: nombre de editorial, páginas inicial y final del capítulo.

García V, Ochoa L, Quiroga MF y 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.

Libros electrónicos de acceso libre en internet. Autor, año de publicación. Título [libro electrónico/e-book]. Lugar de publicación (si se conoce): editor. Disponible en: (URL) [fecha de acceso].

En caso de dudas acerca de cómo citar otro tipo de material (estándares internacionales, leyes, publicaciones parciales en e-books de Congresos, patentes, informes de organizaciones) comunicarse con la revista.

c- 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.

d- Declaración de conflictos de intereses

Bajo el subtítulo CONFLICTOS DE INTERESES se

consignarán las relaciones financieras o personales con organizaciones o personas que pueden influenciar o sesgar los resultados del trabajo, o declararán que no existen conflictos de intereses.

Ejemplo:

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.

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

1.3 Tipos de trabajos

-Artículos 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.

-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 artículos de investigación. No odrán tener más de 4 páginas de texto ni más de 3 figuras.

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

Introducción, 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.

-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.

Formato de resúmenes de presentaciones en reuniones científicas. Instrucciones para sus organizadores.

La presentación deberá realizarse en hoja A4, con un ancho de 8 cm, sin recuadrar, con tipografía Arial 9 pt e interlineado sencillo. La redacción deberá ordenarse como se describe a continuación.

Primer renglón: Título del trabajo, proyecto, beca o tesis, en negrita, sin abreviaturas, en tipografía mayúscula/minúscula.

Segundo renglón: Apellido completo e iniciales de los autores en tipografía mayúscula/minúscula.

Tercer renglón: Lugar de trabajo de los autores.

Cuarto renglón: en blanco.

Del quinto renglón en adelante se escribirá el texto. No deberá superar las 250 palabras y se organizará en Introducción, Objetivo/s, Metodología, Resultados y Conclusiones, aunque los títulos de estas secciones no deben aparecer. Para aquellos autores que presentan su plan de trabajo, deberá reemplazarse la sección de Resultados y Conclusiones por la de Resultados Esperados. Los resúmenes no pueden incluir gráficos ni imágenes, pero puede contener valores numéricos de los resultados encontrados. Se debe minimizar el uso de abreviaturas; en caso de ser utilizadas, deberán aclararse la primera vez que se citen y estar de acuerdo con el sistema internacional de unidades (SI).

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 escaneadas deberán tener una resolución de 300 dpi (para imágenes fotográficas macro o microscópicas) o de 600 a 1200 dpi (para dibujos lineales). 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.

Tablas. Las tablas se diseñarán usando la función correspondiente del procesador de texto o de las planillas de cálculo. Deben ser de estructura sencilla, sin sombreados y sin divisiones entre las filas o las columnas.

Material complementario

Podrán remitirse otro tipo de archivos, como videos o hipervínculos, cuya pertinencia y calidad será evaluada por el Comité 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 original, proceso de revisión y comunicación con los autores.

Se encuentra disponible para su descarga una lista de comprobación que podrá ser utilizada por los autores para revisar algunas cuestiones formales del trabajo antes de su envío.

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

trabajo, así como toda la comunicación subsecuente entre editores y autores, se realizará por correo electrónico. Es un requisito que las direcciones activas de correo electrónico de todos los autores figuren en la página de presentación, así como la dirección completa del autor de contacto formal (quien remite el trabajo).

El envío se realizará al Sr Director de *Analecta Veterinaria* a la siguiente dirección de correo:

analecta@fcv.unlp.edu.ar

En el cuerpo del mensaje se solicita consignar: título del trabajo, autores y direcciones de correo electrónico de todos los autores. En ese mensaje 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 comité editorial. Si el envío consiste en numerosos archivos (tres o más) se enviarán comprimidos con la extensión .rar. Todos los autores recibirán un mensaje de confirmación de la recepción correcta de todos los archivos.

Revisión. El comité editorial evaluará primero la pertinencia de la recepción del trabajo, según se adecue o no a las áreas del conocimiento que alcanza la revista. En caso de corresponder, el comité verificará que se cumplan las siguientes premisas: calidad de contenido para ser remitida a los miembros del comité científico, corrección gramatical del idioma del trabajo y adecuación a las normas editoriales. Los originales que no cumplan con las normas editoriales serán devueltos a los autores para ser reordenados de acuerdo con ellas.

Todos los artículos serán sometidos a una revisión anónima por pares: tanto los nombres de los autores como de los revisores se conservan en el anonimato. El comité editorial seleccionará para esa función a, por lo menos, dos evaluadores 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 Editor".

Los trabajos que sean reenviados más de una vez, o después de los cuatro meses de la decisión inicial, serán considerados como un nuevo envío.

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

Correo postal:

Sr. Director

Revista ANALECTA VETERINARIA

CC 296 (B1900AVW) La Plata,

ARGENTINA

